

*eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2009; 147 (92): 160–163. (In Russ.)]

7. Felli A., Zeidler P., Jilma B. et al. Different heparin contents in prothrombin complex concentrates may impair blood clotting in outpatients with ventricular assist devices receiving phenprocoumon. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2016; 30 (1): 96–101. DOI: 10.1053/j.jvca.2015.08.012.

8. Sin J.H., Berger B., Lesch Ch.A. Four-factor prothrombin complex concentrate for life-threatening bleeds or emergent surgery: A retrospective evaluation. *J. Crit. Care.* 2016; 36: 166–172. DOI: 10.1016/j.jcrc.2016.06.024.

9. Bailey M.A., Griffin K.J., Sohrabi S. et al. Plasma thrombin-antithrombin complex, prothrombin fragments 1 and 2, and D-dimer levels are elevated after endovascular but not open repair of infrarenal abdominal aortic aneurysm. *J. Vasc. Surg.* 2013; 57 (6): 1512–1518. DOI: 10.1016/j.jvs.2012.12.030.

10. Gionis M.N., Ioannou Ch.V., Katsamouris A.N. et al. The study of the thrombin generation mechanism

and the effect of low molecular weight heparin as thromboprophylaxis in patients undergoing total knee and hip replacement. *Thrombosis Res.* 2013; 132 (6): 685–691. DOI: 10.1016/j.thromres.2013.09.037.

11. Ослопов В.Н., Садыкова А.Р., Абдулхаков Р.А. *Клиническая лабораторная диагностика*. 3-е издание. М.: МЕДпресс-информ. 2005; 64 с. [Osloпов V.N., Sadykova A.R., Abdulkhakov R.A. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. (Clinical laboratory diagnostics. Third ed.) Moscow: MEDpress-inform. 2005; 64 p. (In Russ.)]

12. Бокарев И.Н., Доронина А.М., Козлова Т.В. и др. *Лабораторные методы исследования системы свёртывания крови*. Методические рекомендации. М. 2011; 15 с. [Bokarev I.N., Doronina A.M., Kozlova T.V. et al. *Laboratornye metody issledovaniya sistemy svertyvaniya krovi*. (Laboratory methods of studying the blood coagulation system. Guidelines.) Moscow. 2011; 15 p. (In Russ.)]

УДК 616.831-005.4-085: 615.033: 612.084

© 2017 Соколов М.Е. и соавторы

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА ГОЛОВНОГО МОЗГА

Михаил Евгеньевич Соколов\*, Фарид Вагизович Баширов, Зуфар Зуфарович Сафиуллов

Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

Поступила 14.07.2017; принята в печать 07.08.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-763

**Цель.** Разработка протокола прямой и клеточно-опосредованной генной терапии ишемического инсульта головного мозга.

**Методы.** Вирусный вектор, несущий репортёрный ген зелёного флюоресцирующего белка (GFP), создан на основе аденовируса человека 5-го серотипа (Ad5). Заготовку крови пуповины производили по инструкции банка стволовых клеток Казанского государственного медицинского университета. Мононуклеарные клетки крови пуповины выделяли в градиенте плотности фикола по стандартной методике и трансдуцировали Ad5-GFP. Ишемический инсульт головного мозга у крыс вызывали методом дистальной окклюзии средней мозговой артерии через трепанационное отверстие в височной кости под операционным микроскопом. Через 4 ч после моделирования инсульта животным, находящихся в наркозе, производили ламинэктомию на уровне L<sub>4</sub>–L<sub>5</sub> и интракратально вводили (1) 0,9% раствор натрия хлорида, (2) Ad5-GFP и (3) мононуклеарные клетки крови пуповины + Ad5-GFP. Выживание, адресную миграцию в очаг нейродегенерации, способность к синтезу рекомбинантного белка и эффективность влияния мононуклеарных клеток крови пуповины на площадь инфаркта оценивали с помощью люминесцентной микроскопии и морфометрического анализа.

