

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc321226>

Генные технологии в доклинических исследованиях ишемического инсульта

З.З. Сафиуллов, В.А. Маркосян, Ю.А. Челышев

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Ишемический инсульт является одной из ведущих причин смерти и инвалидности во всём мире. Настоящий обзор посвящён анализу достижений в приложении генных технологий к исследованию ишемического инсульта в эксперименте.

С использованием экспериментальной ишемии мозга продолжаются исследования эффективности применения генетических конструкций с доставкой генов, кодирующих преимущественно нейротрофические и ангиогенные факторы. Прямая генная терапия доказала свою эффективность при экспериментальном ишемическом инсульте. Способ доставки генетических конструкций с целевыми генами в ишемизированный мозг с помощью клеточных носителей имеет преимущества комбинированного действия генов и трансплантируемых клеток. Исследования на моделях ишемического инсульта с клеточными носителями, сверхэкспрессирующими различные нейротрофические и ангиогенные факторы, подтверждают безопасность и эффективность данного подхода, что позволяет рассматривать клеточно-опосредованную доставку трансгенов в качестве многообещающего способа лечения инсульта.

Другая значимая область применения генных технологий, которая также затронута в обзоре, связана с опто- и хемогенетическими методами, позволившими получить новые данные по клеточным и молекулярным механизмам патогенеза ишемического инсульта.

Проведена сравнительная оценка эффективности прямого введения ряда трансгенов и их клеточно-опосредованной доставки по трём основным критериям: объёму инфаркта, плотности капилляров и двигательной активности.

Ключевые слова: ишемический инсульт; пенумбра; генная терапия; оптогенетика; хемогенетика; восстановление функции.

Для цитирования:

Сафиуллов З.З., Маркосян В.А., Челышев Ю.А. Генные технологии в доклинических исследованиях ишемического инсульта // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 1. С. 23–40. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc321226>

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc321226>

Gene technologies in ischemic stroke preclinical studies

Zufar Z. Safiullov, Vage A. Markosyan, Yuri A. Chelyshev

Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

ABSTRACT

Ischemic stroke is one of the leading death causes and disability worldwide. The review is devoted to analysis of gene technologies application achievements in ischemic stroke experimental study.

In experimental brain ischemia, genetic constructs effectiveness studies, genes, encoding predominantly neurotrophic and angiogenic factors delivery is actively pursued. Direct gene therapy has proven its effectiveness in experimental ischemic stroke. Genetic constructs delivering methods with target genes into the ischemic brain using cellular carriers has advantages because of combined action of genes and transplanted cells. Studies on ischemic stroke models with cellular carriers overexpressing various neurotrophic and angiogenic factors confirm the safety and effectiveness of this approach, which allows us to consider transgenes cell-mediated delivery as a stroke treatment promising method.

Another significant area of gene technologies application, which is also mentioned upon in the review, is related to opto- and chemogenetic methods, which allowed obtaining new data of ischemic stroke pathogenesis cellular and molecular mechanisms.

Three main criteria were used in the review: volume of infarction, capillary density and motor activity for effectiveness comparative assessment of direct administration, transgenes number and cell-mediated delivery.

Keywords: ischemic stroke; penumbra; gene therapy; optogenetics; chemogenetics; functional recovery.

To cite this article:

Safiullov ZZ, Markosyan VA, Chelyshev YuA. Gene technologies in ischemic stroke preclinical studies. *Genes & cells*. 2023;18(1):23–40. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc321226>

Received: 22.12.2022

Accepted: 07.03.2023

Published: 31.03.2023

ВВЕДЕНИЕ

Ишемический инсульт является одной из ведущих причин смерти и инвалидности во всем мире. На сегодняшний день около 9 млн пациентов страдают от цереброваскулярных заболеваний. Ежегодно в мире инсульт поражает от 5,6 до 6,6 млн пациентов, причем 4,6 млн из них погибают [1, 2]. Смертность от инсульта в РФ составляет 175 человек на 100 тыс. населения. Заболевания сердечно-сосудистой системы занимают первое место (56%) в структуре смертности населения, из них заболевания сосудов мозга стоят на втором месте (39%). В РФ смертность мужчин от данной патологии в возрасте 35–74 года в пять раз выше по сравнению с США и в девять раз выше по сравнению со странами Европы. В этих странах инсульт занимает третье место в структуре общей смертности, а в РФ — второе, уступая ишемической болезни сердца [3]. Ожидается, что вследствие демографического старения населения и отсутствия адекватного контроля за факторами риска количество пациентов с инсультом будет увеличиваться (The Global Stroke Initiative, WHO, 2004).

В то же время отмечается омоложение инсульта совместно с увеличением его распространенности у лиц трудоспособного возраста. В Российской Федерации за последние 10 лет показатели заболеваемости и смертности у лиц трудоспособного возраста возросли более чем на 30% [3]. Учитывая старение населения и потенциальные факторы риска, ожидается, что распространенность инсульта и социально-экономическое бремя, связанное с ним, возрастут. За последнее десятилетие как в профилактике, так и в терапии инсульта достигнут значительный прогресс. Однако современные методы лечения ещё не могут адекватно улучшить исходы инсульта и не отвечают стандартам персонализированной медицины [1, 3].

Инсульт наносит огромный экономический ущерб, учитывая расходы на лечение, реабилитацию пациента, а также потери в сфере производства. Стоимость стационарного лечения, реабилитации и вторичной профилактики пациента составляет 127 тыс. рублей в год. Стоимость прямых расходов из расчёта 450 тыс. случаев в год составляет 57,15 млрд рублей. Непрямые расходы, связанные с преждевременной смертностью, инвалидностью и временной нетрудоспособностью, оцениваются в 304 млрд рублей в год [3].

Снижение кровообращения в зоне инфаркта головного мозга неодинаково. Уровень мозгового кровотока в центральной зоне — ядре ишемии — минимален и недостаточен для сохранения жизнеспособности нейронов, что приводит к необратимому повреждению и гибели клеток. Периферические отделы, называемые ишемической полутенью, или пенумброй, характеризуются сниженным уровнем перфузии, но достаточным для поддержания жизнеспособности клеток в течение нескольких

часов. Эта зона потенциально обратимых патологических изменений может быть сохранена путём восстановления адекватного уровня кровообращения [1, 2]. Нарушение перфузии в течение первых двух суток приводит к набуханию нейронов, клеток нейроглии и эндотелия, развивается цитотоксический отёк [3]. Параллельно нарушается гематоэнцефалический барьер, что сопровождается отёком головного мозга, лейкоцитарной инфильтрацией и нейровоспалением. Начавшийся фагоцитоз некротизированной ткани обуславливает максимальную выраженность отёка с третьих по пятые сутки заболевания [4]. Методы медикаментозной и хирургической коррекции в этом случае недостаточно эффективны. Не существует результативного лечения ишемического инсульта, кроме тромболитической терапии, которая эффективна только в пределах узкого терапевтического окна. Активно разрабатываются другие терапевтические подходы, среди которых достаточно актуальным представляется прямое и клеточно-опосредованное введение генов. Данный обзор посвящён обобщению достижений в применении генных технологий к исследованию ишемического инсульта в эксперименте.

ПРЯМОЕ ВВЕДЕНИЕ ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ

Критерии выбора трансгенов. Нейротрофические факторы, такие как нейротрофины (фактор роста нервов, NGF), мозговой нейротрофический фактор (BDNF), нейротрофин-3 (NT-3) и глиальный нейротрофический фактор (GDNF), обладают ангиогенным действием, стимулируя миграцию, пролиферацию, дифференцировку и выживание эндотелиальных клеток [5–7]. Для нейротрофинов NGF и BDNF этот эффект также связан с усилением секреции сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) из нейральных клеток [8]. GDNF проявляет ангиогенное действие, стимулируя пролиферацию эндотелиальных клеток, что опосредуется активацией рецепторов TrkA, TrkB, GFRα1 и c-ret [6]. И наоборот, ангиогенные факторы могут оказывать прямое нейротрофическое и нейропротекторное действие. Это считается установленным для ряда типичных ангиогенных факторов, таких как VEGF [9, 10] и ангиопоэтин-1 (Ang-1) [11, 12], рецепторы которых выявлены в нейронах и их предшественниках.

Наряду с вышеупомянутыми генами, кодирующими нейротрофические и ангиогенные факторы, в экспериментах с ишемическим инсультом исследовали эффективность действия и других трансгенов. Среди них ген транскрипционного фактора нейрогенной дифференцировки 1 (NeuroD1) [13] и мезенцефалический астроцитарный нейротрофический фактор (MANF) [14].

Сложности сопоставления данных. При определении наиболее эффективного терапевтического гена

для преодоления последствий ишемического инсульта возникают сложности в сопоставлении результатов разных работ. Различие в размерах и массе животного обуславливает применение как разного объёма, так и разной концентрации вводимой генетической конструкции. Имеются также различия и в моделях эксперимента. В работах [13–40] моделирование ишемии осуществляли путём нарушения кровотока в средней мозговой, внутренней сонной или общей сонной артерии. Коллатеральное кровоснабжение блокировали перевязкой аналогичной артерии или более проксимальной на контралатеральной стороне. Для доставки целевого гена использовали различные вирусные векторы.

Различаются также и сроки введения генных конструкций: как за 1–28 сут до [15, 32], так и в интервале от 1 ч [22] до 10 сут после моделирования ишемии [13].

В различных исследованиях значительно различался также временной интервал между введением конструкции и регистрацией сдвигов.

В качестве способа доставки использовали внутри-мозговое, внутривентрикулярное или внутривенное введение. Для оценки восстановления двигательной функции применяли разные тесты, такие как «Ротарод», «Угловой тест», «Лестница», «Ходьба по балке», «Монитор активности», «Цилиндр», «Ошибочный шаг» и «Шаг». Неврологические проявления и степень тяжести инсульта оценивали также разными тестами, такими как «Шкала неврологической тяжести», «Моторная асимметрия» и «Шкала Бендерсона» [13–40].

Упомянутые различия в подходах и методике проведения эксперимента серьёзно затрудняют анализ полученных результатов по определению наиболее эффективной генетической конструкции и оптимальной методики проведения эксперимента с ишемией мозга. Мы будем рассматривать результаты всего массива исследований, распределив их по четырём срокам регистрации эффектов после моделирования ишемии, а именно: 1-е сутки, 1–7 сут [19], от 7 до 28 сут [32] и более 28 сут [31].

Выбор критериев оценки эффективности доставки целевых генов. Количество показателей, по которым в известных работах [13–40] оценивают эффективность доставки генетических конструкций для преодоления последствий ишемии, достаточно велико. Из них наиболее значимыми представляются плотность капилляров, состояние нейрососудистых единиц, гибель нейронов, нейропластичность и коммуникация нейронов, активность микроглии и нейровоспаление, инфильтрация ткани мозга воспалительными клетками и фагоцитами. Для оценки эффективности прямого введения генов на каждом из выбранных нами сроков эксперимента мы ограничимся рассмотрением следующих показателей: объём очага инфаркта, плотность капилляров в пенумбре, гибель нейронов и клеток других типов, двигательная активность.

