УДК 615.03:616.894-053.8
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650
Оригинальная статья | Original article

Check for updates
CC BY 4.0

В.О. Небогатиков[1] ✉,
Д.И. Салихова[2,3],
Е.В. Белоусова[2,3],
Е.В. Броновицкий[4],
Е.А. Орлова[1],
М.А. Лапшина[1],
Д.В. Гольдштейн[2],
А.А. Устюгов[1]

Безопасность биомедицинского клеточного продукта на основе глиальных клеток-предшественников человека: пилотное исследование на мышах линии C57BL/6J при ретроорбитальном введении

[1] *Институт физиологически активных веществ федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии» Российской академии наук, Северный пр-д, д. 1, Черноголовка, Московская область, 142432, Российская Федерация*

[2] *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», ул. Москворечье, д. 1, Москва, 115522, Российская Федерация*

[3] *Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины Медицинского института Российского университета дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, д. 6, Москва, 117198, Российская Федерация*

[4] *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Государственный университет просвещения», ул. Радио, д. 10а, стр. 2, Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Басманный, 105005, Российская Федерация*

✉ ***Небогатиков Владимир Олегович***; *vnebogatikov@gmail.com*

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Терапия стволовыми клетками представляет собой перспективный метод лечения различных заболеваний и травм, однако безопасность этого метода изучена недостаточно. Исследование безопасности ретроорбитального введения ксеногенного биомедицинского клеточного продукта необходимо для разработки протоколов дальнейших исследований потенциальных препаратов при терапии неврологических заболеваний.

ЦЕЛЬ. Выбор дозы биомедицинского клеточного продукта, полученного на основе глиальных клеток-предшественников, и оценка его безопасности при ретроорбитальном введении мышам линии C57BL/6J.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Глиальные клетки-предшественники (ГКП), полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека путем их поэтапной дифференцировки, культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением эпидермального фактора роста и цилиарного нейротрофического фактора, в качестве подложки использовали матригель. Введение клеток мышам осуществляли ретроорбитально под изофлурановым наркозом один раз в неделю на протяжении двух месяцев. Исследование проводили на самцах мышей линии C57BL/6J. Оценивали биохимические показатели крови животных, изменения в поведении, количество активированных астроцитов и клеток микроглии методом иммуногистохимического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ. При введении ГКП в дозе 500×10^3 кл./мышь, выбранной на основании данных литературы, в плазме крови животных было отмечено увеличение концентрации аланинаминотрансферазы и аспартатаминотранферазы, что могло свидетельствовать о повреждении клеток и развитии воспалительных реакций. При уменьшении дозы вводимых клеток в 3 раза и более биохимические

© В.О. Небогатиков, Д.И. Салихова, Е.В. Белоусова, Е.В. Броновицкий, Е.А. Орлова, М.А. Лапшина, Д.В. Гольдштейн, А.А. Устюгов, 2024

показатели крови не отличались от результатов в группе контроля. При оценке маркеров нейровоспаления в экспериментах с разными дозами ГКП значимых различий выявлено не было, однако у животных, получавших препарат в дозе 150×10^3 кл./мышь, наблюдали увеличение числа астроцитов, что может свидетельствовать о развивающихся воспалительных процессах в головном мозге. При введении ГКП в дозах 50×10^3 и 15×10^3 кл./мышь в ретроорбитальный венозный синус патологических изменений в головном мозге и в плазме крови животных не наблюдалось.

ВЫВОДЫ. Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной безопасности длительной терапии ГКП на мышах при соблюдении оптимальных условий дозирования. Установленные оптимальные дозы и способ введения ГКП предложено использовать для дальнейших исследований безопасности внутривенной доставки клеточных продуктов, предназначенных для терапии неврологических заболеваний.

