

Салихова Диана Ирековна

**НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙРОНАЛЬНЫХ И ГЛИАЛЬНЫХ
ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ
ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Гольдштейн Дмитрий Вадимович

доктор медицинских наук, доцент
Фатхудинов Тимур Хайсамудинович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Силадчев Денис Николаевич
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, старший научный сотрудник лаборатории структуры и функции митохондрий

кандидат биологических наук
Панова Александра Витальевна
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Защита диссертации состоится _____ в _____ часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3, morfolhum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте www.morfolhum.ru

Автореферат разослан « _____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биол. наук

Косырева А.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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-Myc (C-Myc), 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 SHSY-5Y 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 SHSY-5Y 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» (Пушино, 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение линий ИПСК. Для репрограммирования неинтеграционным методом использовали коммерческий набор «CTS CytoTune-iPS 2.1 Sendai Reprogramming Kit» (Invitrogen, США). Линия ИПСК, полученная методом интеграционной доставки векторов репрограммирования (лентивирусная инфекция), была предоставлена Федеральным научно-клиническим центром физико-химической медицины ФМБА (Лебедева О.С., 2016). Для проведения эксперимента были взяты культуры фибробластов, полученных из биоптата кожи от трех здоровых доноров мужского пола в возрасте 35 лет после подписания ими информированного согласия на предоставление биологического материала. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ». Полученные линии ИПСК культивировали в среде Essential E8 Medium (Gibco, США) с использованием подложки из рекомбинантного витронектина (Gibco, США) в концентрации 10 мкг/мл.

Дифференцировка ИПСК в нейрональном и глиальном направлениях. Для получения нейральных стволовых клеток ИПСК культивировали в среде DMEM/F12 (ПанЭко, РФ) с добавлением 1% добавки N2 (Gibco, США), 10 мкМ SB431542, 2 мкМ дорсоморфина и 200 нМ LDN193189 (Stemcell Technologies, США) (Chambers S.M. et al., 2009). Нейральные стволовые клетки (НСК) культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 2% добавки B27 (Gibco, США), 10 нг/мл фактора роста фибробластов-2 (FGF-2) (Prospec, Израиль) и 1 мкМ пурморфамин (Stemcell Technologies, США) для получения НКП (Liu H. et al., 2011). Для дифференцировки в глиальном направлении НСК культивировали в среде, содержащей стандартные компоненты: DMEM/F12, 1% добавки N2, 1% сыворотки (ПанЭко, РФ), с добавлением 10 нг/мл FGF-2 и 20 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF) (Prospec, Израиль). На следующем этапе культивирования в среду к стандартным компонентам вносили 10 нг/мл FGF-2, 20 нг/мл EGF и 20 нг/мл цилиарного нейротрофического фактора (CNTF) (PeproTech, США), на последнем этапе – 20 нг/мл EGF и 20 нг/мл CNTF.

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 12 часов, которую затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут. Супернатант отбирали и стерилизовали, пропуская через фильтр 0,22 мкм (Corning, США).

Проточную цитофлуориметрию использовали для оценки эффективности дифференцировок клеток. С этой целью их осаждали и фиксировали 4% раствором параформальдегида (Merck KGaA, Германия). Пермеабиллизацию проводили 70% метанолом на льду, после чего клетки окрашивали первичными антителами к транскрипционному фактору PAX6 (1:300), глиальному маркеру S100b (1:400) и нейрональному маркеру β III-тубулину (1:500) (Abcam, США). Затем клетки промывали и инкубировали с вторичными антителами, меченными флуорохромом Alexa Fluor 488 (1:600) и Alexa Fluor 555 (1:600) (Invitrogen, США). Полученную суспензию анализировали, используя проточный цитофлуориметр CyFlow ML (Partec, Германия). Количество иммунопозитивных клеток определяли с помощью программы FloMax.

Для иммуноцитохимического анализа культуры мозжечковых нейронов фиксировали 4% раствором параформальдегида, пермеабиллизовали 0,25% раствором Тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США) и обрабатывали первичными антителами – 12 часов при +4°C. Затем клетки промывали и инкубировали с вторичными антителами, меченными флуорохромами Alexa Fluor 488 (1:600) и Alexa Fluor 555 (1:600). Ядра окрашивали раствором DAPI (Sigma-Aldrich, США) 1 мкг/мл. Для анализа использовали люминесцентный инвертированный микроскоп Axio Observer.D1 (Carl Zeiss, Германия).

ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Выделение тотальной мРНК из клеточных культур или ткани головного мозга проводили с помощью коммерческого набора «RNeasy Mini Kit» (Qiagen, США) согласно прилагаемой инструкции. Далее по стандартному протоколу набора «RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Fisher Scientific, США) проводили синтез кДНК. Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени использовали готовую реакционную смесь «qPCRmix-HS SYBR» (Evrogen, РФ), амплификацию ставили в термоциклере BioRad iQ cycler (BioRad, США). 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.

Иммуноферментный анализ. Для исследования секреции нейротрофинов GDNF, BDNF, NGF и CNTF культурами 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 (Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации

по общему белку 0,5 мг/мл. Оптическую плотность измеряли, используя планшетный ридер (PerkinElmer, США) при длине поглощения 450 нм.

Протеомный анализ. Протеомный анализ пептидов осуществляли с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) системы Ultimate 3000 RSLCnano соединенной с масс-спектрометром Q-exactive HF (Thermo Scientific, США). 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.

Моделирование глутаматной эксайтотоксичности и гипоксии. Для моделирования глутаматной эксайтотоксичности культуру мозжечковых нейронов крысы промывали раствором DPBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} (ПанЭко, РФ). Далее клетки инкубировали 1 час в присутствии глутамата (200 мкМ) в буферном растворе следующего состава (мМ): NaCl – 140, KCl – 5, CaCl_2 – 2, глицин – 10, HEPES – 20, глюкоза – 5 (Sigma-Aldrich, США). После чего дважды промывали в буфере, содержащем 2 мМ MgCl_2 (Sigma-Aldrich, США), и возвращали исходную культуральную среду (Savinkova I.G. et al., 2013). Сокультивирование в системе Transwell (Corning, США) или добавление исследуемых КС осуществляли за сутки до моделирования глутаматной эксайтотоксичности на мозжечковых нейронах. Для моделирования гипоксии клетки нейробластомы линии SHSY-5Y инкубировали с 250 мкМ CoCl_2 (Sigma-Aldrich, США) в течение 4 часов, после чего промывали раствором Хенкса (ПанЭко, РФ) и добавляли среду для культивирования. После моделирования гипоксии производили сокультивирование с НКП или ГКП в системе Transwell или добавляли их КС.

Количество клеток в одной вставке Transwell составляло 200 тысяч, а конечная концентрация общего белка при добавлении КС 5 мкг/мл. При длительном культивировании (7 суток) добавку КС осуществляли через сутки.