Вирусные векторы. В исследованиях с доставкой целевых генов на моделях ишемического инсульта

применяли различные вирусные векторы. Среди них аденовирус (AV) [19, 27], адено-ассоциированный вирус (AAV) [18, 20, 24, 36], лентивирус (LV) [17, 31], вирус простого герпеса (HSV) [37], японский гемагглютинирующий вирус (HVJ) [25] и вирус сендай (SeV) [26, 28]. В обзоре рассмотрены эффекты целевых генов, введённых только с помощью вирусных векторов, и не затронуты другие способы доставки генов при экспериментальном ишемическом инсульте, включающие плазмиды, липосомы и наносистемы.

Объём инфаркта. В пределах первых суток после моделирования ишемии у крысы наилучшие результаты были получены при введении LV-Ang-1 за сутки до моделирования. При этом объём инфаркта уменьшился на 41% [15]. Однако при введении генетической конструкции AAV-NT-3 через сутки после моделирования наблюдали снижение объёма лишь на 7% [16].

В течение первой недели после моделирования ишемии наиболее эффективной оказалась конструкция LV-VEGF, при этом объём инфаркта уменьшился на 62% [17]. В данном исследовании генетическую конструкцию вводили через 2 ч после моделирования, в то время как в других исследованиях — в промежутке от 3 сут (AAV-VEGF) [18] до 14 сут (AV-BDNF) [19] до моделирования, но при этом эффективность была ниже. Кроме того, в исследованиях с одним и тем же целевым геном при введении конструкции в большей концентрации и за 7 сут до моделирования ишемии [20] получено в два раза более выраженное снижение объёма инфаркта — на 34%. При введении AAV-MANF в меньшей концентрации через 2 сут после инсульта [21] объём инфаркта уменьшался только на 18%. При сравнении вводимых вирусных векторов, кодирующих *veg*f, применение AAV оказалось менее эффективным, чем при использовании LV [18].

На сроке от 7 до 28 сут после моделирования ишемии конструкция LV-Ang-1 проявила себя как наиболее эффективная [15]. При этом объём инфаркта снизился на 83%. На данном сроке при доставке большинства целевых генов отмечено снижение объёма инфаркта менее чем на половину. После введения векторов LV-Ang-1, AAV-VEGF, AAV-NTN-1 (нетрин-1), AAV-APN (адипонектин) объём инфаркта снижался более чем на 50%. Среди них выделяются конструкция AAV-VEGF, обусловившая уменьшение этого показателя на 77% [22], и с наибольшим эффектом — конструкция LV-Ang-1 [15].

На сроке от 28 сут после моделирования ишемии по критерию уменьшения объёма инфаркта наиболее эффективным было введение AAV-NeuroD1, что снижало объём очага на 56% [13]. В этом исследовании AAV-NeuroD1 вводили на 10-е сутки после моделирования ишемии, т.е. позднее, чем в аналогичных исследованиях с другими генами, и концентрация вводимых вирусных частиц, несущих данный ген, была на два порядка выше, чем в других работах.

Плотность капилляров. В течение первой недели после моделирования ишемии увеличению плотности капилляров лучшим образом способствовало введение LV-Ang-1. Зафиксировано увеличение данного показателя на 69% [15]. На более позднем сроке — от 7 до 28 сут — наилучшие результаты были получены при введении AAV-VEGF. При этом плотность капилляров увеличивалась на 86% [23]. На сроке более 28 сут после моделирования наибольшее увеличение (на 55%) плотности капилляров в пенумбре зафиксировано при введении AAV-NTN-1 [24].

Выживаемость нейронов и клеток других типов. На сроке 1 сут после моделирования ишемии у крысы наиболее эффективной оказалась доставка HVJ-HGF (фактора роста гепатоцитов) за 5 сут до моделирования, что способствовало увеличению выживаемости клеток в пенумбре на 80% [25]. Выживаемость нейронов оценивали на мышах. Наилучшие результаты были получены при введении SeV-GDNF и SeV-NGF: выживаемость клеток возрастала на 86% при введении конструкции в первые часы после моделирования [26]. Однако в другом исследовании при введении AV-GDNF за неделю до инсульта отмечено увеличение выживаемости нейронов только на 20% [27]. Вероятно, более высокие показатели выживаемости нейронов обусловлены доставкой *gdnf* с использованием SeV-вектора.

На сроке от 1 до 28 сут после моделирования ишемии в большинстве случаев оценивали выживаемость именно нейронов, и преимущественно на мышах. Наиболее эффективным было введение SeV-GDNF и SeV-NGF, при этом выживаемость нейронов увеличивалась на 93 и 94% соответственно как на 6-е сутки, так и на 28-е сутки после моделирования инсульта [26]. Обращает на себя внимание следующий факт: так же, как и в вышеупомянутых исследованиях на других сроках, этот позитивный результат получен в условиях применения SeV-вектора. Кроме того, даже при разной концентрации вводимых вирусных частиц, а именно 5×10^6 pfu [26] и 1×10^9 pfu [28], показатель увеличения выживаемости нейронов остаётся одинаково высоким — 93%. Выживаемость нейронов при введении AV-SDF-1 (фактора стромальных клеток 1), AAV-BDNF и LV-GDNF оказалась примерно одинаковой и достигала соответственно 62% [29], 60% [30] и 60% [31].

На сроке более 28 сут после моделирования ишемии показатель увеличения выживаемости нейронов не различался как при введении AAV-BDNF [32], так и при использовании AAV-NeuroD1 [13] и составил 63%. Стоит отметить, что превентивная доставка гена *bdnf* в концентрации 10^{10} pfu за 35 сут до моделирования ишемии у крысы оказала такое же действие, как и введение AAV-NeuroD1 через 10 сут после моделирования инсульта у мыши, но в более высокой концентрации — $1,6 \times 10^{12}$.

Двигательная активность. На модели ишемического инсульта для анализа двигательной активности

используют ряд тестов. Среди них «Шкала неврологической тяжести», «Угловой тест», «Ротарод», «Лестница», «Ходьба по балке», «Монитор активности», «Цилиндр», «Шкала Бендерсона», «Ошибочный шаг» и «Шаг». В этом перечне первые четыре теста являются наиболее информативными, так как с их помощью проведён детальный сравнительный анализ эффективности восстановления двигательной активности после введения различных конструкций, кодирующих от четырёх до семи целевых генов. Поэтому для выявления наиболее эффективной генетической конструкции мы руководствовались в первую очередь результатами этих тестов.

В течение суток после моделирования ишемии наилучший показатель по «Шкале неврологической тяжести» был выявлен с применением LV-Ang-1, при этом активность опытных животных была выше на 36% [15]. Однако стоит отметить, что в данном случае рекомбинантный вектор вводили в концентрации на 1–3 порядка больше, чем в других экспериментах. Кроме того, LV-Ang-1 вводили за сутки до моделирования ишемии, что имело более выраженный эффект, чем за 10 сут до инсульта. По данным «Углового теста» результаты введения AV-BDNF [19] оказались более действенными по сравнению с LV-Ang-1 [15]. При введении AV-BDNF зафиксирована в два раза более высокая активность животных. При этом концентрация вводимого AV-BDNF была в 3,5 раза выше, а введение целевого гена выполнено за 7 сут, в то время как LV-Ang-1 вводили за сутки до моделирования ишемии. По представленным выше результатам можно сделать вывод о том, что лучшему восстановлению двигательной активности в первые сутки после моделирования ишемии способствует не столько превентивное введение генетической конструкции, сколько высокая концентрация вводимых вирусных векторов.

На сроке от 1 до 28 сут результаты следующих двух тестов оценены по неделям. По данным «Шкалы неврологической тяжести» на первой неделе наилучший результат был получен при введении AAV-NTN-1 — улучшение показателя на 41% [33]. Отмечено, что данную конструкцию вводили в большей концентрации, чем другие генетические конструкции. Кроме того, профилактическое введение AAV-BDNF за 35 сут до моделирования ишемии [32] менее эффективно восстанавливало двигательную активность, чем введение AAV-NTN-1 за 5 сут [33]. В дальнейшем на сроке от 1 нед до 1 мес эффективность восстановления двигательной активности после введения AAV-NTN-1 снижается. При одинаковых условиях в период от 1 нед до 1 мес в результате введения AAV-APN двигательная активность восстановилась на 45% [14].

Результаты «Углового теста» в первые 7 сут указывают на большую эффективность введения AV-BDNF: двигательная активность при этом возросла на 19% [19], а в период от 1 нед до 1 мес при введении AAV-APN она

увеличилась на 29% [14]. С помощью этого теста проанализированы результаты, полученные при введении вирусной конструкции мышам в одинаковом объеме за 7 сут до моделирования ишемии.

На сроке от 7 до 28 сут для восстановления двигательной активности наиболее эффективным оказалось введение AAV-APN, что было выявлено в ходе проведения тестов «Шкала неврологической тяжести» и «Угловой тест».

Результаты следующих тестов с контролем двигательной активности включают данные, полученные в интервале 1–28 сут. По данным теста «Ротарод», наиболее эффективными были результаты введения AAV-NTN-1, при этом зафиксировано увеличение двигательной активности на 45% [33]. Результаты данного теста получены после введения генетической конструкции мышам за 7 сут до моделирования ишемии. Однако введение той же конструкции AAV-NTN-1, но в большей концентрации, оказалось менее эффективным [34].

По данным теста «Лестница», конструкция AAV-NeuroD1 показала лучшие результаты восстановления двигательной активности — увеличение показателя на 50% [13]. Стоит отметить, что генетическую конструкцию вводили через 10 сут после моделирования ишемии в высокой концентрации — 10^{12} , в то время как другие конструкции вводили до моделирования и в меньшей концентрации. По данным этого теста, лучший результат обусловлен как введением гена *neurod1*, так и большой концентрацией вирусной конструкции.

По результатам теста «Ходьба по балке», вектор AAV-IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста 1) обладал наибольшей эффективностью и способствовал восстановлению на 56% [35]. В этой работе введение AAV-IGF-1 было более ранним — за 21 сут до моделирования ишемии, в то время как в других работах конструкцию вводили за 7 сут до моделирования. Это позволяет предполагать, что влияние конкретных трансгенов на восстановление двигательной активности может зависеть от временного интервала между их введением и моделированием ишемии.

Тест «Монитор активности» характеризует конструкцию AAV-BDNF как достаточно эффективную с увеличением показателя двигательной активности на 46% [36]. Нами отмечено, что AAV-BDNF ввели на неделю раньше, чем другие конструкции. Результаты этого теста при введении HSV в качестве платформы для доставки целевых генов показали меньшую эффективность [37].

Результаты теста «Цилиндр» демонстрируют преимущество введения AAV-MANF — улучшение двигательной активности на 31% [21]. При этом генетическую конструкцию вводили в большой концентрации и раньше, чем другие конструкции.

По данным теста «Моторная асимметрия», лучший результат был получен при введении AAV-IGF-1: активность животных восстанавливалась на 50% [35]. В данном

случае AAV-IGF-1 вводили на 2 нед раньше, чем другие генетические конструкции.

По данным «шкалы Бендерсона», при введении LV-VEGF отмечено восстановление активности на 70% [17]. Отличительной особенностью опыта применения данного теста является то, что наибольшие значения показателя восстановления двигательной функции были получены в условиях использования LV, в то время как в работах с применением других двигательных тестов лучший результат зарегистрирован при введении конструкций на основе AAV-вектора.