Ключевые слова: стволовые клетки; глиальные клетки-предшественники; ретроорбитальное введение; мыши C57BL/6J; выбор дозы

Для цитирования: Небогатиков В.О., Салихова Д.И., Белоусова Е.В., Броновицкий Е.В., Орлова Е.А., Лапшина М.А., Гольдштейн Д.В., Устюгов А.А. Безопасность биомедицинского клеточного продукта на основе глиальных клеток-предшественников человека: пилотное исследование на мышах линии C57BL/6J при ретроорбитальном введении. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2024;14(6):720–732. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-15-00362 «Изучение механизмов терапевтического действия внеклеточных везикул, полученных из глиальных клеток-предшественников человека на модели болезни Альцгеймера».

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Vladimir O. Nebogatikov[1] ✉, **Diana I. Salikhova**[2,3], **Ekaterina V. Belousova**[2,3], **Evgeny V. Bronovitsky**[4], **Ekaterina A. Orlova**[1], **Mariya A. Lapshina**[1], **Dmitry V. Goldshtein**[2], **Aleksey A. Ustyugov**[1]

Safety of a Medicinal Product Based on Human Glial Progenitor Cells: A Pilot Study of Retrobulbar Administration in C57BL/6J Mice

[1] *Institute of Physiologically Active Compounds, Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, 1 Severny Dr., Chernogolovka, Moscow Region 142432, Russian Federation*

[2] *Research Centre for Medical Genetics, 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russian Federation*

[3] *Research Institute of Molecular and Cellular Medicine of the Medical Institute of the Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, 6 Miklukho-Maklay St., Moscow 117198, Russian Federation*

[4] *Federal State University of Education, 10A/2 Radio St., Moscow 105005, Russian Federation*

✉ ***Vladimir O. Nebogatikov***; *vnebogatikov@gmail.com*

ABSTRACT

INTRODUCTION. Stem cell therapy is a promising treatment method for various diseases and injuries, but its safety has yet to be determined. Therefore, studying the safety of administering a xenogeneic cell-based medicinal product (CBMP) into the retro-orbital venous sinus is essential for developing protocols for further studies of potential medicinal products for neurological conditions.

AIM. The aim of the study was to determine the optimal dose of a CBMP derived from glial progenitor cells (GPCs) and to evaluate its safety during retrobulbar administration in C57BL/6J mice.

MATERIALS AND METHODS. GPCs were derived from human induced pluripotent stem cells by stepwise differentiation and cultured in DMEM/F12 supplemented

with epidermal growth factor and ciliary neurotrophic factor. Matrigel was used as a substrate. GPCs were injected into the retro-orbital venous sinus of male C57BL/6J mice under isoflurane anaesthesia once a week for two months. The study analysed changes in biochemical blood parameters and behaviour. The quantities of activated astrocytes and glial cells were determined by postmortem immunohistochemical staining.

RESULTS. The administration of GPCs at a dose of 500×10^3 cells/mouse, which was selected using literature data, induced an increase in the plasma levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. This could indicate cell damage and the development of inflammatory reactions. At doses reduced to one-third the initial GPC concentration or lower, the biochemical blood parameters of the treatment groups did not differ significantly from those of the control group. There were no significant differences in neuroinflammatory markers between the groups receiving GPCs at different doses, except for an increase in astrocyte activation at a dose of 150×10^3 cells/mouse, which could potentially indicate inflammatory processes in the brain. The study detected no pathological changes in the brain or cell damage markers in the blood of mice after retrobulbar GPC injections of 15×10^3 or 50×10^3 cells/mouse.

CONCLUSIONS. The study results indicate that long-term therapy with GPCs is potentially safe for mice if the dose is optimal. The authors suggest using the optimal doses and the administration route established in this study for further research into the safety of intravenous administration of CBMPs for neurological conditions.