Оценка гибели клеток. Гибель мозжечковых нейронов/клеток нейробластомы определяли через сутки после действия глутамата/ CoCl_2 . Для этого добавляли 0,5 мг/мл МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил-тетразолий бромид) (ПанЭко, РФ) в культуральную среду и инкубировали 2 часа с последующим растворением кристаллов формазана диметилсульфоксидом (ПанЭко, РФ). Оценку некротической гибели клеток проводили с помощью коммерческого набора «LDH Activity Assay Kit» (Sigma-Aldrich, США) согласно прилагаемой инструкции (ЛДГ-тест). Оптическую плотность измеряли, используя планшетный ридер (PerkinElmer, США), при длине поглощения 570/620 нм для МТТ-теста и 450 нм для ЛДГ-теста. Морфометрическую оценку гибели клеток проводили с помощью прижизненного окрашивания флуоресцентными красителями Hoechst 33342 (5 мкг/мл, 30 минут) и йодидом пропидия (1 мкг/мл, 10 минут) (Sigma-Aldrich, США) для исследования ядерной фрагментации

и нарушения целостности мембран. Для анализа использовали люминесцентный инвертированный микроскоп Axio Observer.D1 (Carl Zeiss, Германия).

Оценка роста нейритов. Активность процесса образования нейритов оценивали по морфологии клеток с применением иммуоцитохимического окрашивания антителами к β III-тубулину, а также по экспрессии генов-маркеров нейритогенеза MAP2 и GAP43, выявляемые методом ПЦР в режиме реального времени.

Моделирование экспериментального инфаркта мозга. Транзиторную окклюзию правой средней мозговой артерии выполняли по методу Коидзуми (Koizumi J., 1986) в модификации Лонга (Longa E.Z., 1989). Все манипуляции с животными были одобрены этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательского института морфологии человека» (протокол № 20). Операцию проводили под ингаляционной анестезией 2,5-3% изофлураном (Minrad, США) со смесью атмосферного воздуха 97-97,5%. Окклюзию правой средней мозговой артерии производили монофиламентом 4-0, покрытым силиконовым наконечником (Dossol, США) в течение 90 минут, после чего филамент извлекали с целью реперфузии.

Оценка терапевтической эффективности кондиционированных сред. Терапевтические эффекты оценивали в динамике по показателям выживаемости животных, изменению объема очага инфаркта и неврологического дефицита с применением стандартной шкалы для оценки тяжести инсульта mNSS для грызунов. Данная шкала включает оценку моторных нарушений, чувствительности, рефлексов и координации движений (Si D. et al., 2014). Объем очага инфаркта мозга измеряли по T2-взвешенным изображениям, полученным с помощью магнитно-резонансной томографии, с использованием программного пакета ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Объем зоны инфаркта 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).

Иммуногистохимическое исследование. После замораживания 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 (ПанЭко, РФ) в течение часа, а затем обрабатывали первичными антителами к CD68 (1:100) (Abcam, США) 12 часов при $+4^\circ\text{C}$. Затем криосрезы отмывали от первых антител и добавляли вторичные антитела, меченные флуорохромом Alexa Fluor 488 (1:600) и инкубировали в темноте в течение 60 минут. Общее количество CD68^+ - клеток оценивали на площади 1 мм^2 среза ишемизированной зоны головного мозга с помощью программы ImageJ путем подсчета количества положительно окрашенных клеток в поле зрения при увеличении $\times 200$.

Оценка ангиогенеза. Образование новых кровеносных сосудов в области ишемического повреждения головного мозга анализировали на гистологических срезах, окрашенных гематоксилином (Unisource, Индия) и эозином (Dudley chemical, США) при увеличении $\times 400$ в

программе ImageJ. Кровеносные сосуды идентифицировали как полые структуры, частично или полностью заполненные эритроцитами. Оценивали общее количество и объемную плотность сосудов на площади 1 мм² среза.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных выполняли в программе SigmaPlot 12.5. Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (стандартных ошибок среднего). При нормальном распределении данных использовали t-тест для парных сравнений и тест Хольма-Сидака для множественных сравнений и при распределении, отличного от нормального - тест Манна-Уитни для парных сравнений и тест Данна для множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и их дифференцировка в нейрональном и глиальном направлениях

В результате репрограммирования интеграционным и неинтеграционным методами дермальных фибробластов здоровых доноров были получены линии IPS1.1S, IPS1.2S, IPS1.3S и IPSRG2L.

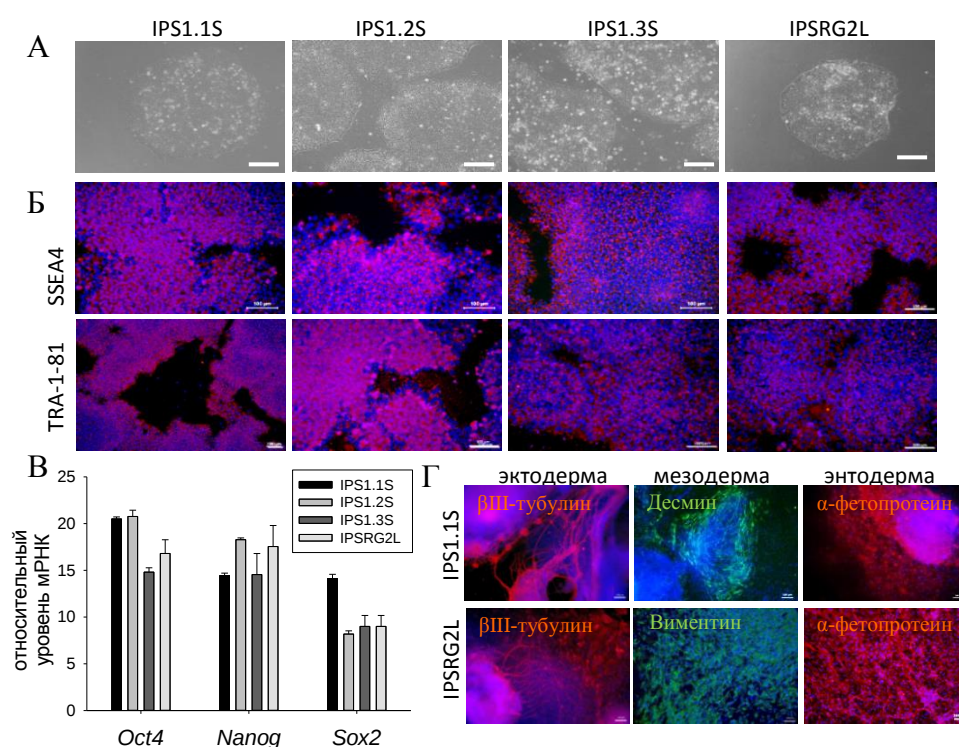


Рисунок 1. Характеристика линий ИПСК человека. А – морфология линий ИПСК. Фазово-контрастная микроскопия. Б – иммуноцитохимический анализ на наличие маркеров плюрипотентности TRA-1-81 и SSEA4. В – экспрессия генов плюрипотентности. ПЦР-РВ. Г – иммуноцитохимический анализ производных трех зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы) при спонтанной дифференцировке ИПСК в эмбрионидных тельцах. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабные отрезки 100 и 200 мкм. 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 ИПСК по морфологическим признакам были подобны эмбриональным стволовым клеткам человека (Hoffman L.M., Carpenter M.K., 2005), экспрессировали гены *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* и были иммунопозитивны на маркеры плюрипотентности SSEA4, TRA-1-81, а также формировали эмбрионидные тельца и после этапа спонтанной дифференцировки образовывали производные трех зародышевых листков (Рисунок 1).