Результаты теста «Ошибочный шаг» свидетельствуют о большей эффективности введения AV-BDNF, при этом отмечено восстановление двигательной активности на 41% [19]. Близкий к этому результат получен при введении AAV-NT-3 — восстановление активности на 40%. При этом AAV-NT-3 вводили на неделю позднее, но в концентрации на порядок выше. Поэтому по результатам данного теста невозможно однозначно утверждать, что введение AV-BDNF более эффективно.

По результатам теста «Шаг», наилучшие показатели восстановления двигательной активности отмечены при введении AAV-BDNF (активность животных восстановилась на 35%) [32]. Этот результат обусловлен введением конструкции в более высокой концентрации и на неделю раньше, чем в работах с введением других генетических конструкций.

На сроке более 28 сут после моделирования ишемии, по данным теста «Цилиндр», результаты введения AAV-NeuroD1 демонстрируют наибольшую эффективность, чем при введении других целевых генов, — увеличение активности животных на 25% [13]. При этом AAV-NeuroD1 вводили в концентрации на два порядка больше, чем при использовании других конструкций. В тесте «Моторная асимметрия» наиболее эффективным оказалось введение AAV-NTN-1. Активность животных после доставки этого гена возрастала на 50% [24]. В данном случае концентрация вирусного вектора была на три порядка выше, чем при введении других генетических конструкций. Однако по тесту «Ошибочный шаг» получен неоднозначный результат. При введении крысам AAV-NT-3 в меньшей концентрации, а именно 10^{10} pfu, отмечено увеличение активности на 44% [16]. А при введении мышам AAV-NeuroD1 в большей концентрации (10^{12} pfu) активность возрастала только на 23% [13]. По данным теста «Ротарод», наиболее выраженное восстановление активности отмечено при введении AV-SDF-1 (двигательная активность возросла на 27%) [29]. В этой работе крысам вводили конструкцию в меньшей концентрации (2×10^6 pfu) и получили более высокие показатели активности, чем при введении мышам LV-GDNF в концентрации 10^8 pfu, когда активность возрастала на 25% [31].

Таким образом, анализ результатов поведенческих тестов показал разную эффективность введения

генетических конструкций с разными генами. Наибольший эффект в восстановлении двигательной активности животных отмечен при введении генов *bdnf*, *ntn-1* и *apn*. Среди вирусных векторов наиболее позитивно проявил себя AAV.

Введение двух целевых генов. Сочетанное введение двух рекомбинантных векторов AAV-VEGF и AAV-Ang-1 снижало объём инфаркта на 42% и оказалось более эффективным, чем введение каждой конструкции по отдельности: использование генетической конструкции AAV-VEGF или AAV-Ang-1 снижало объём инфаркта на 25 и 23% соответственно [23]. Результаты введения рекомбинантного вектора с двумя трансгенами AV-VEGF-SDF-1 показывают меньшую эффективность: объём инфаркта уменьшался только на 17% на 28-е сутки после моделирования ишемии [38]. На том же сроке был получен результат при введении AAV-VEGF. В аналогичных условиях эксперимента к 21-м суткам после моделирования ишемии объём инфаркта уменьшался на 77% [22]. Введение AV-SDF-1 уменьшало объём инфаркта на 39%, однако этот результат был получен на вторые сутки после моделирования ишемии [29].

По показателю плотности капилляров в пенумбре сочетанное введение двух рекомбинантных векторов AAV-VEGF и AAV-Ang-1 было менее эффективным, чем введение только AAV-VEGF. Зафиксировано увеличение плотности капилляров на 83% при сочетанном введении двух генов *veg*f и *ang-1*. Если введение AAV-VEGF обеспечивало увеличение показателя плотности капилляров на 86%, то введение AAV-Ang-1 приводило к увеличению этого показателя лишь на 50% [23]. Более эффективно плотность капилляров возрастает при введении AV-VEGF-SDF-1 по сравнению с AAV-VEGF. Введение данной конструкции способствовало увеличению плотности капилляров на 45% [38]. Близкий результат получен при введении AAV-VEGF, когда плотность капилляров увеличивалась на 43% [39].

Двигательную активность при помощи теста «Шкала неврологической тяжести» оценивали при введении рекомбинантного AV-вектора с двумя трансгенами AV-VEGF-SDF-1 в сравнении с результатами, полученными при введении *veg*f и *sdf-1* по отдельности. Результаты сочетанного введения двух трансгенов к 28-м суткам оказали более выраженный позитивный эффект. При этом двигательная активность возрастала на 50% [38], а при введении AAV-VEGF — на 40% [29], AV-SDF-1 — на 44% [22]. Статистически значимых различий между полученными результатами не обнаружено.

Введение трёх целевых генов. Нами выполнено введение сразу трёх генетических конструкций на основе аденовируса с генами *veg*f165, *gdn*f и нейральной молекулы клеточной адгезии (*ncam*) [40]. На 21-е сутки после моделирования ишемии отмечено снижение объёма инфаркта на 92%, что превосходило результаты введения одного или двух целевых генов.

Таким образом, исследования показывают, что при прямом введении генетических конструкций различные трансгены по-разному влияют на конкретные морфофункциональные показатели, характеризующие эффективность постишемической репарации нейральных структур и сосудистого русла. Результаты по снижению объёма инфаркта, выживаемости нейронов и увеличению плотности капилляров, полученные в течение первых суток после моделирования инсульта и в период 1–28 сут, оказались практически одинаковыми. Наиболее эффективно объём инфаркта уменьшается после введения генов *ang-1* и *veg*f, а введение *veg*f эффективнее других целевых генов способствует увеличению плотности капиллярной сети в зоне пенумбры. Выживаемость нейронов оказалась наибольшей при введении конструкций, кодирующих *ntn-1* и *bdnf*. Двигательная активность (по данным, полученным в течение первой недели после моделирования ишемии) наиболее эффективно восстанавливается в результате введения конструкций, кодирующих *ntn-1* и *bdnf*. А на более позднем сроке, по результатам всех двигательных тестов, проведённых в период 7–28 сут после моделирования ишемии, наиболее эффективным оказалось введение *apn*. На отдалённом сроке (более 28 сут) наиболее эффективным по большинству показателей (снижение объёма инфаркта, выживаемость нейронов, двигательная активность) является *neurod1*. Поэтому в первые сутки после возникновения ишемии для снижения негативных последствий представляется целесообразным введение генов *veg*f, *ang-1*, *gdn*f и *bdnf*. На более поздних сроках, когда острое воспаление снято и возникает необходимость в коррекции моторных нарушений, наибольший эффект могут оказать генетические конструкции, несущие *neurod1* и *apn*. Отмечено, что введение генетической конструкции в большой концентрации оказывается более эффективным после моделирования ишемии, по сравнению с введением конструкций в низкой концентрации до создания ишемии. Вирусные конструкции, способные нести большее количество генетического материала, зачастую оказывали более выраженный позитивный эффект. Учитывая, что ишемический инсульт является состоянием, требующим неотложной помощи, доставка генов *veg*f, *ang-1*, *gdn*f, *bdnf* или их комбинаций в высокой концентрации от 10^{10} до 10^{13} вирусных частиц с использованием LV или AAV даже в первые сутки после возникновения патологического состояния может существенно облегчить течение заболевания на начальном этапе.

КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННАЯ ДОСТАВКА ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ

Значительное количество исследований при экспериментальной ишемии мозга, наряду с прямым введением генетических конструкций с целевыми генами,

кодирующими синтез молекул, которые стимулируют ангиогенез и нейрорегенерацию, проведено с доставкой данных генов на клеточных носителях. В этих исследованиях в основном применяли рекомбинантные гены, кодирующие широко известные ангиогенные и нейротрофические факторы, а также некоторые другие биоактивные молекулы, такие как NCAM [40], *pod-gin* [41], тромбоспондин-4 [42], супероксиддисмутазу 3 (SOD3) [43] и др. Преимущества и недостатки этого подхода, по сравнению с прямым введением генетических конструкций, достаточно хорошо известны и детально проанализированы ранее [40, 44].

Как уже упоминалось в предыдущем разделе обзора с описанием результатов прямого введения генетических конструкций, методические подходы в работах с применением вирусных векторов с целевыми генами при экспериментальном ишемическом инсульте существенно различаются по многим параметрам. В данном разделе обзора к перечню упомянутых различий можно добавить применение клеток различных типов [41–59]. В целом это усложняет формирование представления о наиболее эффективном сочетании клеточного носителя конкретного типа и доставляемых целевых генов.

В качестве носителей рекомбинантных генов, тестируемых на моделях ишемического инсульта, использованы клетки различных типов [41–59]. Преимущественно это мезенхимные стволовые клетки (МСК) [41, 42, 45] из разных источников, реже — нейральные стволовые клетки (НСК) [46] и еще реже — клетки других типов. Среди них можно назвать моноклеарные клетки крови пуповины (МККП) [40], стволовые клетки пульпы зуба, стволовые клетки из амниотической жидкости, плюрипотентные стволовые клетки, астроциты и многие другие.

Преимуществами МСК являются сравнительная лёгкость получения из аутологичных тканей, амплификация и хранение в течение длительного времени. Эти клетки можно быстро изолировать с сохранением специфических иммунных свойств, и их применение не сопряжено со многими этическими проблемами. МСК обладают способностью к дифференцировке в эндотелиальные клетки и трансдифференцировке в глиальные клетки и нейроны. Благодаря своей большой пластичности МСК привлекли наибольшее внимание исследователей генетических подходов к преодолению последствий ишемического инсульта. Однако до сих пор сообщалось о клинических испытаниях фазы I и II с охватом небольшого количества пациентов и сравнительно короткой продолжительностью наблюдений [45].

Метаанализ, включающий 52 исследования [46], показал, что трансплантация НСК значительно уменьшала показатели неврологической тяжести по модифицированной шкале (mNSS) и объём церебрального инфаркта в моделях ишемического инсульта. В этой работе также получены данные о том, что лучшим источником НСК является аллогенная эмбриональная ткань. При этом

внутрибрюшинная трансплантация была наиболее эффективна, а острая фаза явилась максимально подходящим этапом данного вмешательства [46].

Несмотря на большой массив накопленных сведений, применительно к генетически модифицированным клеткам всех типов необходимы дальнейшие исследования для изучения долгосрочной безопасности и эффективности терапии.

В этих исследованиях в основном использовали аденовирусный вектор (примерно три четверти работ), реже — HSV, LV и ретровирус. Подавляющее количество работ в этом направлении осуществлено методом одномоментной трансплантации клеточных носителей с каким-то одним рекомбинантным геном [41–59].

С учётом вышеупомянутых сложностей, связанных с разнообразием методических подходов при исследовании экспериментального ишемического инсульта, определение наиболее эффективно действующего целевого гена, доставляемого на клеточном носителе, представляется крайне сложной задачей. Кажется очевидным, что выбор такого гена оказывается возможным лишь в условиях применения одной и той же экспериментальной модели. Оказалось, что подобных работ на модели ишемического инсульта на самом деле не так много. Одной из них с тестированием по отдельности наибольшего количества рекомбинантных генов явилась работа К. Kurozumi с соавт. [47], в которой на МСК из костного мозга доставляли по отдельности 4 рекомбинантных гена нейротрофических факторов (BDNF, CNTF (цилиарный нейротрофический фактор), GDNF и NT-3) при помощи AV-вектора. При этом по критерию уменьшения объёма инфаркта наиболее эффективной оказалась конструкция с GDNF, а по критерию восстановления двигательной функции — конструкция с BDNF.