**Результаты.** Через 3 нед после моделирования инсульта установлена экспрессия GFP в зоне очага инсульта, как после интракратального введения Ad5-GFP, так и после ксенотрансплантации мононуклеарных клеток крови пуповины, трансдуцированных Ad5-GFP *ex vivo*. При сравнении площадей инфаркта головного мозга через 3 нед после моделирования инсульта у животных в группе мононуклеарных клеток крови пуповины + Ad5-GFP медиана площади инфаркта была на 47,4% меньше, чем у животных, получивших инъекцию изотонического раствора натрия хлорида.

**Вывод.** Мононуклеарные клетки крови пуповины + Ad5-GFP после интракратального введения животным с ишемическим инсультом способны к адресной миграции в очаг нейродегенерации и синтезу рекомбинантного белка; результаты свидетельствуют о целесообразности доставки терапевтических генов в зону очага инсульта с помощью мононуклеарных клеток крови пуповины, сверхэкспрессирующих нейротрофические факторы.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, мононуклеарные клетки крови пуповины, генная терапия, экспериментальное исследование.

### EXPERIMENTAL VALIDATION OF GENE THERAPY FOR ISCHEMIC STROKE

M.E. Sokolov, F.V. Bashirov, Z.Z. Safiullov

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

**Aim.** To develop a protocol of direct and cell-mediated gene therapy for ischemic stroke.

**Methods.** Viral vector carrying green fluorescent protein (GFP) reporter gene was created on the basis of human adenovirus serotype 5 (Ad5). The umbilical blood supply was preserved according to instructions of Kazan State Medical University Stem cell bank. Umbilical cord blood mononuclear cells were isolated in a ficoll density gradient by standard procedure and transduced with Ad5-GFP. Ischemic cerebral stroke in rats was caused by distal occlusion of the middle cerebral artery through trephination hole in a temporal bone under surgical microscope. Within four hours after modeling stroke in the anesthetized animals laminectomy was performed at the L<sub>4</sub>–L<sub>5</sub> level, and (1) 0.9% sodium

chloride solution, (2) Ad5-GFP and (3) umbilical cord blood mononuclear cells + Ad5-GFP were inserted intrathecally. Survival, targeted migration to the focus of neurodegeneration, the ability to synthesize recombinant protein and the effect of umbilical cord blood mononuclear cells on the infarction area were assessed using luminescent microscopy and morphometric analysis.

**Results.** GFP expression in the area of the stroke was established 3 weeks after stroke modeling, both after intrathecal insertion of Ad5-GFP and after xenotransplantation of umbilical cord blood mononuclear cells Ad5-GFP transduced *ex vivo*. When comparing the areas of cerebral infarction 3 weeks after modeling the stroke, in animals from umbilical cord blood mononuclear cells + Ad5-GFP group the median of the infarction area was 47.4% less than in animals receiving isotonic saline solution.

**Conclusion.** Umbilical cord blood mononuclear cells + Ad5-GFP after intrathecal insertion to animals with ischemic stroke, are capable of targeted migration to the neurodegeneration site as well as of recombinant protein synthesis; the results suggest the expediency of delivering therapeutic genes to ischemic zone via umbilical cord blood mononuclear cells overexpressing neurotrophic factors.

**Keywords:** ischemic stroke, umbilical cord blood mononuclear cells, gene therapy, experimental study.

Проблема терапии ишемического инсульта головного мозга остаётся одной из актуальных как в фундаментальной, так и в практической медицине. Ежегодно в России регистрируют более 450 тыс. инсультов, при этом 70–80% выживших становятся инвалидами, что накладывает особые социальные и экономические обязательства на государство [1, 2].

Необратимые изменения в головном мозге при остром нарушении мозгового кровообращения характеризуются прогрессирующей нейродегенерацией не только в первые часы, но и в последующие сутки и даже недели. При этом в центральной нервной системе существуют естественные ограничения нейрогенерации, поэтому проблема сохранения жизнеспособности нервных клеток в зоне нейродегенерации диктует необходимость поиска новых эффективных подходов к лечению инсульта.