Во избежание рутинного механического пересева НСК необходим дальнейший отбор линий на способность к эффективной дифференцировке в нейральном направлении. После окончания дифференцировки линии IPS1.1S и IPSRG2L, полученные интеграционным и неинтеграционным методами, 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 (Рисунок 2А).

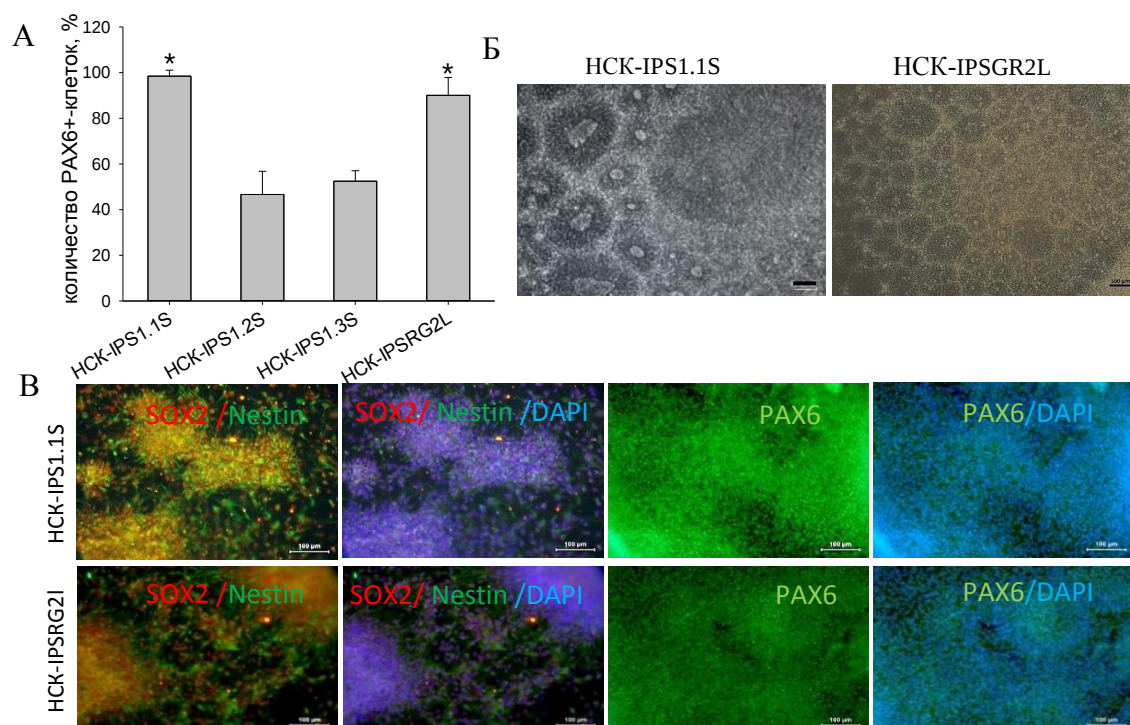


Рисунок 2. Характеристика культур НСК, полученных из линий ИПСК. А – количественный анализ клеток, положительно окрашенных антителами к общенейральному маркеру PAX6. Проточная цитофлуориметрия. * $p \leq 0,05$ достоверность различий от линий НСК-IPS1.2S и НСК-IPS1.3S. Б – морфология культур НСК. Фазово-контрастная микроскопия. В – иммуноцитохимический анализ культур НСК на наличие маркеров нейральной дифференцировки PAX6, Nestin и SOX2. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм.

Ранее подобные результаты были получены В. Hu et al. (2010), которые показали вариабельность количества НСК в культурах после дифференцировок ИПСК, полученных с помощью лентивирусной и эписомальной доставки векторов репрограммирования. Культуры НСК, полученные из линий IPS1.1S и IPSRG2L, представляли собой мелкие клетки, растущие плотно и образующие трехмерные структуры в виде замкнутых валиков с углублением в середине, и были иммунопозитивны к транскрипционным факторам PAX6 и Sox2, а также к

белку промежуточных филаментов Nestin (Рисунок 2Б, В).

Дальнейшая отработка протоколов дифференцировок в нейрональном и глиальном направлениях позволила воспроизводимо получать из НСК нейрональные и глиальные клетки-предшественники, морфологически отличимые друг от друга. Полученные культуры были иммунопозитивны к маркерам, соответствующим их клеточным фенотипам, нейрональному β III-тубулину и глиальному S100 β (Рисунок 3А, В).

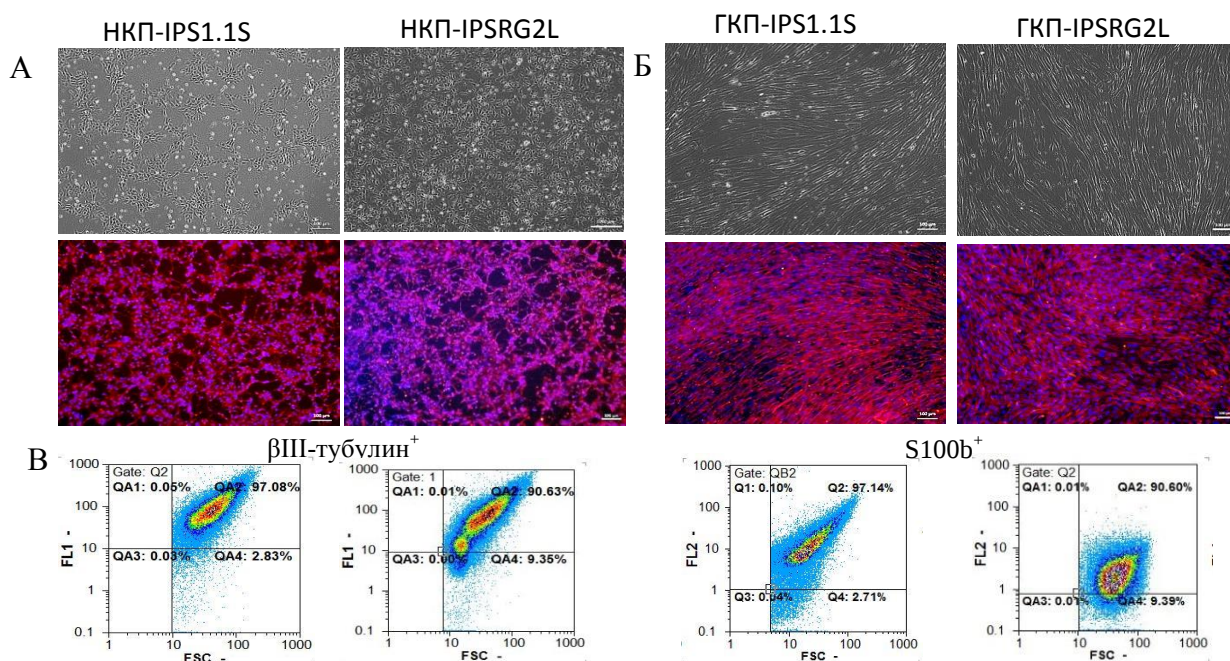


Рисунок 3. Характеристика культур. А – морфология НКП и иммуноцитохимический анализ на наличие нейронального маркера β III-тубулина. Б – морфология ГКП и иммуноцитохимический анализ на наличие глиального маркера S100 β . Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм. В – количественный анализ β III-тубулин $^{+}$ -клеток и S100 β $^{+}$ -клеток в культурах. Проточная цитофлуориметрия.