Стремление обеспечивать в пенумбре гиперэкспрессию не одного, а нескольких целевых генов продиктовано общим и часто неподтверждённым представлением о том, что кодируемые этими генами продукты окажут позитивное синергическое действие, влияя на различные клетки-мишени, будь то нейральные клетки, клетки стенки сосуда или иммунные клетки, действуя через различные внутриклеточные сигнальные каскады или проявляя свою максимальную активность на разных сроках после моделирования ишемии [44]. Однако следует отметить, что исследований на модели ишемического инсульта с одновременной доставкой двух и тем более трёх рекомбинантных генов существенно меньше [40], чем с доставкой одного целевого гена [41, 42, 48]. Кроме того, в единичных работах, в которых зарегистрировано синергическое действие при доставке конструкций с двумя генами, молекулярные механизмы позитивных сдвигов остаются неясными, что указывает на актуальность продолжения исследований с целью установления молекулярных и клеточных мишеней при ишемии мозга [44].

В эксперименте с AV-опосредованной доставкой генов *bdnf* и *noggin* в стромальные клетки костного мозга с последующей их трансплантацией при ишемическом инсульте у крысы зарегистрированы выраженный нейротекторный эффект и улучшение неврологических функций [41]. На модели окклюзии средней мозговой артерии у крысы показан синергический эффект доставки генов *ngf* и *noggin* [48]. *Noggin*, антагонист морфогенетического белка кости, поддерживает нейрональную дифференцировку стволовых клеток. Трансплантация стромальных клеток костного мозга, трансдуцированных при помощи AV-вектора с генами *ngf* и *noggin*, повышала жизнеспособность клеток-носителей целевых генов в мозге, пластичность мозга, экспрессию синаптофизина и улучшала восстановление функции [48]. В рассматриваемой технологии сочетанной доставки целевых генов особенно интересной представляется работа А. Marushima с соавт. [49] по одновременной доставке генов *vegf* и *pdgf-bb* на несколько необычных клеточных носителях, а именно миоцитах, которые были трансплантированы в височную мышцу мыши с последующим её наложением на поверхность ишемизированного мозга (энцефаломиоинангиоз) для стимулирования роста коллатеральных сосудов. При этом отмечена высокая степень восстановления гемодинамики, увеличение рекрутирования перicyтов и одновременная активация астроцитов.

Для преодоления последствий ишемического инсульта в аспекте совместной доставки генов нескольких ангиогенных и нейротрофических факторов представляются интересными результаты двух исследований, выполненных в одинаковых экспериментальных условиях, с одномоментной МККП-опосредованной доставкой AV-вектора с тремя целевыми генами, кодирующими VEGF165, GDNF и NCAM [40, 50]. К концу третьей недели после моделирования ишемии было показано значительное уменьшение размеров очага инфаркта (примерно на 88%), что превышало значение этого показателя в большинстве аналогичных работ с доставкой одного или двух целевых генов, а также выраженное снижение содержания каспазы 3 (примерно на 44%). Результаты этих исследований также свидетельствуют о том, что показатель уменьшения размеров очага инфаркта при клеточно-опосредованной доставке данного сочетания целевых генов не зависит от того, когда была осуществлена трансплантация модифицированных клеток — после моделирования ишемии [40] или до неё [50]. Недавно нами было установлено положительное влияние внутривенной инфузии аутологичного обогащённого генами *vegf165*, *gdnf* и *ncam* лейкоконцентрата до и после моделирования ишемического инсульта у мини-свиней на восстановление двигательной активности животных, объём инфаркта мозга и ремоделирование перинфарктной области [44].

Как было упомянуто ранее, большинство экспериментальных исследований ишемического инсульта

с привлечением генно-клеточных технологий осуществлено с доставкой одного трансгена. В сравнении с другими ангиогенными и нейротрофическими факторами VEGF по всем анализируемым показателям выделялся резко положительно, действуя в ишемизированном мозге на клеточные мишени различных типов. Под воздействием VEGF позитивный эффект наблюдали при оценке объёма очага инфаркта, ангиогенеза и двигательной активности.

VEGF, Ang-1 и гипоксия-индуцируемый фактор 1 α (HIF1 α) поддерживали ангиогенез значительно эффективнее по сравнению с другими факторами [51–55]. Генетически модифицированные клетки активно находили область ишемии, секретировали трансгены и стремились интегрироваться в ткань мозга. При этом отмечены снижение воспалительной реакции в мозге, уменьшение объёма очага инфаркта, выраженная реваскуляризация и улучшение двигательной функции.

Рассмотрим кратко основные и наиболее значимые достижения в преодолении последствий ишемии мозга в условиях клеточно-опосредованной доставки рекомбинантного вирусного вектора с одним целевым геном по трём основным параметрам, упоминаемым практически в каждой работе по данной теме, а именно объёму инфаркта, плотности капилляров и восстановлению двигательной функции.

По показателю уменьшения объёма инфаркта лучший результат (↓79%) выявлен при введении конструкции MCK+AV-GDNF [47], близкая величина (↓76%) снижения этого показателя зафиксирована в условиях применения MCK+AV-PIGF (PIGF — плацентарный фактор роста) [56]. Практически такое же уменьшение объёма инфаркта (↓72%) выявлено при введении MCK+AV-HIF1 α [54]. Важно отметить, что при этом, как и в вышеупомянутой работе М.Е. Sokolov с соавт. [40], с сочетанной доставкой трёх трансгенов в качестве вектора использовали AV.

В условиях применения MCK, трансдуцированных AV-вектором с трансгеном нейротрофического фактора, по мере улучшения показателя, т.е. уменьшения объёма инфаркта, выстраивается следующая последовательность: CNTF-NT-3-BDNF-GDNF [47].

Данные по плотности капилляров и реваскуляризации получены в работах Т. Onda с соавт. [51] и К. Тоуата с соавт. [52], которые были выполнены в сходных условиях эксперимента, за исключением количества вводимых генетически модифицированных MCK, опосредующих доставку рекомбинантных AV-векторов, несущих Ang-1 [51] или сочетание VEGF и Ang-1 [52]. При этом в эксперименте Т. Onda с соавт. [51] показатель плотности капилляров увеличивался в 4 раза, тогда как в опытах К. Тоуата с соавт. [52], в которых вследствие применения сочетания двух трансгенов ожидалось более выраженное действие, этот показатель увеличился только на 75%, что может быть связано с введением существенно меньшего количества модифицированных MCK.

Важным показателем в оценке эффективности применения генно-клеточной конструкции при ишемическом инсульте является двигательная активность. В большинстве работ этот показатель увеличивался на 30–50%. В некоторых работах зарегистрировано более выраженное улучшение двигательной функции. Подавляющее большинство таких работ выполнено с применением МСК, трансдуцированных рекомбинантным AV-вектором. В этих исследованиях показатель двигательной активности возрастал в среднем в 2,0–3,5 раза [47, 57, 56]. Подобный позитивный результат по показателю восстановления двигательной активности получен также в условиях применения конструкции с HSV-вектором (МСК+HSV-VEGF) [58]. По мере улучшения восстановления двигательной функции в пуле исследований с этим высоким показателем можно сформировать следующий ряд: МСК+AV-GDNF [59] — МСК+AV-BDNF [57] — МСК+AV-BDNF [47] — МСК+HSV-VEGF [58] — МСК+AV-PIGF [56].

По критерию восстановления двигательной функции на одной и той же модели ишемического инсульта и в стандартных условиях эксперимента проведена сравнительная оценка эффективности доставки генов различных нейротрофических факторов с применением в качестве клеточного носителя МСК, модифицированных AV-вектором [47]. По мере увеличения эффективности восстановления двигательной функции трансгены нейротрофических факторов распределяются в следующей последовательности: CNTF-NT-3-GDNF-BDNF.

Таким образом, использование технологии клеточно-опосредованной доставки целевых генов на модели ишемического инсульта подтверждает перспективность клинического применения МСК и НСК, трансдуцированных рекомбинантными AV-векторами с трансгенами ангиогенных и нейротрофических факторов. Эти генетически модифицированные клетки, будучи трансплантированными в организм хозяина, эффективно экспрессируют данные трансгены, что поддерживает выживание самих трансплантируемых клеток в области ишемии мозга хозяина в среднем в течении 2–3 недель и обеспечивает секрецию продуктов данных трансгенов, существенно важных для восстановления нарушенных функций.

ОПТО- И ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Оптогенетический подход позволяет модулировать активность нейронов светочувствительными ионными каналами, известными как опсины, которые могут быть доставлены в нейроны определённых популяций, с помощью вирусных векторов или трансгенных технологий. В нейробиологии методы оптогенетики применяются для контроля активности и коммуникаций нейронов

конкретных типов путём введения генов, кодирующих светочувствительные белки. Оптогенетика позволяет избирательно и с высокой точностью активировать или ингибировать нейроны определённого типа. Этот подход сегодня широко применяется для повышения пластичности нейронов, что демонстрирует их потенциал в восстановлении двигательной функции при различных неврологических расстройствах [60]. Такая техника нашла применение в исследовании молекулярных и клеточных механизмов патогенеза и восстановления функции при ишемическом инсульте [61, 62].

Возможность восстановления функции при ишемическом инсульте в значительной мере связана с пластичностью нейронов и нервных связей в перинфарктной области. Активность выживших нейронов обеспечивает высвобождение факторов, которые контролируют поддержание и реконструкцию нервных связей. Можно полагать, что регулирование возбудимости нейронов позволит улучшить восстановление функции.

Активно развивающаяся оптогенетика предлагает при ишемическом инсульте наиболее эффективный способ модулирования возбудимости нейронов определённых типов с высокой точностью и надёжным пространственно-временным разрешением [61].

Методами оптогенетики показано, что даже при незначительных ишемических повреждениях снижение возбудимости нейронов является причиной выраженных нарушений двигательной функции [63]. В остром периоде ишемического инсульта отмечено снижение гемодинамического ответа на оптогенетическую стимуляцию, а региональный ответ мозгового кровотока коррелировал с расстоянием от очага ишемии [64]. При этом возбуждающая стимуляция нейронов интактной области способствует восстановлению нейроваскулярной связи, тогда как возбуждение нейронов в пенумбре не влияет на восстановление нейроваскулярной функции [64]. Эти результаты дают основание полагать, что интактная периферия пенумбры служит мишенью для возбуждающей стимуляции с целью восстановления перфузии после ишемического инсульта.

Новый подход к неврологическому восстановлению связан с оптогенетическим ингибированием активности нейронов. После ишемического инсульта оптогенетическое ингибирование ГАМКергических нейронов повышало экспрессию FGF2 эндотелиальными клетками и способствовало восстановлению нейроповеденческих реакций, возможно опосредуемому астроцитами [65].