К сожалению, в настоящее время в медицинской практике отсутствует эффективная терапия, направленная на сдерживание гибели нейронов в зоне инфаркта мозга. Лечение пациентов в остром периоде основано на восстановлении кровотока с помощью тромболитических лекарственных средств. Большинство препаратов могут лишь несколько замедлить течение болезни и не способны остановить гибель нервных клеток, ведущую к смерти больного. В связи с этим существует необходимость поиска новых методов лечения. В настоящее время сохранение жизнеспособности нервных клеток при инсульте связывают с применением современных клеточных и генных технологий.

Поддержание жизни нейронов, вступивших в патологический процесс, и восстановление утраченных межклеточных связей в нейронных сетях с помощью нейротрофических факторов, факторов роста и молекул адгезии могут существенно повысить качество и продолжительность жизни пациентов после ишемического инсульта.

Список терапевтических генов, используемых для лечения инсульта, достаточно велик и включает гены, кодирующие нейротрофические факторы (BDNF, CNTF, GDNF, VEGF), антиапоптозные белки (Bcl-2, Bcl-XL), белки теплового шока (Hsp25, Hsp70), противовоспалительные молекулы (IL-1RA) [3, 4]. При этом известно, что комбинации из нескольких нейротрофических факторов могут оказывать более выраженное (синергичное) действие на выживание нервных клеток. Однако экспериментальные исследования и клинические испытания, проводимые с данными факторами, не выявили эффективный лекарственный препарат для стимулирования нейрогенерации. Причина этого заключается не только в выборе терапевтических генов, но и в способе их доставки в нервную ткань.

Одним из перспективных методов доставки терапевтических генов в очаг патологии нервной ткани считают их доставку на клеточных носителях — трансплантацию генетически модифицированных клеток, сверхэкспрессирующих сдерживающие гибель нейронов факторы.

В настоящем исследовании на модели ишемического инсульта головного мозга у крыс разработана стратегия генной терапии с помощью генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП). МККП человека трансдуцировали *ex vivo* аденовирусным вектором, несущим ген репортёрного зелёного флюоресцирующего белка, и интракeкально вводили животным после моделирования инсульта через 4 ч. Адресную миграцию в очаг нейродегенерации, выживание, способность к синтезу рекомбинантного белка и эффективность влияния МККП на площадь инфаркта мозга оценивали с помощью гистологических методов исследования.

*Аденовирусные векторы.* Рекомбинантные репликативно-дефектные вирусные векторы созданы на основе аденовируса че-



Рис. 1. Моделирование инсульта головного мозга путём дистальной окклюзии средней мозговой артерии. А. Операционное поле, видимое под микроскопом через трепанационное отверстие в височной кости. Б. Схематичное изображение операционного поля; звёздочка (\*) на рис. 1А и 1Б указывает на место окклюзии средней мозговой артерии. В. Головной мозг крысы через 3 нед после окклюзии средней мозговой артерии и интратекального введения изотонического раствора натрия хлорида. Стрелка указывает на очаг инсульта в височной доле мозга