Keywords: stem cells; glial progenitor cells; retrobulbar administration; C57BL/6J mice; dose selection

For citation: Nebogatikov V.O., Salikhova D.I., Belousova E.V., Bronovitsky E.V., Orlova E.A., Lapshina M.A., Goldshtein D.V., Ustyugov A.A. Safety of a medicinal product based on human glial progenitor cells: A pilot study of retrobulbar administration in C57BL/6J mice. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):720–732. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650

Funding. The study reported in this publication was conducted with the financial support of the Russian Science Foundation under Grant 23-15-00362 "Study of the mechanisms of therapeutic action of extracellular vesicles obtained from human glial progenitor cells in a model of Alzheimer's disease".

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Быстрый прогресс, связанный с изучением биологии стволовых клеток, привел в последние годы к разработке новых методов лечения ряда нейродегенеративных заболеваний [1]. Использование стволовых клеток предполагает особенно привлекательную альтернативу терапии небольшими молекулами с одной мишенью, обеспечивая многогранный эффект лечения. Помимо прямой замены ткани, стволовые клетки могут образовывать синапсы, регулировать воспаление и обеспечивать устойчивое обогащение микроокружения посредством секреции паракринных факторов [2, 3]. В настоящее время инъекционные препараты стволовых клеток центральной нервной системы проходят клинические испытания с целью лечения инсульта и болезни Паркинсона [4, 5]. Доклинические исследования по трансплантации стволовых клеток в модели болезни Альцгеймера у мышей показали краткосрочный положительный эффект, который часто связан с доставкой нейротрофических факторов [6, 7]. Этот эффект подтвержден результатами ряда текущих клинических исследований препаратов различных типов мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при их внутривенном и внутрижелудочковом введении [8] пациентам с болезнью Альцгеймера.

К наиболее перспективным примерам экспериментальных исследований в области ксеногенной клеточной трансплантации можно отнести трансплантацию инсулин-продуцирующих клеток человека при моделировании диабета у мышей низкими дозами стрептозотоцина [9], нейральных стволовых клеток (НСК) человека при моделировании болезней Паркинсона [10], Хантингтона [11] и эпилепсии [12]. При этом во всех приведенных работах показана эффективность ксеногенной клеточной трансплантации. Таким образом, использование ксеногенного клеточного продукта — глиальных клеток-предшественников (ГКП), полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека, может представлять собой новый терапевтический подход к лечению целого ряда неврологических заболеваний.

При всех преимуществах клеточной терапии, включающих возможность лечения ряда неврологических заболеваний, необходимо также учитывать риски, связанные с безопасностью этого подхода [13, 14]. Так, неконтролируемое размножение трансплантированных клеток может приводить к образованию опухолей [15, 16]. Этот риск особенно высок при использовании стволовых/прогениторных клеток, которые способны к бесконтрольному делению.

Ограничения к применению клеточной терапии могут быть связаны с вероятностью иммунного отторжения используемого препарата. При трансплантации ксеногенных клеток запускается иммунный ответ с активацией Т-лимфоцитов и продукцией антител, что приводит к элиминации трансплантата [17]. Использование клеток или клеточных продуктов в высоких концентрациях может вызывать воспалительные реакции, связанные как с непосредственным воздействием клеток на организм, так и с ответом на секретируемые этими клетками вещества.

Одним из потенциальных осложнений при клеточной терапии является эмболия [18] в результате внутриартериальной/внутривенной инъекции, что вызывает серьезные осложнения после лечения, в том числе инфаркт или инсульт [19]. Минимизировать риски, ассоциированные с эмболией сосудов, можно путем правильного подбора концентрации трансплантата.

Предположительно действие ГКП основано на секреции паракринных факторов, способных влиять на функциональное состояние головного мозга животных. Также сделано предположение, что при определенной концентрации исследуемый биомедицинский клеточный продукт будет безопасен при ретроорбитальном введении, но при этом будет оказывать модулирующие эффекты на клетки-мишени головного мозга.

Ретроорбитальное введение является более безопасным и эффективным, чем введение в хвостовую вену у мышей, особенно при многократном введении [20]. Поскольку основной эксперимент должен быть продолжительным, было выбрано именно ретроорбитальное введение.