Эффективность дифференцировки в нейрональном и глиальном направлениях, установленная методом проточной цитофлуориметрии по количеству β III-тубулин $^{+}$ -клеток и S100 β $^{+}$ -клеток, составила порядка 98% для линии IP1.1S и 87% для линии IPSRG2L (Рисунок 3В).

Сравнительный анализ экспрессии и секреции регуляторных белков нейрональными и глиальными клетками-предшественниками

Для изучения секреторной активности культур был выполнен протеомный анализ КС и выявлены дифференциальные отличия в секреции биологически активных веществ между двумя культурами. Обнаруженные белки были распределены по их функциональным особенностям согласно данным литературным и базы Uniprot (Таблица 1). Так, наибольшее количество белков (304) было выявлено в КС-НКП. Среди них было обнаружено 136 пептидов, секретируемых только данным типом клеток. В КС-ГКП было обнаружено 243 белка, 75 из них

уникальны для данного типа культуры (Рисунок 4А). Полученные результаты протеомного анализа частично согласуются с данными работ по изучению секреторной активности первичных культур астроцитов и нейрональных прогениторных клеток человека (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; Mendes-Pinheiro B. et al., 2018).

Таблица 1

Белки, секретируемые нейрональными и глиальными клетками-предшественниками.

Нейрональные клетки-предшественники	Глиальные клетки-предшественники
Белки, регулирующие апоптоз и отвечающие за выживаемость клеток	
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)
Нейропипин 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)
Белки, регулирующие ангиогенез	
Лактадерин (MFGE8)	Миелоидный фактор роста (MYDGF)
Секретогранин 3 (SCG3)	Трансформирующий фактор роста $\beta 2$ (TGFB2)
Глипикан-1 (GPC1)	
Белки, регулирующие рост нейритов	
Атаксин-10 (ATXN10)	Динактин (DCTN)
Эфрин- B1 (EFN1B)	Тромбоспондин-2 (THBS2)
Эзрин (EZR)	Белок, содержащий домены дезинтегрин 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 3C (SEMA3C)	
Нейрональный пентраксин-2 (NPTX2)	
Басигин (BSG)	
C1q-связанный фактор (CRF)	
Белки, обладающие иммунорегулирующими свойствами	
Аннексин A1 (ANXA1)	Коллектин-12 (COLEC12)
Нектин-2 (NECTIN2)	Витамин-D-связывающий белок (GC)
Метеорин-подобный белок (METRNL)	Бета-субъединица импортина 1 (KPNB1)
Моэзин (MSN)	Toll-взаимодействующий белок (TOLLIP)
Аполипопротеин A-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)

Нейротрофины, которые, как известно, обладают протективными свойствами, не были обнаружены при протеомном анализе, но их количество было оценено с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Согласно полученным данным наибольшая концентрация нейротрофических факторов BDNF, NGF, CNTF и GDNF была обнаружена в секрете ГКП, что согласуется с результатами предыдущих работ (Gozes I. et al., 2004; Jha M. et al., 2018; Kuno R. et al., 2006) (Рисунок 4Б).

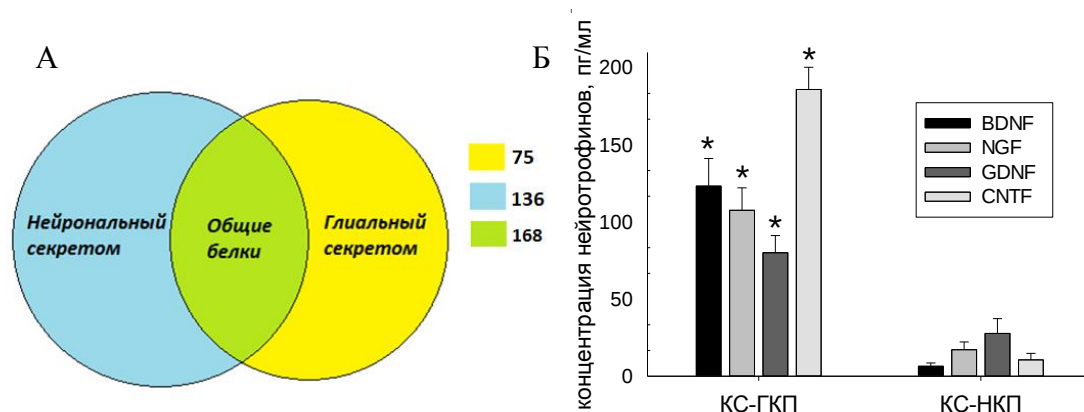


Рисунок 4. Секреторная активность НКП и ГКП. А - количество общих и уникальных белков. Протеомный анализ. Б - секреция нейротрофинов нейрональными и глиальными клетками-предшественниками. ИФА. * $p \leq 0,05$ - достоверность различий при сравнении двух КС.

Дополнительно была произведена оценка экспрессии белков, выявленных при протеомном и иммуноферментном анализе. 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*, *EFN1B*, *VGF* и *SERPINI1* была обнаружена только в культуре НКП.

Таким образом, различия между двумя культурами были выявлены не только на уровне секреторной активности, но и подтверждены оценкой экспрессии генов. Результаты по протеомному и иммуноферментному анализам дали возможность изучить состав КС, а распределение регуляторных белков по функциональным особенностям позволило предположить направленность их действия.

Сравнительный анализ нейротрофического и прорегенеративного действия нейрональных и глиальных клеток-предшественников на моделях *in vitro*

На модели гипоксии, вызванной дихлоридом кобальта, было показано, что добавление как КС-ГКП, так и КС-НКП способствовало выживанию клеточной линии SH-SY5Y путем изменения экспрессии генов регуляторов апоптоза *BAX* и *BCL2* (Рисунок 5А, Б). При этом КС-ГКП на $15,21 \pm 5,4\%$ эффективнее увеличивала жизнеспособность клеток нейробластомы, снижая количество как апоптотических, так и некротических клеток (Рисунок 5В). В то же время КС-НКП обладала лишь способностью к уменьшению числа апоптотических клеток. При

сокультивировании НКП и ГКП с клеточной линией SH-SY5Y наблюдали те же эффекты.