Восстановление двигательной функции после ишемического инсульта связано с динамическими процессами перестройки нервных связей. При ишемическом инсульте различные нейромодулирующие подходы, которые сочетают прямые стимулирующие воздействия с поведенческими тренингами, значительно варьируют по своей эффективности из-за неспецифической активации или ингибирования нейронов. Оптогенетический

подход позволил идентифицировать или уточнить локализацию областей головного мозга и нейронных сетей, которые значимы для восстановления двигательной функции после ишемического инсульта [60].

Метод оптогенетики также даёт возможность изучить и усилить терапию клеточной трансплантацией. На модели ишемического инсульта у трансгенных мышей, экспрессирующих каналородопсин 2 (активируемую светом молекулу катионного канала), оптогенетическое избирательное повышение активности нейронов в первичной двигательной коре улучшало мозговой кровоток и показатели функциональных тестов [66].

Лазерное облучение в ишемизированной области мозга крысы трансплантированных НСК, предварительно трансдуцированных геном каналородопсина 2, обусловило улучшение двигательной функции вследствие увеличения экспрессии молекул, участвующих в нейротрансмиссии, дифференцировке нейронов, направленном росте аксонов и синаптической пластичности [67].

Избирательное возбуждение трансплантированных индуцированных нейральных клеток-предшественников, полученных из плюрипотентных стволовых клеток (iPS-NPC), обеспечивает регенеративные преимущества для преодоления последствий ишемического инсульта [68]. После трансплантации в ишемизированную кору мышей нетрансдуцированные iPS-NPC дифференцируются в зрелые нейроны, которые формируют синаптические контакты с нейронами хозяина. iPS-NPC мыши трансдуцировали геном гибридного белка люцинопина 3 (LM03), который включал последовательности биолуминесцентной люциферазы, люциферазы *Gaussia* и опсина *Volvox* каналородопсина 1. Трансдуцированные LM03-iPS-NPC активировали путём фотостимуляции или субстратом люциферазы люциферин (коэлюцентеразин). Такое стимулирование iPS-NPC *in vitro* увеличивало в них экспрессию синапсина-1, молекулы постсинаптической плотности 95 (PSD95), BDNF и SDF-1 и усиливало рост аксонов. Стимулирование трансплантированных клеток путём ежедневного интраназального введения субстрата люциферазы люциферина (коэлюцентеразина) усиливало миелинизацию аксонов, синаптическую передачу, улучшало состояние таламокортикальных связей и восстановление нервных функций. Комбинированная оптохемогенетическая терапия обеспечила усиление нервных связей в перинфарктной области [68].

Хемогенетический подход предполагает модуляцию электрической активности нейронов с помощью дизайнерских лигандов, которые активируют сконструированные функциональные рецепторные комплексы (модифицированные рецепторы, связанные с G-белком), предварительно доставленные нейронам выбранных популяций (обычно при помощи вирусной трансдукции). Сконструированные рецепторы, которые встраиваются в мембрану нейронов, можно активировать исключительно дизайнерскими агонистами, как правило малыми

молекулами, но не их эндогенными лигандами, что так же, как и в случае нативных рецепторов, активирует те же внутриклеточные каскады с аналогичными реакциями электрогенеза. Хемогенетическая технология нашла широкое применение для избирательной активации *in vivo* нейронов различных популяций, например возбуждающих и тормозных, которые экспрессируют различные типы m-холинорецепторов, связанных с G-белком: соответственно m3 и m4.

На модели ишемического инсульта у трансгенных мышей с мутантным геном m4-холинорецептора человека хемогенетическое ингибирование нейронов в первичной двигательной коре в остром периоде замедляет повреждение ткани мозга и значительно улучшает двигательную функцию [69]. Ранее при хемогенетической селективной активации глутаматергических нейронов в первичной двигательной коре крысы с привлечением многих тестов было показано значительное улучшение двигательной функции после ишемического инсульта [70], что может иметь значение для понимания механизмов восстановления функции, связанных со стимуляцией двигательной коры.

Стимулирование возбудимости нейронов повышает двигательную активность после инсульта. цАМФ-ответный элемент-связывающий белок (CREB) является транскрипционным фактором, играющим ключевую роль в возбудимости нейронов. Исследования с применением хемогенетической методики показывают, что CREB служит центральным молекулярным узлом в восстановлении нервных связей и преодолении двигательных нарушений при ишемическом инсульте. Повышение концентрации CREB с помощью вирусного вектора в небольшом пуле мотонейронов улучшает восстановление движений после инсульта, в то время как блокирование передачи сигналов CREB предотвращает восстановление после инсульта [71]. Ингибирование CREB-трансфицированных нейронов в ишемической пенумбре с помощью hM4Di-DREADD блокирует восстановление моторики. hM4Di-DREAD — hM4Di представляет собой модифицированную форму мускаринового рецептора M4 человека (hM4) как разновидность дизайнерских рецепторов, активируемых исключительно дизайнерскими препаратами (DREADD, Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs). Через этот рецепторный вход реализуется ингибирующее влияние на активность нейронов. Трансфекция гена CREB вызывает образование новых соматосенсорных и двигательных связей.

Заклучая раздел о применении опто- и хемогенетических подходов для анализа механизмов патогенеза ишемического инсульта, следует отметить их высокую пространственную точность и информативность в доклинических исследованиях. Несмотря на это, данные подходы по ряду причин не рассматриваются как клинически приложимые при неврологических нарушениях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генные технологии широко применяются в разработке эффективных подходов к преодолению последствий ишемии мозга. Доставка целевых генов — перспективное направление в терапии экспериментального ишемического инсульта. Получены обнадеживающие результаты в исследованиях с прямым введением генетических конструкций преимущественно на основе вирусных векторов. Однако, хотя прямая генная терапия доказала свою эффективность при экспериментальном инсульте, она имеет и недостатки: трудности доставки терапевтических генов в мозг, низкую эффективность трансдукции клеток хозяина и токсическое действие вирусов, что в целом ограничивает трансляцию достижений этого метода в клиническую практику.

Способ доставки генетических конструкций с целевыми генами в ишемизированный мозг с помощью клеточных носителей имеет преимущества позитивного комбинированного действия генов и стволовых клеток и лишён недостатков прямого введения генов. Недавние исследования на моделях ишемического инсульта с клеточными носителями, сверхэкспрессирующими различные нейротрофические и ангиогенные факторы, подтверждают безопасность и эффективность данного подхода, что позволяет рассматривать клеточно-опосредованную доставку трансгенов в качестве многообещающего метода лечения инсульта. Сложные патологические изменения в повреждённой ткани головного мозга, включая воспалительную реакцию, окислительный стресс и гибель нейтральных клеток, приводят к тяжёлой неврологической дисфункции. В контексте трансплантации клеток ишемическая и гипоксическая микросреда в области повреждения ограничивает эффективность проявления их позитивных свойств. Поэтому актуальным и перспективным направлением развития метода клеточно-опосредованной доставки генов может быть генетическая модификация клеточных носителей не только как платформы для доставки генов нейротрофических и ангиогенных факторов, но и как способа улучшения интеграции трансплантируемых клеток в ткань мозга хозяина, их выживаемости и взаимодействия с нейтральными и иммунными клетками. Другое перспективное направление в генно-клеточных технологиях связано с применением экзосом, полученных из генетически модифицированных клеток.

В проблеме доставки целевых генов на клеточных носителях остаётся много нерешённых вопросов и возможностей для улучшения. Здесь важно подобрать лучшую комбинацию изменяемых параметров, таких как вектор, конкретный трансген или эффективное сочетание нескольких трансгенов, тип и количество трансплантируемых клеток и многие другие. Вместе с тем представляется важным определить оптимальный временной интервал между моделированием ишемии и введением клеток, которые могут проявлять разный

по выраженности лечебный эффект в разные сроки после инсульта (от острого до подострого и хронического).