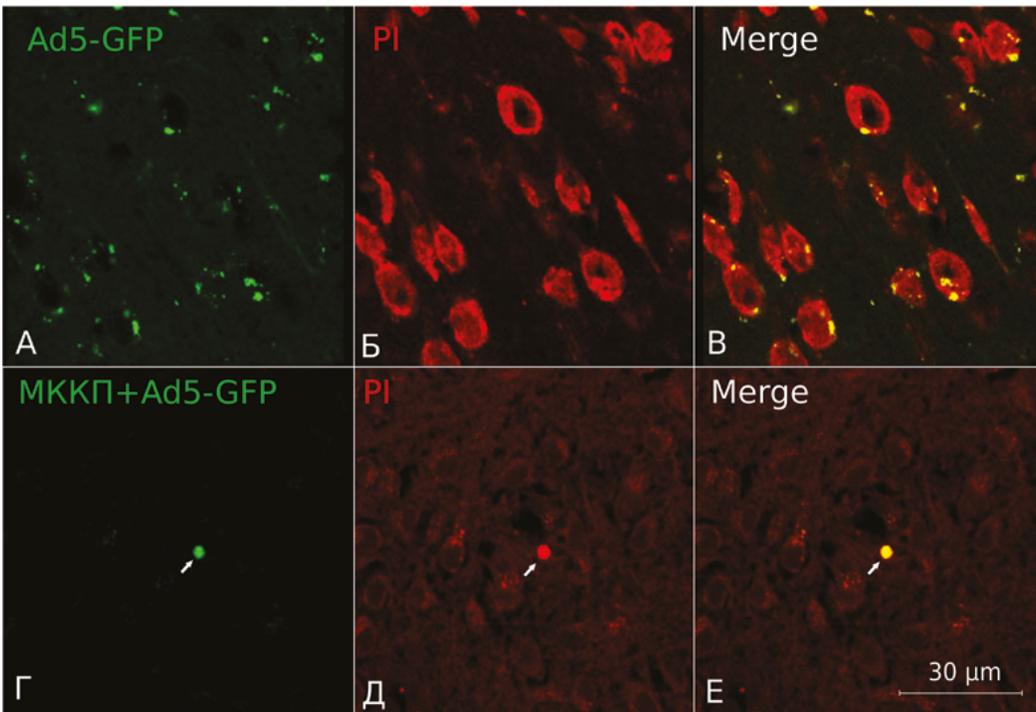


Рис. 2. Экспрессия репортерного зелёного флюоресцирующего белка в зоне очага ишемического инсульта головного мозга крысы. А. Специфическое свечение зелёного флюоресцирующего белка в клетках головного мозга после интратекального введения аденовирусного вектора Ad5-GFP. Б. Генетически модифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП; указаны стрелкой), экспрессирующие зелёный флюоресцирующий белок. PI — пропидия йодид

ловека 5-го серотипа (Ad5) в Научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Москва) [5]. В настоящем исследовании были использованы Ad5, несущие репортёрный ген зелёного флюоресцирующего белка (Ad5-GFP).

**МККП.** Заготовку крови пуповины производили по инструкции банка стволовых клеток Казанского государственного медицинского университета. Выделение МККП

проводили в градиенте плотности фиколла по стандартной методике [6].

Сразу после выделения МККП высевали на 6-сантиметровый культуральный планшет из расчёта 2 млн клеток на лунку и трансдуцировали Ad5-GFP, где показатель MOI (от англ. multiplicity of infection — множественность инфицирования) был равен 10. Через 12 ч культивирования генетически модифицированные клетки (МККП+Ad5-

GFP) собирали и растворяли в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида из расчёта  $2 \times 10^6$  клеток в 20 мкл.

*Операции на животных.* Половозрелые самцы крысы линии Wistar с массой тела 250–300 г приобретены в питомнике лабораторных животных «Пушино» (Пушино, Россия). Содержание и уход за животными производились в соответствии с международными правилами и нормами. Животные находились по одному в клетке в стандартных лабораторных условиях с соблюдением 12-часового цикла день/ночь и свободным доступом к пище и воде.

Ишемический инсульт головного мозга вызывали методом дистальной окклюзии средней мозговой артерии [7]. Глубокую анестезию вызывали путём внутривентриального введения золетила 100 (VirbacSanteAnimale, Франция) 3 мг/кг и ксилы (Interchemiewerken «DeAdelaar B.V», Нидерланды) 4,8 мг/кг. Температуру тела крысы во время операции поддерживали в пределах 37–38 °С при помощи терморегулирующей панели.

На первом этапе оперативного вмешательства для снижения кровотока в виллизиевом круге справа через вертикальный разрез по срединной линии шеи препарировали общую сонную артерию, которую лигировали с помощью шёлковой хирургической нити (3.0), кожную рану ушивали лавсаном.

На втором этапе операции слева производили продольный разрез кожи от угла глаза до наружного отверстия слухового прохода. Височную кость освобождали от прилегающей одноимённой мышцы и с помощью твердосплавного бора №2 высверливали трепанационное отверстие в височной кости диаметром 10 мм. Под операционным микроскопом иссекали твёрдую мозговую оболочку, окклюзию средней мозговой артерии проводили с помощью термокоагулятора (рис. 1А, 1Б). После этого трепанационное отверстие укрывали височной мышцей, кожу ушивали лавсаном. Все операционные швы обрабатывали 2% раствором йода.