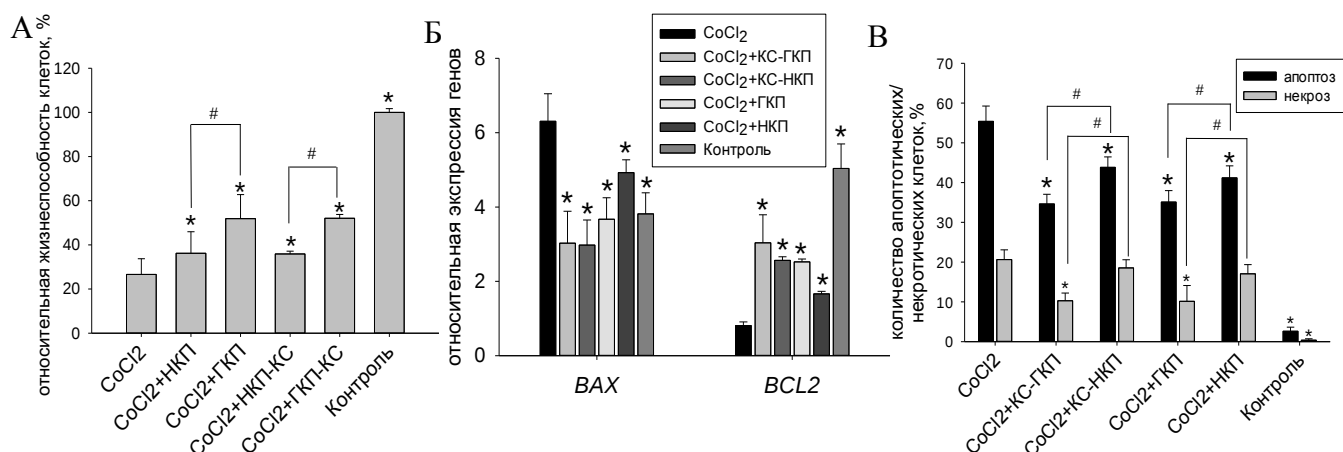


Рисунок 5. Результаты оценки цитопротективного действия изучаемых культур и их КС при химической гипоксии. А - относительная жизнеспособность клеток при моделировании гипоксии. МТТ-тест. Б - относительная экспрессия генов семейства BCL2. ПЦР-РВ. В - результаты количественной оценки апоптотических и некротических клеток в культуре. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с дихлоридом кобальта (CoCl₂); # $p \leq 0,05$ при сравнении НКП и ГКП, а также их КС.

КС, полученные при культивировании НКП и ГКП, положительно воздействовали на рост аксонов и дендритов клеточной линии SHSY-5Y (Рисунок 6). При этом КС-ГКП обладала более выраженным нейротрофическим действием по сравнению с КС-НКП: была замечена тенденция к росту нейритов на протяжении всего эксперимента и на 7 сутки экспрессия генов маркеров нейритогенеза *MAP2* и *GAP43* достигала контрольных значений (Рисунок 6Б, В). Аналогичные результаты были получены при сокультивировании ГКП и НКП с клетками нейробластомы.

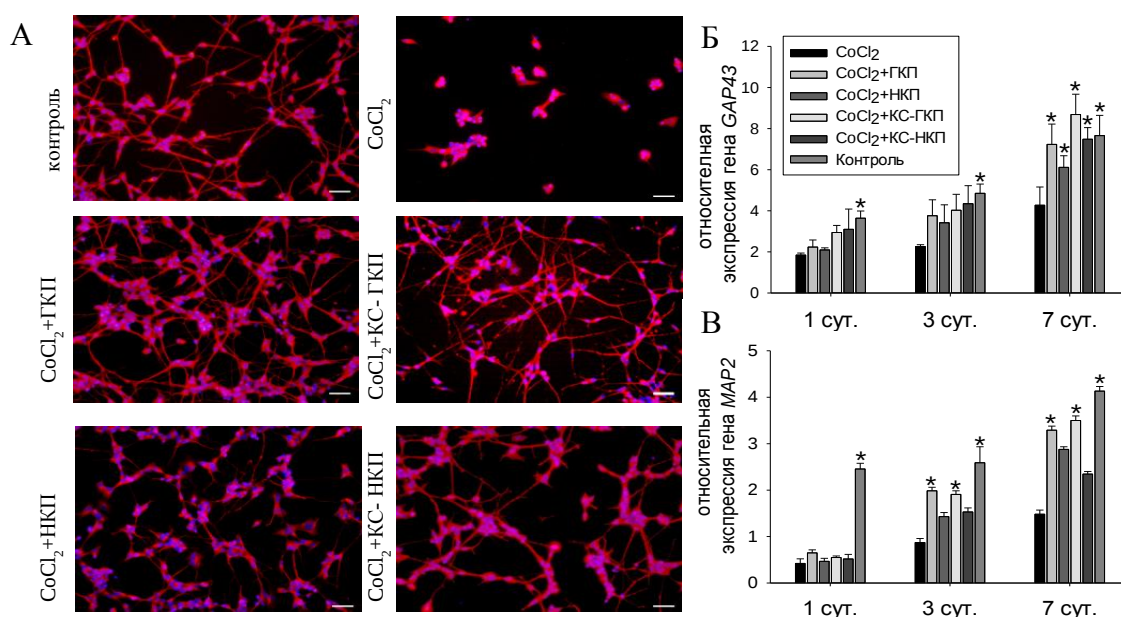


Рисунок 6. Результаты оценки роста и регенерации нейритов. А - иммуноцитохимическое окрашивание клеточной линии SHSY-5Y антителами к βIII-тубулину (красный) на 7 сутки эксперимента. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм. Б, В - сравнительный анализ экспрессии генов *GAP43* и *MAP2*. ПЦР-РВ. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с дихлоридом кобальта (CoCl₂).

На модели глутаматной эксайтотоксичности было показано, что добавление КС-ГКП способствовало увеличению жизнеспособности мозжечковых нейронов на $24 \pm 2,66\%$ путем увеличения экспрессии гена *Bcl2* и подавления гена *Bax* (Рисунок 7А, Б).