Из генетических подходов в исследовании клеточных и молекулярных механизмов патогенеза ишемического инсульта на доклиническом этапе можно упомянуть о значимых результатах применения опто- и хемогенетических методов анализа, которые характеризуются высокой пространственной точностью и информативностью.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Научное исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-10030).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: З.З. Сафиуллов — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников по первой главе «Прямое введение целевых генов», написание текста и редактирование статьи; В.А. Маркосян — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников по второй главе «Клеточно-опосредованная доставка целевых генов», подготовка и написание текста статьи; Ю.А. Челышев — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников по третьей главе «Опто- и хемогенетические методы в исследовании ишемического инсульта», написание текста и редактирование статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This work was supported by the Russian Science Foundation (grant N 19-75-10030).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to concept development, article research and preparation, read and approved the final version before publication). The greatest contribution is distributed as follows: Z.Z. Safiullova — literature review, literary sources collection and analysis of the first chapter "Direct target genes delivery", writing and editing the article; V.A. Markosyan — literature review, literary sources collection and analysis of the second chapter "Cell-mediated target genes delivery", preparation and writing of the text articles; Yu.A. Chelyshev — literature review, literature sources collection and analysis of the third chapter of "Opto- and chemogenetic methods in ischemic stroke study", writing and editing the article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heiss W.D. Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man // *J Cerebr Blood Flow Metab.* 2000. Vol. 20, N 9. P. 1276–1217. doi: 10.1097/00004647-200009000-00002
2. Hossmann K.A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia // *Ann Neurol.* 1994. Vol. 36, N 4. P. 557–558. doi: 10.1002/ana.410360404
3. Корниенко В.Н., Пронин И.Н. Диагностическая нейрорадиология. Т. 1. 2008.
4. Kidwell C.S., Alger J.R., Saver J.L. Evolving paradigms in neuroimaging of the ischemic penumbra // *Stroke.* 2004. Vol. 35, N 11 (suppl. 1). P. 2662–2665. doi: 10.1161/01.STR.0000143222.13069.70
5. Cristofaro B., Stone O.A., Caporali A., et al. Neurotrophin-3 is a novel angiogenic factor capable of therapeutic neovascularization in a mouse model of limb ischemia // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010. Vol. 30, N 6. P. 1143–1147. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.205468
6. Blais M., Lévesque P., Bellenfant S., Berthod F. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and glial-derived neurotrophic factor enhance angiogenesis in a tissue-engineered in vitro model // *Tissue Eng.* 2013. Vol. 19, N 15-16. P. 1655–1659. doi: 10.1089/ten.tea.2012.0745
7. Zhang R., Lu Y., Li J., et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induced the differentiation of amniotic fluid-derived stem cells into vascular endothelial-like cells in vitro // *J Mol Histol.* 2016. Vol. 47, N 1. P. 9–19. doi: 10.1007/s10735-015-9649-9
8. Nakamura K., Tan F., Li Z., Thiele C.J. NGF activation of TrkA induces vascular endothelial growth factor expression via induction of hypoxia-inducible factor-1 α // *Mol Cell Neurosci.* 2011. Vol. 46, N 2. P. 498–506. doi: 10.1016/j.mcn.2010.12.002
9. Wittko-Schneider I.M., Schneider F.T., Plate K.H. Brain homeostasis: VEGF receptor 1 and 2 — two unequal brothers in mind // *Cell Mol Life Sci.* 2013. Vol. 70, N 10. P. 1705–1725. doi: 10.1007/s00018-013-1279-3
10. Sarkar J., Luo Y., Zhou Q., et al. VEGF receptor heterodimers and homodimers are differentially expressed in neuronal and endothelial cell types // *PLoS One.* 2022. Vol. 17, N 7. P. e0269818. doi: 10.1371/journal.pone.0269818
11. Rosa A.I., Gonsalves J., Cortes L., et al. The angiogenic factor angiopoietin-1 is a proneurogenic peptide on subventricular zone stem/progenitor cells // *J Neurosci.* 2010. Vol. 30, N 13. P. 4573–4577. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5597-09.2010
12. Luck R., Karakatsani A., Shah B., et al. The angiopoietin-Tie2 pathway regulates Purkinje cell dendritic morphogenesis in a cell-autonomous manner // *Cell Rep.* 2021. Vol. 36, N 7. P. 109522. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109522
13. Chen Y.C., Ma N.X., Pei Z.F., et al. A NeuroD1 AAV-based gene therapy for functional brain repair after ischemic injury through in vivo astrocyte-to-neuron conversion // *Mol Ther.* 2020. Vol. 28, N 1. P. 217–234. doi: 10.1016/j.jymthe.2019.09.003
14. Miao J., Shen L.T., Tang Y.H., et al. Overexpression of adiponectin improves neurobehavioral outcomes after focal cerebral ischemia in aged mice // *CNS Neurosci Ther.* 2013. Vol. 19, N 12. P. 969–977. doi: 10.1111/cns.12198
15. Meng Z., Li M., He Q., et al. Ectopic expression of human adiponectin-1 promotes functional recovery and neurogenesis after local cerebral ischemia // *Neuroscience.* 2014. Vol. 267. P. 135–146. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.02.036
16. Duricki D.A., Hutson T.H., Kathe C., et al. Delayed intramuscular human neurotrophin-3 improves recovery in adult and elderly rats after stroke // *Brain.* 2016. Vol. 139(Pt 1). P. 259–275. doi: 10.1093/brain/awv341
17. Zhang J., Li X., Chai S., Wang X. Neuroprotective effect of lentivirus mediated VEGF on rat model with cerebral ischemic injury // *Int J Clin Exp Med.* 2015. Vol. 8, N 3. P. 4094–4100.
18. Shen F., Su H., Fan Y., et al. Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia-inducible vascular endothelial growth factor gene expression attenuates ischemic brain injury after focal cerebral ischemia in mice // *Stroke.* 2006. Vol. 37, N 10. P. 2601–2606. doi: 10.1161/01.STR.0000240407.14765.e8
19. Shi Q., Zhanga P., Zhang J., et al. Adenovirus-mediated brain-derived neurotrophic factor expression regulated by hypoxia response element protects brain from injury of transient middle cerebral artery occlusion in mice // *Neurosci Lett.* 2009. Vol. 465, N 3. P. 220–225. doi: 10.1016/j.neulet.2009.08.049
20. Airavaara M., Chiocco M.J., Howard D.B., et al. Widespread cortical expression of MANF by AAV serotype 7: localization and protection against ischemic brain injury // *Exp Neurol.* 2010. Vol. 225, N 1. P. 104–113. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.05.020
21. Matlik K., Anttila J.E., Kuan-Yin T., et al. Poststroke delivery of MANF promotes functional recovery in rats // *Sci Adv.* 2018. Vol. 4, N 5. P. eaap8957. doi: 10.1126/sciadv.aap8957
22. Liu Y., Long L., Zhang F., et al. Microneedle-mediated vascular endothelial growth factor delivery promotes angiogenesis and functional recovery after stroke // *J Control Release.* 2021. Vol. 338. P. 610–622. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.08.057
23. Shen F., Walker E.J., Jiang L., et al. Coexpression of angiopoietin-1 with VEGF increases the structural integrity of the blood-brain barrier and reduces atrophy volume // *J Cerebr Blood Flow Metab.* 2011. Vol. 31, N 12. P. 2343–2351. doi: 10.1038/jcbfm.2011.97
24. Sun H., Le T., Chang T.T., et al. AAV-mediated Netrin-1 overexpression increases peri-infarct blood vessel density and improves motor function recovery after experimental stroke // *Neurobiol Dis.* 2011. Vol. 44, N 1. P. 73–83. doi: 10.1016/j.nbd.2011.06.006
25. Shimamura M., Sato N., Oshima K., et al. Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model // *Circulation.* 2004. Vol. 109, N 3. P. 424–431. doi: 10.1161/01.CIR.0000109496.82683.49
26. Shirakura M., Inoue M., Fujikawa S., et al. Postischemic administration of Sendai virus vector carrying neurotrophic factor genes prevents delayed neuronal death in gerbils // *Gene Ther.* 2004. Vol. 11, N 9. P. 784–790. doi: 10.1038/sj.gt.3302224
27. Hermann D.M., Kilic E., Kügler S., et al. Adenovirus-mediated GDNF and CNTF pretreatment protects against striatal injury following transient middle cerebral artery occlusion in mice // *Neurobiol Dis.* 2001. Vol. 8, N 4. P. 655–666. doi: 10.1006/nbdi.2001.0399
28. Shirakura M., Fukumura M., Inoue M., et al. Sendai virus vector-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents delayed neuronal death after transient global ischemia in gerbils // *Exp Anim.* 2003. Vol. 52, N 2. P. 119–127. doi: 10.1538/expanim.52.119
29. Yoo J., Seo J.J., Eom J.H., et al. Effects of stromal cell-derived factor 1 delivered at different phases of transient focal

- ischemia in rats // *Neuroscience*. 2012. Vol. 209. P. 171–186. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.02.031
30. Zhang J., Yu Z., Yu Z., et al. rAAV-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor promotes neurite outgrowth and protects neurodegeneration in focal ischemic model // *Int J Clin Exp Pathol*. 2011. Vol. 4, N 5. P. 496–504.
31. Beker M., Caglayand A.B., Beker M.C., et al. Lentivirally administered glial cell line-derived neurotrophic factor promotes post-ischemic neurological recovery, brain remodeling and contralesional pyramidal tract plasticity by regulating axonal growth inhibitors and guidance proteins. *Exp Neurol*. 2020. Vol. 331. P. 113364. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113364
32. Andsberg G., Kokaia Z., Klein R.L., et al. Neuropathological and behavioral consequences of adeno-associated viral vector-mediated continuous intrastriatal neurotrophin delivery in a focal ischemia model in rats // *Neurobiol Dis*. 2002. Vol. 9, N 2. P. 187–204. doi: 10.1006/nbdi.2001.0456
33. He X., Li Y., Lu H., et al. Netrin-1 overexpression promotes white matter repairing and remodeling after focal cerebral ischemia in mic // *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013. Vol. 33, N 12. P. 1921–1927. doi: 10.1038/jcbfm.2013.150
34. Zheng M., Chen R., Chen H., et al. Netrin-1 promotes synaptic formation and axonal regeneration via JNK1/c-Jun pathway after the middle cerebral artery occlusion // *Front Cell Neurosci*. 2018. Vol. 12. P. 13. doi: 10.3389/fncel.2018.00013
35. Zhu W., Fan Y., Frenzel T., et al. Insulin growth factor-1 gene transfer enhances neurovascular remodeling and improves long-term stroke outcome in mice // *Stroke*. 2008. Vol. 39, N 4. P. 1254–1261. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.500801
36. Yu S.J., Tseng K.Y., Shen H., et al. Local administration of AAV-BDNF to subventricular zone induces functional recovery in stroke rats // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, N 12. P. e81750. doi: 10.1371/journal.pone.0081750
37. Harvey B.K., Chang C.F., Chiang Y.H., et al. HSV amplicon delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor is neuroprotective against ischemic injury // *Exp Neurol*. 2003. Vol. 183, N 1. P. 47–55. doi: 10.1016/s0014-4886(03)00080-3
38. Hu G.J., Feng Y.G., Lu W.P., et al. Effect of combined VEGF165/SDF-1 gene therapy on vascular remodeling and blood perfusion in cerebral ischemia // *J Neurosurg*. 2017. Vol. 127, N 3. P. 670–678. doi: 10.3171/2016.9.JNS161234
39. Li S.F., Meng Q.H., Yao W.C., et al. Recombinant AAV1 mediated vascular endothelial growth factor gene expression promotes angiogenesis and improves neural function: experiment with rats // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009. Vol. 89, N 3. P. 167–170.
40. Sokolov M.E., Bashirov F.V., Markosyan V.A., et al. Triple-gene therapy for stroke: a proof-of-concept in vivo study in rats // *Front Pharmacol*. 2018. Vol. 9. P. 111. doi: 10.3389/fphar.2018.00111
41. Lu H., Liu X., Zhang N., et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor and noggin-modified bone mesenchymal stem cells in focal cerebral ischemia in rats // *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016. Vol. 25, N 2. P. 410–418. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.10.013
42. Zhang Q., Zhou M., Wu X., et al. Promoting therapeutic angiogenesis of focal cerebral ischemia using thrombospondin-4 (TSP4) gene-modified bone marrow stromal cells (BMSCs) in a rat model // *J Transl Med*. 2019. Vol. 17, N 1. P. 111. doi: 10.1186/s12967-019-1845-z
43. Sun S., Gao N., Hu X., et al. SOD3 overexpression alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats // *Mol Genet Genomic Med*. 2019. Vol. 7, N 10. P. e00831. doi: 10.1002/mgg3.831
44. Safiullov Z.Z., Izmailov A.A., Sokolov M.E., et al. Autologous genetically enriched leucoconcentrate in the preventive and acute phases of stroke treatment in a mini-pig model // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14, N 10. P. 2209. doi: 10.3390/pharmaceutics14102209
45. Wang F., Tang H., Zhu J., Zhang J.H. Transplanting mesenchymal stem cells for treatment of ischemic stroke // *Cell Transplant*. 2018. Vol. 27, N 12. P. 1825–1834. doi: 10.1177/0963689718795424
46. Yang Y., Hu X., Qin Q., et al. Optimal therapeutic conditions for the neural stem cell-based management of ischemic stroke: a systematic review and network meta-analysis based on animal studies // *BMC Neurol*. 2022. Vol. 22, N 1. P. 345. doi: 10.1186/s12883-022-02875-z
47. Kurozumi K., Nakamura K., Tamiya T. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model // *Mol Ther*. 2005. Vol. 11, N 1. P. 96–104. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.09.020
48. Ding J., Cheng Y., Gao S., Chen J. Effects of nerve growth factor and Noggin-modified bone marrow stromal cells on stroke in rats // *J Neurosci Res*. 2011. Vol. 89, N 2. P. 222–230. doi: 10.1002/jnr.22535
49. Marushima A., Nieminen M., Kremenetskaia I., et al. Balanced single-vector co-delivery of VEGF/PDGF-BB improves functional collateralization in chronic cerebral ischemia // *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020. Vol. 40, N 2. P. 404–419. doi: 10.1177/0271678X18818298
50. Markosyan V., Safiullov Z., Izmailov A., et al. Preventive triple gene therapy reduces the negative consequences of ischemia-induced brain injury after modelling stroke in a rat // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, N 18. P. 6858. doi: 10.3390/ijms21186858
51. Onda T., Honmou O., Harada K., et al. Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia // *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008. Vol. 28, N 2. P. 329–340. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600527
52. Toyama K., Honmou O., Harada K., et al. Therapeutic benefits of angiogenic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia // *Exp Neurol*. 2009. Vol. 216, N 1. P. 47–55. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.11.010
53. Wu W., Chen X., Hu C., et al. Transplantation of neural stem cells expressing hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) improves behavioral recovery in a rat stroke model // *J Clin Neurosci*. 2010. Vol. 17, N 1. P. 92–95. doi: 10.1016/j.jocn.2009.03.039
54. Yang C., Liu H., Liu D. Mutant hypoxia-inducible factor 1 α modified bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate cerebral ischemia // *Int J Mol Med*. 2014;34(6):1622–1628. doi: 10.3892/ijmm.2014.1953
55. Ye Z.Z., Ye W.B., Deng Y.B., et al. HIF-1-modified BMSCs improve migration and reduce neuronal apoptosis after stroke in rats // *Chin Sci Bull*. 2013. Vol. 58. P. 3519–3528. doi: 10.1007/s11434-013-5936-6
56. Liu H., Honmou O., Harada K., et al. Neuroprotection by PIGF gene modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia // *Brain*. 2006. Vol. 129(Pt 10). P. 2734–2745. doi: 10.1093/brain/awl207
57. Nomura T., Honmou O., Harada K., et al. IV infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal

stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat // *Neuroscience*. 2005. Vol. 136, N 1. P. 161–169. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.062