В течение 4 ч после моделирования инсульта животным, находящимся в наркозе, производили ламинэктомию на уровне  $L_4$ – $L_5$  и интратекально вводили:

1) 20 мкл 0,9% раствора натрия хлорида ( $n=6$ );

2)  $2 \times 10^7$  вирусных частиц Ad5-GFP в 20 мкл 0,9% раствора натрия хлорида ( $n=8$ );

3) МККП+Ad5-GFP —  $2 \times 10^6$  клеток в 20 мкл 0,9% раствора натрия хлорида ( $n=7$ ).

Эксперименты выполнены с разрешения локального этического комитета Казанского государственного медицинского университета (протокол №10, 2017 г.).

*Флюоресцентное исследование.* Через 3 нед после операции животных наркотизировали с помощью хлоралгидрата (внутрибрюшинно 80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г массы тела животного), через большой круг кровообращения транскардиально перфузировали сначала холодным фосфатно-солевым буфером (pH=7,4), затем — холодным 4% раствором параформальдегида (pH=7,4). Головной мозг извлекали из черепной коробки, постфиксировали в растворе параформальдегида в течение 12 ч. Далее в целях криопротекции фиксированный мозг насыщали 30% раствором сахарозы на фосфатно-солевом буфере (pH=7,4).

Для приготовления криостатных срезов головной мозг погружали в среду для заморозки TBS (Triangle Biomedical Science) и замораживали в криостате Microm HM 560 (Thermo Scientific). Криостатные фронтальные срезы толщиной 20 мкм получали через эпицентр инфаркта головного мозга и монтировали на предметные стекла. Экспрессию репортёрного зелёного флюоресцирующего белка изучали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 Meta (Carl Zeiss). Перед микроскопией препараты дополнительно окрашивали пропидия йодидом (PI) [8]. PI окрашивает в нейронах субстанцию Ниссля, соответствующую шероховатой эндоплазматической сети, что облегчает идентификацию нейронов в ткани мозга.

*Морфометрический анализ площади инфаркта мозга.* Головной мозг выделяли из черепной коробки, очаг инсульта фотографировали под стереоскопическим микроскопом Микромед MC-2-ZOOM (рис. 1В). Оцифрованные фотографии инфаркта головного мозга оценивали в программе ImageJ (NIH).

Статистический анализ данных проводили в среде R. Для проверки гипотезы сдвига применяли критерий Краскела–Уоллиса. В качестве апостериорного критерия использовали тест Данна.

С помощью флюоресцентной микроскопии препаратов головного мозга через 3 нед после операции были получены данные, свидетельствующие об экспрессии трансгена GFP в зоне очага инсульта. Так, после интратекального введения  $2 \times 10^7$  вирусных

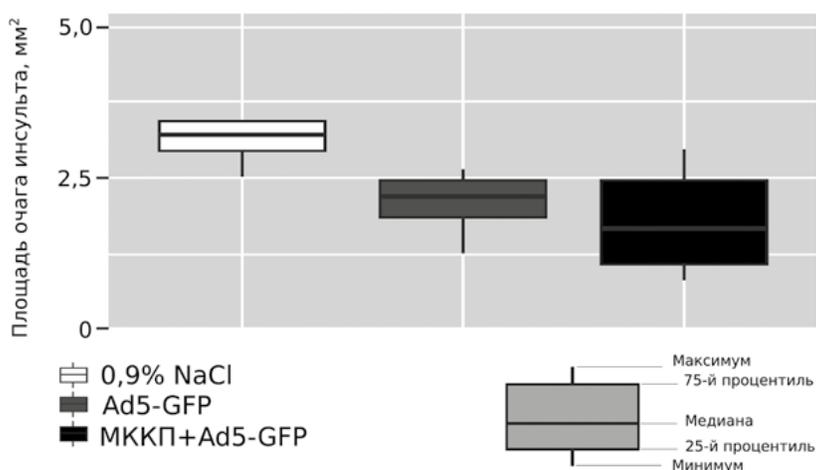


Рис. 3. Площадь инфаркта головного мозга крысы через 3 нед после дистальной окклюзии средней мозговой артерии. Через 4 ч после моделирования инсульта животным интратекально вводили изотонический раствор натрия хлорида (белый цвет), аденовирусный вектор, несущий репортёрный зелёный флюоресцирующий белок (Ad5-GFP, серый цвет) и генетически модифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины человека, экспрессирующие репортёрный зелёный флюоресцирующий белок (МККП+Ad5-GFP, чёрный цвет)