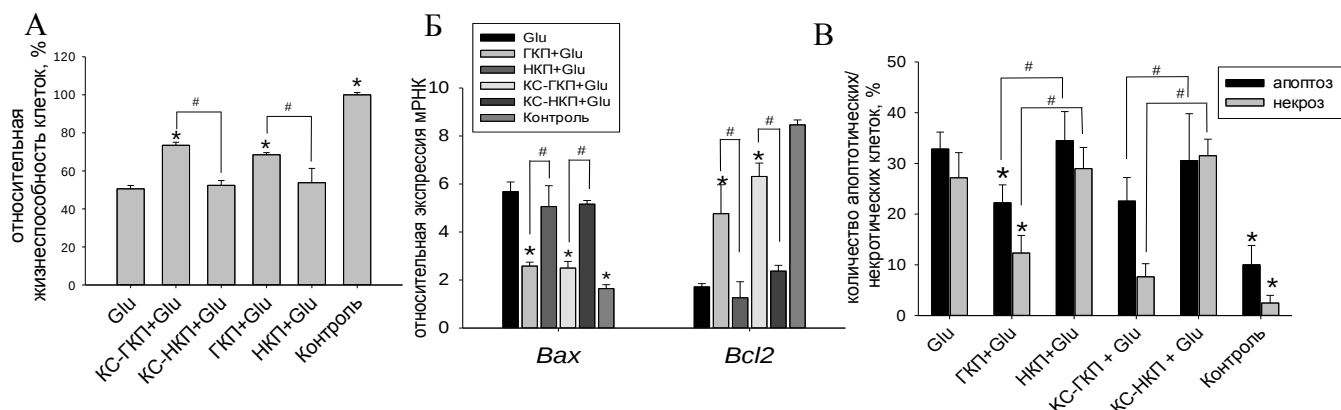


Рисунок 7. Результаты оценки цитопротективного действия изучаемых культур и их КС при глутаматной эксайтотоксичности. А - относительная жизнеспособность первичной культуры мозжечковых нейронов. МТТ-тест. Б - количественная оценка экспрессии генов семейства BCL2. ПЦР-РВ. В - результаты количественной оценки 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.

Инкубация с КС-ГКП приводила к уменьшению количества апоптотических и некротических клеток в культуре мозжечковых нейронов (Рисунок 7В). Сокультивирование с ГКП оказывало схожее действие на нейроны мозжечка крысы. Подобного эффекта не было обнаружено при инкубации с НКП или КС-НКП.

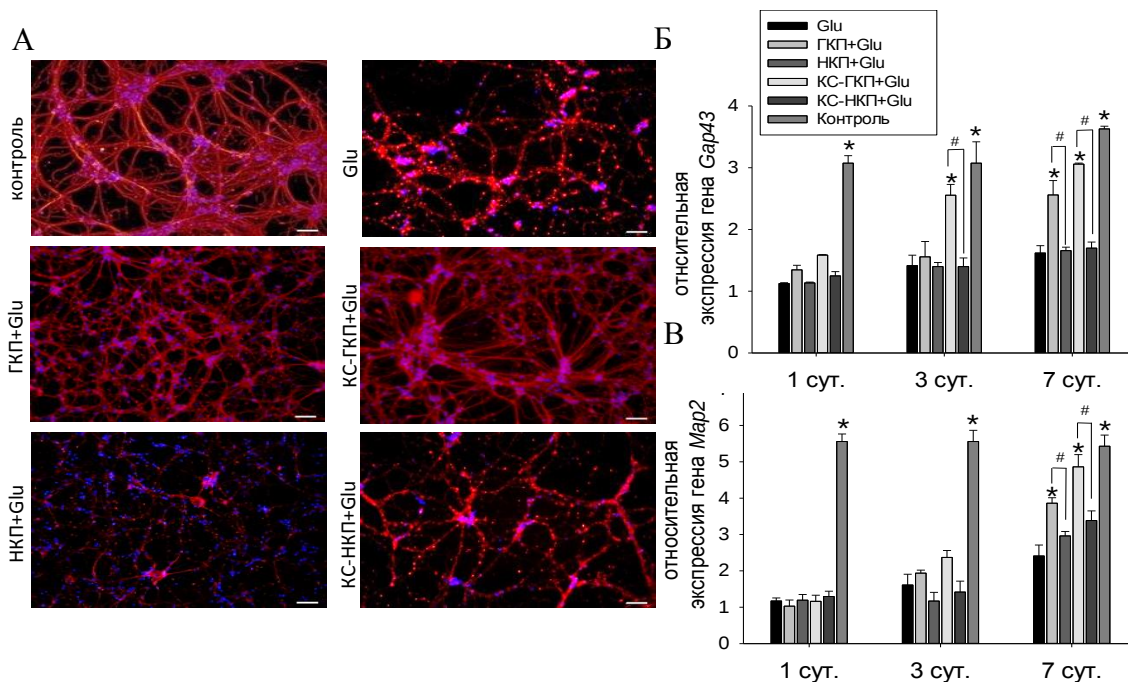


Рисунок 8. Результаты оценки роста и регенерации нейритов. А - иммуноцитохимическое окрашивание мозжечковых нейронов антителами к β III-тубулину (красный) на 7 сутки эксперимента. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм. Б, В - сравнительный анализ экспрессии генов *Gap43* и *Map2*. ПЦР-РВ. * $p \leq 0,05$ достоверность различий при сравнении с глутаматом (Glu). # $p \leq 0,05$ при сравнении НКП и ГКП, а также их КС.

различий при сравнении с глутаматом (Glu). $^{\#}p \leq 0,05$ при сравнении двух культур и их КС.

КС-ГКП также положительно влияли на рост нейритов мозжечковых нейронов крыс в модели глутаматной эксайтотоксичности, увеличивая уровень экспрессии генов *Map2* и *Gap43* на 7 сутки эксперимента. При сокультивировании с ГКП наблюдали те же эффекты на мозжечковых нейронах. Напротив, инкубация с НКП или КС-НКП не способствовала регенерации и росту нейритов (Рисунок 8).

Сравнительный анализ терапевтического действия кондиционированных сред глиальных и нейрональных клеток предшественников на модели экспериментального инфаркта мозга у крыс

Исследования *in vivo* показали, что терапия КС-ГКП индуцировала значительно более быстрое восстановление функций головного мозга животных, уменьшая степень неврологического дефицита после инсульта по сравнению с контрольной группой (Рисунок 9Б). Введение КС-НКП в данном эксперименте не повлияло на степень выраженности неврологического дефицита. При этом в двух экспериментальных группах не наблюдали выраженного уменьшения объема очага инфаркта и улучшения выживаемости (Рисунок 9А, В).

Для поиска молекулярно-генетических механизмов терапевтического воздействия исследуемых КС-НКП и КС-ГКП изучали изменения экспрессии ряда генов с помощью ПЦР-РВ (Рисунок 10). После введения КС-ГКП уровень гена позитивного регулятора апоптоза *Bax* статистически достоверно понижался по сравнению с контрольной группой.