58. Miki Y., Nonoguchi N., Ikeda N., et al. Vascular endothelial growth factor genetransferred bone marrow stromal cells engineered with a herpes simplex virus type 1 vector can improve neurological deficits and reduce infarction volume in rat brain ischemia // *Neurosurgery*. 2007. Vol. 61, N 3. P. 586–594. doi: 10.1227/01.NEU.0000290907.30814.42

59. Horita Y., Honmou O., Harada K., et al. Intravenous administration of glial cell line derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat // *J Neurosci Res*. 2006. Vol. 84, N 7. P. 1495–1504. doi: 10.1002/jnr.21056

60. Lu C., Wu X., Ma H., et al. Optogenetic stimulation enhanced neuronal plasticities in motor recovery after ischemic stroke // *Neural Plast*. 2019. Vol. 2019. P. 5271573. doi: 10.1155/2019/5271573

61. Cheng M.Y., Wang E.H., Steinberg G.K. Optogenetic approaches to study stroke recovery // *ACS Chem Neurosci*. 2014. Vol. 5, N 12. P. 1144–1145. doi: 10.1021/cn500216f

62. Azad T.D., Veeravagu A., Steinberg G.K. Neurorestoration after stroke // *Neurosurg Focus*. 2016. Vol. 40, N 5. P. E2. doi: 10.3171/2016.2.FOCUS15637

63. Anenberg E., Arstikaitis P., Niitsu Y., et al. Ministrokes in channelrhodopsin-2 transgenic mice reveal widespread deficits in motor output despite maintenance of cortical neuronal excitability // *J Neurosci*. 2014. Vol. 34, N 4. P. 1094–1104. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1442-13.2014

64. Bo B., Li Y., Li W., et al. Neurovascular coupling impairment in acute ischemic stroke by optogenetics and optical brain imaging //

Ann Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc. 2020. Vol. 2020. P. 3727–3730. doi: 10.1109/EMBC44109.2020.9176641

65. Jiang L., Li W., Mamtilahun M., et al. Optogenetic inhibition of striatal GABAergic neuronal activity improves outcomes after ischemic brain injury // *Stroke*. 2017. Vol. 48, N 12. P. 3375–3383. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019017

66. Cheng M.Y., Wang E.H., Woodson W.J., et al. Optogenetic neuronal stimulation promotes functional recovery after stroke // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014. Vol. 111, N 35. P. 12913–12918. doi: 10.1073/pnas.1404109111

67. Daadi M.M., Klausner J.Q., Bajar B., et al. Optogenetic stimulation of neural grafts enhances neurotransmission and downregulates the inflammatory response in experimental stroke model // *Cell Transplant*. 2016. Vol. 25, N 7. P. 1371–1380. doi: 10.3727/096368915X688533

68. Yu S.P., Tung J.K., Wei Z.Z., et al. Optochemogenetic stimulation of transplanted iPS-NPCs enhances neuronal repair and functional recovery after ischemic stroke // *J Neurosci*. 2019. Vol. 39, N 33. P. 6571–6594. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2010-18.2019

69. Wang Y.C., Galeffi F., Wang W., et al. Chemogenetics-mediated acute inhibition of excitatory neuronal activity improves stroke outcome // *Exp Neurol*. 2020. Vol. 326. P. 113206. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113206

70. Hu K.H., Li Y.A., Jia W., et al. Chemogenetic activation of glutamatergic neurons in the motor cortex promotes functional recovery after ischemic stroke in rats // *Behav Brain Res*. 2019. Vol. 359. P. 81–88. doi: 10.1016/j.bbr.2018.10.029

71. Caracciolo L., Marosi M., Mazzitelli J., et al. CREB controls cortical circuit plasticity and functional recovery after stroke // *Nat Commun*. 2018. Vol. 9, N 1. P. 2250. doi: 10.1038/s41467-018-04445-9

REFERENCES

1. Heiss WD. Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man. *J Cerebr Blood Flow Metab*. 2000;20(9):1276–1217. doi: 10.1097/00004647-200009000-00002

2. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*. 1994;36(4):557–558. doi: 10.1002/ana.410360404

3. Kornienko VN, Pronin IN. *Diagnosticheskaja nejroradiologija*. Vol. 1. 2008.

4. Kidwell CS, Alger JR, Saver JL. Evolving paradigms in neuroimaging of the ischemic penumbra. *Stroke*. 2004;35(11 suppl. 1): 2662–2665. doi: 10.1161/01.STR.0000143222.13069.70

5. Cristofaro B, Stone OA, Caporali A, et al. Neurotrophin-3 is a novel angiogenic factor capable of therapeutic neovascularization in a mouse model of limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(6):1143–1147. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.205468

6. Blais M, Lévesque P, Bellenfant S, Berthod F. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and glial-derived neurotrophic factor enhance angiogenesis in a tissue-engineered in vitro model. *Tissue Eng*. 2013;19(15-16):1655–1659. doi: 10.1089/ten.tea.2012.0745

7. Zhang R, Lu Y, Li J, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induced the differentiation of amniotic fluid-derived stem cells into vascular endothelial-like cells in vitro. *J Mol Histol*. 2016;47(1):9–19. doi: 10.1007/s10735-015-9649-9

8. Nakamura K, Tan F, Li Z, Thiele CJ. NGF activation of TrkA induces vascular endothelial growth factor expression via induction of hypoxia-inducible factor-1α. *Mol Cell Neurosci*. 2011;46(2):498–506. doi: 10.1016/j.mcn.2010.12.002

9. Wittko-Schneider IM, Schneider FT, Plate KH. Brain homeostasis: VEGF receptor 1 and 2—two unequal brothers in mind. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(10):1705–1725. doi: 10.1007/s00018-013-1279-3

10. Sarkar J, Luo Y, Zhou Q, et al. VEGF receptor heterodimers and homodimers are differentially expressed in neuronal and endothelial cell types. *PLoS One*. 2022;17(7):e0269818. doi: 10.1371/journal.pone.0269818

11. Rosa AI, Gonsalves J, Cortes L, et al. The angiogenic factor angiopoietin-1 is a proneurogenic peptide on subventricular zone stem/progenitor cells. *J Neurosci*. 2010;30(13):4573–4577. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5597-09.2010

12. Luck R, Karakatsani A, Shah B, et al. The angiopoietin-Tie2 pathway regulates Purkinje cell dendritic morphogenesis in a cell-autonomous manner. *Cell Rep*. 2021;36(7):109522. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109522

13. Chen YC, Ma NX, Pei ZF, et al. A NeuroD1 AAV-based gene therapy for functional brain repair after ischemic injury through in vivo astrocyte-to-neuron conversion. *Mol Ther*. 2020;28(1):217–234. doi: 10.1016/j.jymthe.2019.09.003

