

## АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание ученой степени «доктор философии» (Ph.D) по специальности 6D060700 – Биология

Нуркенов Туленды Тулешевич

### **Исследование комбинированного действия растительных полифенолов и мезенхимальных стволовых клеток при ишемическом поражении головного мозга**

Отечественный научный руководитель: д.б.н., профессор Шалахметова Т.М. (КазНУ им. аль-Фараби)

Зарубежный научный руководитель: PhD, профессор Lee James C-M. (University of Illinois at Chicago, США)

Данная диссертация представляет собой комплексное исследование, посвященное доклиническому изучению эффективности новой стратегии лечения последствий ишемического повреждения головного мозга, основанной на комбинированном применении терапии стволовыми клетками и экстракта полифенолов, выделенных из корней Кермека Гмелина (*L.gmelinii*).

**Актуальность исследования.** Ишемический инсульт является третьей причиной смерти после болезней сердца и рака и ведущей причиной длительной инвалидности у пожилых людей в большинстве стран. В Казахстане ежегодно регистрируется 2,5–3,7 случая инсульта на 1000 человек населения при уровне смертности в 1–1,8 случая. В настоящее время эффективной терапией, одобренной для лечения острого ишемического инсульта, является местный или системный тромболизис закупоренных сосудов с использованием рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (tPA), эффективность которого ограничена временным окном в 3-4 часа после появления симптомов. Таким образом, существует большая потребность в разработке альтернативных, более гибких и клинически значимых методов лечения. Одним из перспективных направлений постинсультной реабилитации является применение терапии мезенхимальными стволовыми клетками. С другой стороны, есть ряд данных, свидетельствующих о том, что природные антиоксиданты, в частности полифенолы растений, способны оказывать выраженное антиоксидантное и нейрозащитное действие. В связи с этим, весьма перспективным является комплексный подход, основанный на изучении нейропротекторных свойств растительных полифенолов и регенеративного потенциала мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при лечении последствий ишемического церебрального инсульта.

**Объекты исследования.** Объектами исследования служили первичные астроциты человека, нейроны и линия церебральных эндотелиальных клеток мыши (ЦЭК, bEnd3), экстракт полифенолов из корней *L.gmelinii*, крысы Wistar и мезенхимальные стволовые клетки крыс.

**Предмет исследования:** оценка *in vitro* и *in vivo* антиоксидантных, противовоспалительных и нейропротекторных свойств экстракта полифенолов, выделенного из корней *L.gmelinii*; оценка *in vivo* терапевтического потенциала комбинированного применения полифенолов растений и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на животной модели ишемического повреждения головного мозга.

**Целью диссертационного исследования является** разработка и доклиническая апробация новой стратегии лечения ишемического повреждения головного мозга, основанной на комбинированном применении терапии стволовыми клетками и полифенолов растений.

Для достижения этой цели были выполнены три задачи:

- оценка *in vitro* антиоксидантных и противовоспалительных свойств экстракта полифенолов, выделенного из *L.gmelinii*, на культурах первичных нейронов человека, астроцитов и ЦЭК мыши;
- оценка *in vivo* нейрозащитных свойств экстракта полифенолов, выделенных из *L.gmelinii*, у самцов крыс Wistar, подвергшихся окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) и пероральному введению экстракта из *L.gmelinii*;
- Оценка *in vivo* эффективности перорального введения экстракта из *L.gmelinii* в сочетании с трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток для лечения последствий экспериментально индуцированного ишемического повреждения головного мозга у самцов крыс Wistar, подвергшихся ОСМА.

**Методологической базой исследования** являются цитологические и гистологические исследования, основанные на использовании методов клеточной биологии: микроскопии, *in vitro* культивирования, криоконсервации и размораживания, трансплантации, гистологии и иммуногистохимии, белкового иммуноблоттинга, а также методах микрохирургии (ОСМА), функциональных поведенческих тестов, прижизненного оптического имиджинга.

**Научная новизна исследования.** Наиболее значимыми научными результатами диссертации являются три момента:

- Обнаружены антиоксидантные, противовоспалительные и нейропротекторные свойства экстракта из корней и корневищ *Limonium Gmelinii*;
- Обнаружены новые особенности распределения и хоуминга мезенхимальных стволовых клеток в организме при трансплантации в условиях ишемического поражения головного мозга;
- Комплексный подход, основанный на использовании растительных полифенолов и МСК, является более эффективным способом лечения последствий ишемического церебрального инсульта по сравнению с монотерапией, благодаря более широкому спектру терапевтического действия.