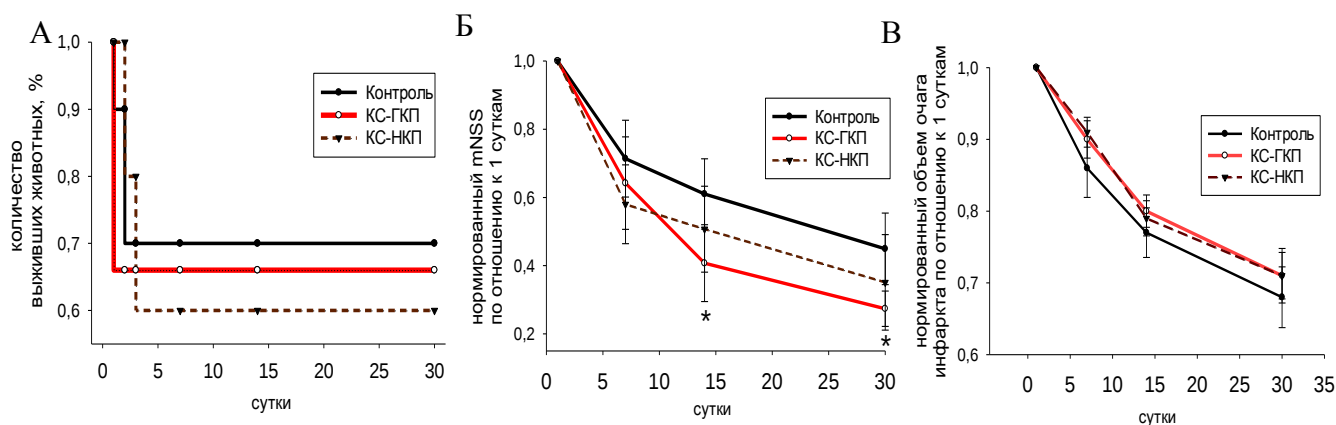


Рисунок 9. Результаты показателей выживаемости, неврологического дефицита и объема очага инфаркта животных. А - кривые выживаемости Каплана-Мейера. Б - динамика нормированного mNSS. В - динамика изменения объема очага инфаркта. $^*p \leq 0,05$ достоверность различий от группы контроля.

Напротив, инфузия КС-НКП способствовала увеличению экспрессии гена *Bax* в 2,4 раза по сравнению с контрлатеральным интактным полушарием (ИП) и группой с введением КС-ГКП. При этом значимых различий в экспрессии гена *Bcl2* между сравниваемыми группами не было обнаружено. Активацию ангиогенеза оценивали по экспрессии гена *Vegfa*, которая была увеличена в группах с введением КС-ГКП и КС-НКП по сравнению с контролем (Рисунок 10А).

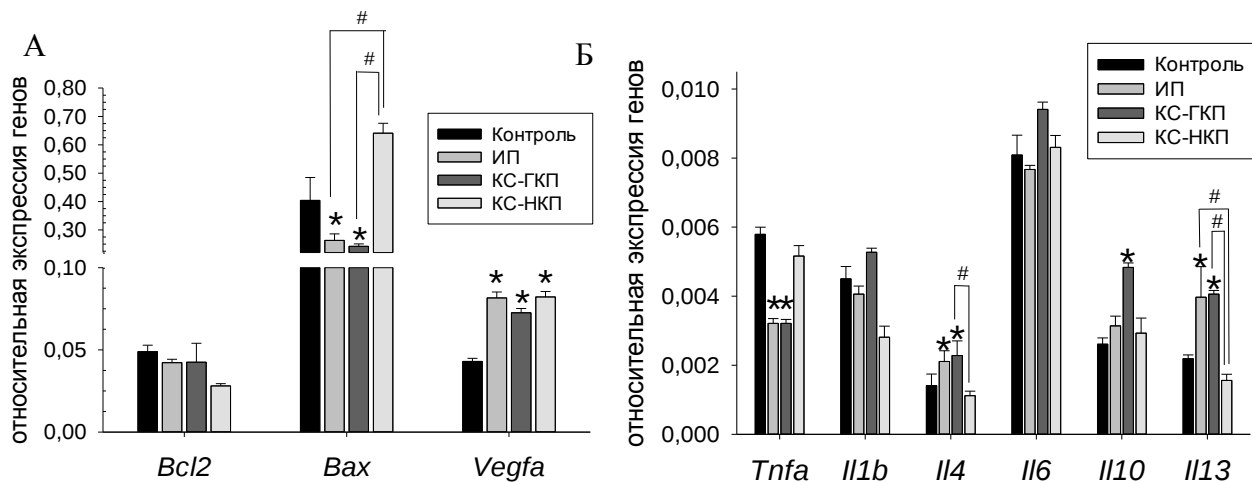


Рисунок 10. Относительная экспрессия генов. А-экспрессия генов *Vegfa* и регуляторов апоптоза *Bcl2* и *Bax*. Б - экспрессия генов про-и противовоспалительных цитокинов. ПЦР-РВ. * $p \leq 0,05$ достоверность различий от группы контроля. # $p \leq 0,05$ при сравнении КС, полученных от двух культур.

Сосудистый некроз тканей головного мозга вызывает вторичное поражение за счет продолжительного воспаления, выражающегося повышенной экспрессией гена *Tnfa*. Введение КС-ГКП достоверно усиливало экспрессию генов противовоспалительных цитокинов *Il4*, *Il10* и *Il13* и уменьшало экспрессию гена *Tnfa* в паренхиме 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 10Б). При этом в экспериментальной группе КС-ГКП наблюдали снижение количества фагоцитирующих клеток микроглии/макрофагов ($CD68^+$) в области ишемического повреждения мозга по сравнению с контрольной группой. Напротив, введение КС-НКП статистически значимо увеличивало количество $CD68^+$ -клеток по сравнению с КС-ГКП (Рисунок 11А).

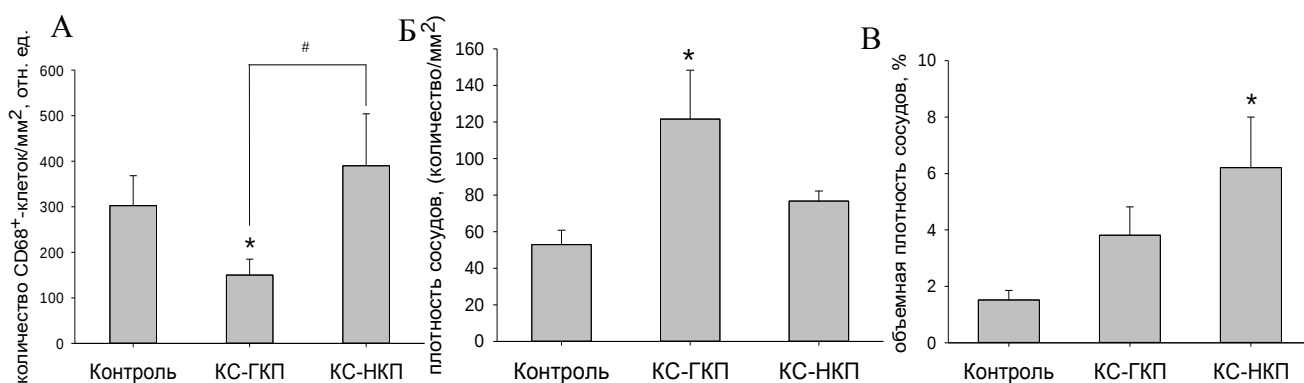


Рисунок 11. Результаты морфометрического анализа. А - количество $CD68^+$ -клеток на 1 мм² площади среза ткани мозга. Б – количество кровеносных сосудов на 1 мм² площади среза ткани мозга. В – объемная плотность кровеносных сосудов (отношение площади сосудов к 1 мм² площади среза). * $p \leq 0,05$ достоверность различия от группы контроля. # $p \leq 0,05$ при сравнении КС, полученных от двух культур.