14. Miao J, Shen LT, Tang YH, et al. Overexpression of adiponectin

- improves neurobehavioral outcomes after focal cerebral ischemia in aged mice. *CNS Neurosci Ther.* 2013;19(12):969–977. doi: 10.1111/cns.12198
15. Meng Z, Li M, He Q, et al. Ectopic expression of human adiponectin-1 promotes functional recovery and neurogenesis after local cerebral ischemia. *Neuroscience.* 2014;267:135–146. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.02.036
16. Duricki DA, Hutson TH, Kathe C, et al. Delayed intramuscular human neurotrophin-3 improves recovery in adult and elderly rats after stroke. *Brain.* 2016;139(Pt 1):259–275. doi: 10.1093/brain/aww341
17. Zhang J, Li X, Chai S, Wang X. Neuroprotective effect of lentivirus mediated VEGF on rat model with cerebral ischemic injury. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(3):4094–4100.
18. Shen F, Su H, Fan Y, et al. Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia-inducible vascular endothelial growth factor gene expression attenuates ischemic brain injury after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke.* 2006;37(10):2601–2606. doi: 10.1161/01.STR.0000240407.14765.e8
19. Shi Q, Zhanga P, Zhang J, et al. Adenovirus-mediated brain-derived neurotrophic factor expression regulated by hypoxia response element protects brain from injury of transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Lett.* 2009;465(3):220–225. doi: 10.1016/j.neulet.2009.08.049
20. Airavaara M, Chiocco MJ, Howard DB, et al. Widespread cortical expression of MANF by AAV serotype 7: localization and protection against ischemic brain injury. *Exp Neurol.* 2010;225(1):104–113. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.05.020
21. Matlik K, Anttila JE, Kuan-Yin T, et al. Poststroke delivery of MANF promotes functional recovery in rats. *Sci Adv.* 2018;4(5):eaap8957. doi: 10.1126/sciadv.aap8957
22. Liu Y, Long L, Zhang F, et al. Microneedle-mediated vascular endothelial growth factor delivery promotes angiogenesis and functional recovery after stroke. *J Control Release.* 2021;338:610–622. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.08.057
23. Shen F, Walker EJ, Jiang L, et al. Coexpression of angiopoietin-1 with VEGF increases the structural integrity of the blood-brain barrier and reduces atrophy volume. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(12):2343–2351. doi: 10.1038/jcbfm.2011.97
24. Sun H, Le T, Chang TT, et al. AAV-mediated Netrin-1 overexpression increases peri-infarct blood vessel density and improves motor function recovery after experimental stroke. *Neurobiol Dis.* 2011;44(1):73–83. doi: 10.1016/j.nbd.2011.06.006
25. Shimamura M, Sato N, Oshima K, et al. Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation.* 2004;109(3):424–431. doi: 10.1161/01.CIR.0000109496.82683.49
26. Shirakura M, Inoue M, Fujikawa S, et al. Postischemic administration of Sendai virus vector carrying neurotrophic factor genes prevents delayed neuronal death in gerbils. *Gene Ther.* 2004;11(9):784–790. doi: 10.1038/sj.gt.3302224
27. Hermann DM, Kilic E, Kügler S, et al. Adenovirus-mediated GDNF and CNTF pretreatment protects against striatal injury following transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurobiol Dis.* 2001;8(4):655–666. doi: 10.1006/nbdi.2001.0399
28. Shirakura M, Fukumura M, Inoue M, et al. Sendai virus vector-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents delayed neuronal death after transient global ischemia in gerbils. *Exp Anim.* 2003;52(2):119–127. doi: 10.1538/expanim.52.119
29. Yoo J, Seo JJ, Eom JH, et al. Effects of stromal cell-derived factor 1 delivered at different phases of transient focal ischemia in rats. *Neuroscience.* 2012;209:171–186. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.02.031
30. Zhang J, Yu Z, Yu Z, et al. rAAV-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor promotes neurite outgrowth and protects neurodegeneration in focal ischemic model. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011;4(5):496–504.
31. Beker M, Caglayan AB, Beker MC, et al. Lentivirally administered glial cell line-derived neurotrophic factor promotes post-ischemic neurological recovery, brain remodeling and contralesional pyramidal tract plasticity by regulating axonal growth inhibitors and guidance proteins. *Exp Neurol.* 2020;331:113364. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113364
32. Andsberg G, Kokaia Z, Klein RL, et al. Neuropathological and behavioral consequences of adeno-associated viral vector-mediated continuous intrastriatal neurotrophin delivery in a focal ischemia model in rats. *Neurobiol Dis.* 2002;9(2):187–204. doi: 10.1006/nbdi.2001.0456
33. He X, Li Y, Lu H, et al. Netrin-1 overexpression promotes white matter repairing and remodeling after focal cerebral ischemia in mic. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(12):1921–1927. doi: 10.1038/jcbfm.2013.150
34. Zheng M, Chen R, Chen H, et al. Netrin-1 promotes synaptic formation and axonal regeneration via JNK1/c-Jun pathway after the middle cerebral artery occlusion. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:13. doi: 10.3389/fncel.2018.00013
35. Zhu W, Fan Y, Frenzel T, et al. Insulin growth factor-1 gene transfer enhances neurovascular remodeling and improves long-term stroke outcome in mice. *Stroke.* 2008;39(4):1254–1261. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.500801
36. Yu SJ, Tseng KY, Shen H, et al. Local administration of AAV-BDNF to subventricular zone induces functional recovery in stroke rats. *PLoS One.* 2013;8(12):e81750. doi: 10.1371/journal.pone.0081750
37. Harvey BK, Chang CF, Chiang YH, et al. HSV amplicon delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor is neuroprotective against ischemic injury. *Exp Neurol.* 2003;183(1):47–55. doi: 10.1016/s0014-4886(03)00080-3
38. Hu GJ, Feng YG, Lu WP, et al. Effect of combined VEGF165/SDF-1 gene therapy on vascular remodeling and blood perfusion in cerebral ischemia. *J Neurosurg.* 2017;127(3):670–678. doi: 10.3171/2016.9.JNS161234
39. Li SF, Meng QH, Yao WC, et al. Recombinant AAV1 mediated vascular endothelial growth factor gene expression promotes angiogenesis and improves neural function: experiment with rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2009;89(3):167–170.
40. Sokolov ME, Bashirov FV, Markosyan VA, et al. Triple-gene therapy for stroke: a proof-of-concept in vivo study in rats. *Front Pharmacol.* 2018;9:111. doi: 10.3389/fphar.2018.00111
41. Lu H, Liu X, Zhang N, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor and noggin-modified bone mesenchymal stem cells in focal cerebral ischemia in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016;25(2):410–418. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.10.013
42. Zhang Q, Zhou M, Wu X, et al. Promoting therapeutic angiogenesis of focal cerebral ischemia using thrombospondin-4 (TSP4) gene-

- modified bone marrow stromal cells (BMSCs) in a rat model. *J Transl Med*. 2019;17(1):111. doi: 10.1186/s12967-019-1845-z
43. Sun S, Gao N, Hu X, et al. SOD3 overexpression alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(10):e00831. doi: 10.1002/mgg3.831
44. Safiulloev ZZ, Izmailov AA, Sokolov ME, et al. Autologous genetically enriched leucoconcentrate in the preventive and acute phases of stroke treatment in a mini-pig model. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):2209. doi: 10.3390/pharmaceutics14102209
45. Wang F, Tang H, Zhu J, Zhang JH. Transplanting mesenchymal stem cells for treatment of ischemic stroke. *Cell Transplant*. 2018;27(12):1825–1834. doi: 10.1177/0963689718795424
46. Yang Y, Hu X, Qin Q, et al. Optimal therapeutic conditions for the neural stem cell-based management of ischemic stroke: a systematic review and network meta-analysis based on animal studies. *BMC Neurol*. 2022;22(1):345. doi: 10.1186/s12883-022-02875-z
47. Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther*. 2005;11(1):96–104. doi: 10.1016/j.yamthe.2004.09.020
48. Ding J, Cheng Y, Gao S, Chen J. Effects of nerve growth factor and Noggin-modified bone marrow stromal cells on stroke in rats. *J Neurosci Res*. 2011;89(2):222–230. doi: 10.1002/jnr.22535
49. Marushima A, Nieminen M, Kremenetskaia I, et al. Balanced single-vector co-delivery of VEGF/PDGF-BB improves functional collateralization in chronic cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020;40(2):404–419. doi: 10.1177/0271678X18818298
50. Markosyan V, Safiulloev Z, Izmailov A, et al. Preventive triple gene therapy reduces the negative consequences of ischemia-induced brain injury after modelling stroke in a rat. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):6858. doi: 10.3390/ijms21186858
51. Onda T, Honmou O, Harada K, et al. Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(2):329–340. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600527
52. Toyama K, Honmou O, Harada K, et al. Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 2009;216(1):47–55. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.11.010
53. Wu W, Chen X, Hu C, et al. Transplantation of neural stem cells expressing hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) improves behavioral recovery in a rat stroke model. *J Clin Neurosci*. 2010;17(1):92–95. doi: 10.1016/j.jocn.2009.03.039
54. Yang C, Liu H, Liu D. Mutant hypoxia-inducible factor 1 α modified bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate cerebral ischemia. *Int J Mol Med*. 2014;34(6):1622–1628. doi: 10.3892/ijmm.2014.1953
55. Ye ZZ, Ye WB, Deng YB, et al. HIF-1-modified BMSCs improve migration and reduce neuronal apoptosis after stroke in rats. *Chin Sci Bull*. 2013;58:3519–3528. doi: 10.1007/s11434-013-5936-6
56. Liu H, Honmou O, Harada K, et al. Neuroprotection by PlGF gene modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia. *Brain*. 2006;129(Pt 10):2734–2745. doi: 10.1093/brain/awl207
57. Nomura T, Honmou O, Harada K, et al. IV infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience*. 2005;136(1):161–169. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.062
58. Miki Y, Nonoguchi N, Ikeda N, et al. Vascular endothelial growth factor gene-transferred bone marrow stromal cells engineered with a herpes simplex virus type 1 vector can improve neurological deficits and reduce infarction volume in rat brain ischemia. *Neurosurgery*. 2007;61(3):586–594. doi: 10.1227/01.NEU.0000290907.30814.42
59. Horita Y, Honmou O, Harada K, et al. Intravenous administration of glial cell line derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat. *J Neurosci Res*. 2006;84(7):1495–1504. doi: 10.1002/jnr.21056
60. Lu C, Wu X, Ma H, et al. Optogenetic stimulation enhanced neuronal plasticities in motor recovery after ischemic stroke. *Neural Plast*. 2019;2019:5271573. doi: 10.1155/2019/5271573
61. Cheng MY, Wang EH, Steinberg GK. Optogenetic approaches to study stroke recovery. *ACS Chem Neurosci*. 2014;5(12):1144–1145. doi: 10.1021/cn500216f
62. Azad TD, Veeravagu A, Steinberg GK. Neurorestoration after stroke. *Neurosurg Focus*. 2016;40(5):E2. doi: 10.3171/2016.2.FOCUS15637
63. Anenberg E, Arstikaitis P, Niitsu Y, et al. Ministrokes in channelrhodopsin-2 transgenic mice reveal widespread deficits in motor output despite maintenance of cortical neuronal excitability. *J Neurosci*. 2014;34(4):1094–1104. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1442-13.2014
64. Bo B, Li Y, Li W, et al. Neurovascular coupling impairment in acute ischemic stroke by optogenetics and optical brain imaging. *Ann Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*. 2020;2020:3727–3730. doi: 10.1109/EMBC44109.2020.9176641
65. Jiang L, Li W, Mamtilahun M, et al. Optogenetic inhibition of striatal GABAergic neuronal activity improves outcomes after ischemic brain injury. *Stroke*. 2017;48(12):3375–3383. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019017
66. Cheng MY, Wang EH, Woodson WJ, et al. Optogenetic neuronal stimulation promotes functional recovery after stroke. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(35):12913–12918. doi: 10.1073/pnas.1404109111
67. Daadi MM, Klausner JQ, Bajar B, et al. Optogenetic stimulation of neural grafts enhances neurotransmission and downregulates the inflammatory response in experimental stroke model. *Cell Transplant*. 2016;25(7):1371–1380. doi: 10.3727/096368915X688533
68. Yu SP, Tung JK, Wei ZZ, et al. Optochemogenetic stimulation of transplanted iPS-NPCs enhances neuronal repair and functional recovery after ischemic stroke. *J Neurosci*. 2019;39(33):6571–6594. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2010-18.2019
69. Wang YC, Galeffi F, Wang W, et al. Chemogenetics-mediated acute inhibition of excitatory neuronal activity improves stroke outcome. *Exp Neurol*. 2020;326:113206. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113206
70. Hu KH, Li YA, Jia W, et al. Chemogenetic activation of glutamatergic neurons in the motor cortex promotes functional recovery after ischemic stroke in rats. *Behav Brain Res*. 2019;359:81–88. doi: 10.1016/j.bbr.2018.10.029
71. Caracciolo L, Marosi M, Mazzitelli J, et al. CREB controls cortical circuit plasticity and functional recovery after stroke. *Nat Commun*. 2018;9(1):2250. doi: 10.1038/s41467-018-04445-9

ОБ АВТОРАХ

*** Сафиуллов Зуфар Зуфарович**, канд. мед. наук;
адрес: Россия, 420012, Республика Татарстан, Казань,
ул. Бутлерова, д. 49;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4577-3448>;
eLibrary SPIN: 6987-9144;
e-mail: redblackwhite@mail.ru

Маркосян Ваге Аршалуйсович;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3789-0284>;
eLibrary SPIN: 9403-2371;
e-mail: vage.markosyan@gmail.com

Челышев Юрий Александрович, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6306-5843>;
eLibrary SPIN: 1570-0209;
e-mail: chelyshev-kzn@yandex.ru

*** Автор, ответственный за переписку / Corresponding author**

AUTHORS' INFO

*** Zufar Z. Safiulloev**, MD, Cand. Sci. (Med.);
address: 49 Butlerova street, 420012 Republic of Tatarstan,
Kazan, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4577-3448>;
eLibrary SPIN: 6987-9144;
e-mail: redblackwhite@mail.ru

Vage A. Markosyan;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3789-0284>;
eLibrary SPIN: 9403-2371;
e-mail: vage.markosyan@gmail.com

Yuri A. Chelyshev, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6306-5843>;
eLibrary SPIN: 1570-0209;
e-mail: chelyshev-kzn@yandex.ru