частиц аденовирусного вектора, несущего ген GFP (прямая генная терапия), репортёрный белок (специфическая флюоресценция) был выявлен в телах нервных клеток на 21-е сутки исследования (рис. 2А).

Таким образом, вирусные частицы с током цереброспинальной жидкости достигли головного мозга, трансдуцировали нервные клетки и обеспечили полноценную экспрессию трансгена — продукцию рекомбинантного GFP.

В группе животных, которым интратекально трансплантировали 2 млн МККП, трансдуцированных Ad5-GFP *ex vivo*, через 3 нед эксперимента в зоне инфаркта головного мозга были обнаружены МККП, синтезирующие GFP (рис. 2Б). Следовательно, генетически модифицированные МККП после интратекального введения с помощью цереброспинальной жидкости достигают головного мозга, где мигрируют в очаг нейродегенерации и синтезируют GFP. Эти результаты подтверждают возможность применения МККП как клеточных носителей терапевтических генов для клеточно-опосредованной генной терапии инсульта головного мозга.

Через 3 нед после операции у животных площадь инсульта составляла:

– у группы с 0,9% раствором натрия хлорида — 3,02 мм<sup>2</sup> [2,48; 3,45];

– у группы с Ad5-GFP — 2,08 мм<sup>2</sup> [1,29; 2,63];

– у группы с МККП+Ad5-GFP — 1,59 мм<sup>2</sup> [0,80; 2,93].

При сравнении площадей инфаркта головного мозга у животных всех трёх групп различия оказались статистически незначимыми. Однако обращает внимание тот факт, что в группе МККП+Ad5-GFP медиана (3,02 мм<sup>2</sup>) была на 47,4% ниже, чем медиана контрольной группы животных (2,08 мм<sup>2</sup>), получивших инъекцию изотонического раствора натрия хлорида (рис. 3).

В настоящее время клинические испытания генной терапии нейродегенеративных заболеваний центральной нервной системы проводят для лечения болезнью Альцгеймера<sup>1</sup> [9] и Паркинсона [10]. Несмотря на то обстоятельство, что терапевтическая эффективность ещё не доказана, факт безопасности инъекции рекомбинантных вирусных векторов, несущих терапевтические гены в головной мозг пациентов, свидетельствует о возможности применения генной терапии для лечения инсульта.

Известно, что для лечения инсульта проводят клинические испытания с применением аутологичных или аллогенных клеток различных типов [11], но нет ни одного, в котором используют прямую или клеточно-опосредованную генную терапию. Эффективность клеточной, генной и генно-клеточной терапии доказана в мно-

Примечание редакции. Альцгеймер (Aloise Alzheimer, 1864–1915), немецкий врач. В русскоязычной литературе устоялось написание «Альцгеймер», что не совсем верно.

гочисленных исследованиях на животных [4, 12]. В экспериментах генные и клеточные препараты преимущественно вводили в мозг в область инфаркта [3], в желудочки мозга [13], внутривенно [3] и внутриартериально [14]. При этом существуют единичные клинические испытания, в которых была применена методика интратекального введения клеточных препаратов для терапии ишемического инсульта [15, 16].

В данном исследовании получены доказательства возможности доставки терапевтических генов как с помощью аденовирусных векторов (прямая генная терапия), так и на клеточных носителях с помощью МККП (клеточно-опосредованная генная терапия) методом интратекальной инъекции в первые часы после моделирования инсульта головного мозга у крысы. Эффективность доставки трансгена в зону инфаркта подтверждена способностью экспрессии репортёрного гена зелёного флюоресцирующего белка в очаге нейродегенерации в нервных клетках после прямой генной терапии и в МККП при генно-клеточной терапии. Кроме того, нами установлено позитивное действие МККП на площадь инфаркта мозга.