Терапия КС-ГКП и КС-НКП положительно влияла на ангиогенез в ишемизированной зоне мозга крыс (Рисунок 11Б, В). Введение КС-ГКП способствовало количественному увеличению

новообразованных кровеносных сосудов, в то время как введение КС-НКП увеличивало их объемную плотность.

Полученные результаты частично согласуются с ранее опубликованными исследованиями, демонстрирующими эффективность КС в моделях *in vitro* и *in vivo*. Во многих работах было показано уменьшение объема очага инфаркта при введении КС мезенхимальных стромальных клеток животным с экспериментальным инсультом, хотя в данном исследовании такого эффекта зарегистрировано не было (Egashira Y. et al., 2012; Tsai M. et al., 2014; Yang H.N. et al., 2018).

Обобщая результаты проведенных исследований, можно сделать вывод, что в представленных моделях *in vitro* и *in vivo* ГКП обладают более выраженным паракринным действием. Несмотря на то, что КС-НКП характеризуется наибольшим количеством секретируемых белков, их функциональные свойства ограничиваются лишь способностью стимулировать ангиогенез ишемизированной области 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 – лейкоингибирующего 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. Продемонстрирована 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук

1. Салихова Д.И., Федюнина И.А., Бухарова Т.Б., Гольдштейн Д.В., Киселев С.Л. Ключевые этапы дифференцировки ИПСК в нейрональные и глиальные клетки //Гены и клетки. – 2018. – Т.13. – №3. – С.52-55.
2. Черкашова Э.А., Бурунова В.В., Бухарова Т.Б., Наместникова Д.Д., Губский И.Л., Салихова Д.И., Галицына Е.В., Леонов Г.Е., Сухинич К.К., Чехонин В.П., Губски Л.В., Киселёв С.Л., Гольдштейн Д.В., Ярыгин К.Н. 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 .
3. Салихова Д.И., Леонов Г.Е., Бухарова Т.Б., Корниенко З.В., Булатенко Н.В., Ефремова А.С., Махнач О.В., Макаров А.В., Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В. 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.
4. Наместникова Д.Д., Губский И.Л., Салихова Д.И., Леонов Г.Е., Сухинич К.К., Мельников П.А., Бурунова В.В. 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.
5. Салихова Д.И., Леонов Г.Е., Бухарова Т.Б., Булатенко Н.В., Ефремова А.С., Махнач О.В., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В. 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.

Другие публикации

6. Salikhova D.I., Fedyunina I.A., Leonov G.E., Bukharova T.B., Kiselev S.L., Goldstein D.V. Obtaining mixed cultures of neurons and glia from human induced pluripotent stem cells in the 3D system. STERP International Conference «Translational Research in Cell Therapy». Moscow. – 2018. – P.42-43.
7. Салихова Д.И., Леонов Г.Е., Бухарова Т.Б., Ефремова А.С., Киселев С.Л., Гольдштейн Д.В. Разработка эффективного протокола нейрональной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Сборник научных трудов V Международной конференции «ПОСТГЕНОМ 2018». Казань. – 2018. – С.123.
8. Салихова Д.И., Леонов Г.Е., Бухарова Т.Б., Ефремова А.С., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Киселев С.Л., Гольдштейн Д.В. Сравнительный анализ влияния пептида Noggin и LDN193189 на нейрональную дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

человека. Сборник научных трудов научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва. – 2018. – С. 56-57.

9. **Салихова Д.И.**, Леонов Г.Е., Бухарова Т.Б., Булатенко Н.В., Махнач О.В., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В. Сравнительный анализ способности различных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток дифференцироваться в нейральном направлении. Материалы IV национального конгресса по регенеративной медицине //Гены и клетки. – 2019. – Т.14. – № S1. – С. 204.

10. Леонов Г.Е., **Салихова Д.И.**, Бухарова Т.Б., Корниенко З.В., Булатенко Н.В., Махнач О.В., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Киселев С.Л., Гольдштейн Д.В. Сравнительный анализ нейротрофических и нейропротекторных свойств нейрональных, глиальных предшественников и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Материалы IV национального конгресса по регенеративной медицине //Гены и клетки. – 2019. – Т.14. – № S1. – С. 134.

11. **Салихова Д.И.**, Леонов Г.Е., Наместникова Д.Д., Булатенко Н.В., Фатхудинов Т.Х., Губский И.Л., Бухарова Т.Б., Сухинич К.К., Мельников П.А., Черкашова Э.А., Губский Л.В., Ярыгин К.Н., Гольдштейн Д.В. Изучение терапевтического эффекта нейрональных прогениторных клеток при сокультивировании на модели гипоксии и экспериментальном инфаркте мозга у крыс. Материалы IV российского национального конгресса «Трансплантация и донорство органов» //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № S. – С. 161.

12. Leonov G.E., **Salikhova D.I.**, Bukharova T.B., Efremova A.S., Kiselev S.L., Goldshtein D.V. Condition medium neuronal progenitor cell protects against H₂O₂-induced SH-SY5Y cell death. 3rd Sechenov international biomedical summit (SIBS). Moscow. – 2019. – P. 26-27.

13. Leonov G.E., **Salikhova D.I.**, Bukharova T.B., Efremova A.S., Kiselev S.L., Goldshtein D.V. The neuroprotective effect of conditioned medium from neuronal and glial progenitor cells in H₂O₂-induced oxidative stress model //FEBS Open Bio. – 2019. – V.9 – № S1. – P. 232.

14. Дьяконов А.С., **Салихова Д.И.**, Мокроусова В.О., Петухова А.В., Леонов Г.Е., Бухарова Т.Б., Наместникова Д.Д., Черкашева Э.А., Фатхудинов Т.Х., Ярыгин К.Н., Гольдштейн Д.В. Изучение терапевтического эффекта кондиционированных сред, полученных при культивировании нейрональных и глиальных предшественников, при экспериментальном инфаркте мозга у крыс. 24-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука XXI века». Пущино. – 2020. – С. 182-183.

Патенты

1. Патент РФ № 2690498. Зарегистрирован 04.06.2018. «Способ получения ноотропной композиции на основе полипептидных комплексов, выделенных из нейронов и глиальных клеток, полученных методом направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» / Гольдштейн Д.В., Пальцев М.А., Киселев С.Л., Ярыгин К.Н., Бухарова Т.Б., Наместникова Д.Д., Махнач О.В., **Салихова Д.И.**, Ефремова А.С., Федюнина И.А., Леонов Г.Е., Фатхудинов Т.Х., Макаров А.В., Некрасова Л.П.

2. Патент РФ № 2690846. Зарегистрирован 06.06.2018. «Ноотропная композиция на основе полипептидных комплексов, выделенных из нейронов и глиальных клеток, полученных методом направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» / Гольдштейн Д.В., Пальцев М.А., Киселев С.Л., Ярыгин К.Н., Бухарова Т.Б., Наместникова Д.Д., Махнач О.В., **Салихова Д.И.**, Ефремова А.С., Федюнина И.А., Леонов Г.Е., Фатхудинов Т.Х., Макаров А.В., Некрасова Л.П.