**Практическая значимость исследования.** Результаты проведенных исследований показали, что экстракт полифенолов из корней *Limonium Gmelinii* обладает антиоксидантными и нейропротекторными свойствами, а комбинированная терапия с экстрактом из *Limonium Gmelinii* и мезенхимальными стволовыми клетками является более эффективным подходом по сравнению с монотерапией. Поскольку сухой экстракт корней *Limonium Gmelinii* «Лимонидин» уже разрешен Комитетом медико-фармацевтического контроля Министерства здравоохранения Республики Казахстан для медицинского применения в качестве гепатопротекторного и противовоспалительного средства, он может быть рекомендован для дальнейших клинических испытаний в качестве реабилитационной терапии после инсульта, отдельно или в комбинации с МСК. Полученные материалы могут быть включены в курсы лекций для студентов, магистрантов и докторантов высших учебных заведений медицинского и биологического профиля.

**Основные результаты исследования.** В соответствии с целями и задачами выполнены следующие исследовательские задачи:

- *In vitro* были применены окислительные и воспалительные модели, индуцированные H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и TNF- $\alpha$  в первичных нейронах и астроцитах человека, а также в линии церебральных эндотелиальных клеток (СЕС) мыши. Уровни генерации ROS, активации NADPH-оксидазы, экспрессии Р-селектина и активности ERK1/2 оценивали с помощью количественного иммунофлуоресцентного анализа, конфокальной микроскопии и анализа МАРК.
- Была разработана модель временной ОСМА *in vivo* путем введения нейлоновой мононити с силиконовым наконечником 4/0 (Docol Corp, США) с последующей реперфузией.
- Анализ двигательной функции лабораторных животных, подвергнутых ОСМА, проводился с помощью теста равновесия «Beam walk».
- Мезенхимальные стволовые клетки выделены из компактных костей лабораторных животных (крыс); чистота полученной популяции МСК подтверждена иммунофлуоресцентным окрашиванием по маркерам CD90, CD105, CD34 и CD19.
- Оптимизирован метод трансфекции МСК лентивирусным вектором; были разработаны метод и дозы внутривенного введения МСК лабораторным животным и прижизненная визуализация трансфицированных МСК в организме крысы.
- Проведены гистологические срезы и анализ тканей головного мозга экспериментальных животных.

Таким образом, проведенные исследования и полученные на их основе научные результаты позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Доказано, что экстракт *L. Gmelinii* не оказывает токсического действия на нейроны, астроциты и эндотелиоциты головного мозга в дозировке 0,001-0,1 мг / мл.

2. В нейронах H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> индуцировал перепроизводство ROS, в астроцитах TNF- $\alpha$  инициировал генерацию ROS, активацию NADPH-оксидазы и фосфорилирование ERK1/2. В ЦЭК воздействие TNF- $\alpha$  индуцировало окислительный стресс и запускало накопление Р-селектина на поверхности клеток. В свою очередь, предварительная обработка клеток экстрактом из *L.gmelinii* подавляла окислительный стресс во всех типах клеток и провоспалительные реакции в астроцитах и ЦЭК.

3. *In vivo* ежедневное пероральное лечение крыс 200 мг/кг экстракта из *L.Gmelinii* в течение 28 дней значительно улучшило нарушенную вследствие инсульта двигательную активность крыс и частично нормализовало гистологическую структуру мозга, поврежденного ОСМА, тем самым подтверждая нейропротекторные свойства экстракта.

4. Показано, что распределение МСК в организме животных с очаговым ишемическим инсультом отличается от такового у интактных крыс: у здоровых животных МСК локализуются преимущественно в грудной и брюшной областях тела; у животных с ОСМА большинство клеток обнаружено в поврежденных областях мозга.

5. Ежедневное пероральное лечение крыс экстрактом *L.gmelinii* 200 мг/кг в течение 28 дней и однократная трансплантация MSC ( $5 \times 10^6$  клеток) полностью восстанавливали двигательную активность крыс после инсульта к 28-му дню, что подтверждает, что комбинированная терапия полифенолами растений и МСК - более эффективный подход к восстановлению неврологических функций после развития инсульта по сравнению с монотерапией.

Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в 10 публикациях, из которых одна статья опубликована в международном научном журнале, входящем в базы данных Thompson Reuters и Scopus с импакт-фактором 6,313; 4 статьи опубликованы в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки (ККСОН) МОН РК; 5 тезисов конференции опубликованы в трудах международных конференций. Кроме того, получен патент Республики Казахстан № 34466 от 11 сентября 2020 года.

Диссертация состоит из введения, трех разделов, заключения и списка цитированной литературы. Общий объем диссертации 98 страниц.