Можно предположить, что МККП, сверхэкспрессирующие терапевтические гены, будут с большей эффективностью сдерживать гибель нейронов в зоне пенумбры (ишемической полутени). Клетки для генетической модификации могут быть получены от больного (ауто трансплантация) или здорового человека (аллотрансплантация).

Трансплантацию стволовых, прогениторных и дифференцированных клеток активно исследуют как способ доставки ростовых и трофических факторов, сдерживающих гибель паренхиматозных клеток и стимулирующих регенерацию органа. Наиболее перспективны в этом смысле МККП [17]. Основанием для применения этих клеток служит их пригодность как для алло-, так и для ауто трансплантации у человека, низкая иммуногенность, доступность, простота получения и хранения. Немаловажным фактором является и отсутствие законодательных, этических и религиозных запретов, существующих в практике трансплантации эмбриональных стволовых клеток.

Кроме того, в пуповинной крови присутствуют стволовые клетки, служащие источником многочисленных ростовых и трофических факторов, способные давать начало специализированным клеткам разных тканей и стимулировать ангиогенез.

Именно поэтому в настоящее время в клинических испытаниях всё чаще применяют различные клеточные типы (NCT01849887, NCT01438593) и даже цельную кровь пуповины (NCT02433509, NCT03004976) для терапии ишемического инсульта.

Отсутствие доступных и результативных методов лечения инсульта головного мозга, занимающего лидирующие позиции по смертности и инвалидности пациентов во всём мире, предполагает создание новых терапевтических протоколов, включающих генные и клеточные препараты, для эффективного применения в клинической практике. Исследования в области генных и клеточных технологий для регенеративной медицины как за рубежом, так и в России в лучшем случае доведены до стадии клинических испытаний. На сегодняшний день готовых, апробированных и эффективных препаратов, содержащих генетический материал, для стимулирования нейрогенерации не существует.

В данной работе на модели ишемического инсульта головного мозга у крыс разработана стратегия генной терапии с помощью генетически модифицированных МККП на модели ишемического инсульта у крыс. Установлено, что МККП-Ad5-GFP, трансплантированные в течение 4 ч путём интратекального введения животным с ишемическим инсультом, способны к адресной миграции в очаг нейродегенерации и синтезу рекомбинантного белка.

## ВЫВОДЫ

1. Мононуклеарные клетки крови пуповины + Ad5-GFP после интратекального введения животным с ишемическим инсультом способны к адресной миграции в очаг нейродегенерации и синтезу рекомбинантного белка.

2. Результаты свидетельствуют о целесообразности доставки терапевтических генов в зону очага инсульта с помощью мононуклеарных клеток крови пуповины, сверхэкспрессирующих нейротрофические факторы.

*Работа выполнена при поддержке гранта Академии наук Татарстана №09-117-хГ/2017. Авторы выражают благодарность профессору Р.Р. Исламову за помощь при подготовке манускрипта.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Китаева Э.А., Китаев М.Р., Сутина Т.А. и др. Внедрение пациентоориентированной программы, направленной на формирование приверженности к лекарственной терапии у пациентов из сельской местности. *Вестн. сов. клин. мед.* 2017; 10 (2): 64–71. [Kitaeva E.A., Kitaev M.R., Suetina T.A. et al. Implementation of patient oriented program aiming to develop compliance in rural area patients. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny.* 2017; 10 (2): 64–71. (In Russ.)] DOI: 10.20969/VSKM.2017.10(2).6.
2. Китаева Э.А., Китаев М.Р., Саляхова Л.Ю., Вафин А.Ю. Разработка и внедрение программы профилактики острого нарушения мозгового кровообращения на примере Рыбно-Слободского района Республики Татарстан. *Казанский мед. ж.* 2016; 97 (5): 764–770. [Kitaeva E.A., Kitaev M.R., Salyakhova L.Yu., Vafin A.Yu. Elaboration and implementation of the program for prevention of acute disorders of cerebral circulation as exemplified in Rybnaya Sloboda district of the Republic of Tatarstan. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2016; 97 (5): 764–770. (In Russ.)] DOI: 10.17750/KMJ2016-764.
3. Rhim T., Lee M. Targeted delivery of growth factors in ischemic stroke animal models. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2016; 13 (5): 709–723. DOI: 10.1517/17425247.2016.1144588.
4. Craig A.J., Housley G.D. Evaluation of gene therapy as an intervention strategy to treat brain injury from stroke. *Front. Mol. Neurosci.* 2016; 9: 1–34. DOI: 10.3389/fnmol.2016.00034.
5. Povysheva T.V., Shmarov M.M., Logunov D.Y. et al. Astrocytes mediated post-traumatic spinal cord regeneration in rats after intraspinal injection of recombinant adenoviral vectors Ad5-VEGF and Ad5-ANG. *J. Neurosurg. Spine.* 2017; (1): 105–115. DOI: 10.3171/2016.9.SPINE15959.
6. Islamov R.R., Rizvanov A.A., Mukhamedyarov M.A. et al. Symptomatic improvement, increased life-span and sustained cell homing in amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of human umbilical cord blood cells genetically modified with adeno-viral vectors expressing a neuro-protective factor and a neur. *Curr. Gene Ther.* 2015; 15 (3): 266–276. DOI: 10.2174/1566523215666150126122317.
7. Lemarchant S., Dunghana H., Pomeschik Y. et al. Anti-inflammatory effects of ADAMTS-4 in a mouse model of ischemic stroke. *Glia.* 2016; 64 (9): 1492–1507. DOI: 10.1002/glia.23017.
8. Niu J., Li C., Wu H. et al. Propidium iodide (PI) stains Nissl bodies and may serve as a quick marker for total neuronal cell count. *Acta Histochem. Elsevier GmbH.* 2015; 117 (2): 182–187. DOI: 10.1016/j.acthis.2014.12.001.
9. Rafii M.S. Update on Alzheimer's disease therapeutics. *Rev. Recent Clin. Trials.* 2013; 8 (2): 110–118. DOI: 10.2174/15748871113089990045.
10. Olanow C.W., Bartus R.T., Volpicelli-Daley L.A. et al. Trophic factors for Parkinson's disease: To live or let die. *Mov. Disord.* 2015; 30 (13): 1715–1724. DOI: 10.1002/mds.26426.
11. Jeong H., Yim H., Cho Y. et al. Efficacy and safety of stem cell therapies for patients with stroke: a systematic review and single arm meta-analysis. *Int. J. Stem Cells.* 2014; 7 (2): 63–69. DOI: 10.15283/ijsc.2014.7.2.63.
12. Yamashita T., Deguchi K., Nagotani Sh. et al. Gene and stem cell therapy in ischemic stroke. *Cell Transplant.* 2009; 18 (9): 999–1002. DOI: 10.3727/096368909X471233.
13. Chen B., Zhang F., Li Q. et al. Protective effect of Ad-VEGF-bone mesenchymal stem cells on cerebral infarction. *Turk. Neurosurg.* 2016; 26 (1): 8–15. DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.11488-14.3.
14. Karlupia N., Manley N., Prasad K. et al. Intra-arterial transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells is more efficacious and safer compared with umbilical cord mesenchymal stromal cells in a rodent stroke model. *Stem Cell Res. Ther.* 2014; 5 (2): 1–45. DOI: 10.1186/scrt434.
15. Chernykh E.R., Shevela E.Ya., Starostina N.M. et al. Safety and therapeutic potential of M2 macrophages in stroke treatment. *Cell Transplant.* 2016; 25 (8): 1461–1471. DOI: 10.3727/096368915X690279.
16. Sharma A., Sane H., Nagrajan A. et al. Autologous bone marrow mononuclear cells in ischemic cerebrovascular accident paves way for neurorestoration: A case report. *Case Rep. Med.* 2014; 2014: 1–5. DOI: 10.1155/2014/530239.
17. Ballen K.K., Gluckman E., Broxmeyer H.E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood.* 2013; 122 (4): 491–498. DOI: 10.1182/blood-2013-02-453175.