Использование ГКП является одной из стратегий в клеточной терапии различных заболеваний, в том числе нейродегенеративных [21]. Однако из-за специфики получения ГКП и отсутствия экспериментальных данных необходимо подбирать безопасные концентрации клеток и дозы для последующей оценки их эффективности.

Целью данной работы является выбор дозы биомедицинского клеточного продукта, полученного на основе глиальных клеток-предшественников, и оценка его безопасности при ретроорбитальном введении мышам линии C57BL/6J.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение глиальных клеток-предшественников. Культура ГКП была получена ранее из ИПСК человека [22]. Для репрограммирования дермальных фибробластов и получения ИПСК использовали набор CTS CytoTune-iPS 2.1 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen). Для дифференцировки в нейральном направлении ИПСК культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco) с добавлением малых молекул SB431542 (Stemcell Technologies), 2 мкМ дорсоморфина (Stemcell Technologies), 200 нМ LDN193189 (Sigma-Aldrich). Полученную культуру нейральных стволовых клеток культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10 нг/мл фактора роста фибробластов (FGF-2) (ProSpec), 20 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF) (ProSpec) и 20 нг/мл цилиарного нейротрофического фактора (CNTF) (PeproTech) до формирования клеток веретенообразной морфологии, соответствующей ГКП. В качестве подложки использовали матригель (Corning). Пересев культуры осуществляли каждые два-три дня, используя 0,05% раствор трипсина (Capricorn Scientific).

ГКП культивировали в среде следующего состава: DMEM/F12 («ПанЭко»), HEPES 15 мМ («ПанЭко»), 1мМ глутамин («ПанЭко»), 1% смесь незаменимых аминокислот («ПанЭко»), 100 мг/л пенициллин-стрептомицин («ПанЭко»), 1% N2 добавка («ПанЭко»), 1% фетальная бычья сыворотка (Gibco), 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл CNTF. В качестве подложки использовали матригель (Corning). Культивирование проводили в CO_2-инкубаторах при постоянной температуре 37 °С и 5% CO_2. При достижении конфлюентности 85–95% клетки снимали раствором 0,05% трипсин-ЭДТА (Capricorn Scientific), центрифугировали 5 мин при 1400 об./мин, осадок разводили культуральной средой в соотношении 1:2 и переносили в новые культуральные флаконы T175 (SPL Life Sciences). Перед введением в ретроорбитальный венозный синус мыши клеточный осадок разводили с использованием фосфатно-солевого буфера (phosphate-buffered saline, PBS) («ПанЭко») до получения растворов, содержащих в одной дозе (150 мл) 500×10^3, 150×10^3, 50×10^3 и 15×10^3 клеток.

Лабораторные животные. Мыши были предоставлены из биоресурсной коллекции Центра

коллективного пользования Института физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН). В двух экспериментах было использовано 40 животных из имеющегося стока, не вошедших в размножение половозрелых самцов линии C57BL/6J в возрасте 6 мес. и массой 30–33 г. Способ введения клеток в ретроорбитальный венозный синус животных был выбран как менее травматичный, чем интракраниальная трансплантация, и допускающий многократные инъекции.

Животные были рандомизированы на основании их массы согласно стандартной операционной процедуре ИФАВ РАН таким образом, чтобы средняя масса животных в группах не отличалась более чем на 10%. При этом учитывалась возможность содержания в клетках, поскольку половозрелых самцов из разных клеток не допускается ссаживать в одну, также исключалось одиночное содержание.

Все эксперименты с животными были проведены на базе Центра доклинических испытаний ИФАВ РАН в оборудованном виварии с двухкоридорной системой и разделением потоков. Световой цикл состоял из 12 ч дня и 12 ч ночи. Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды (температура 19–25 ºС, относительная влажность 30–70%). Использовали беспылевой подстил и корм торговой марки «Чара» с предварительным автоклавированием при 120 ºС, позволяющим обеспечить отсутствие видоспецифичных патогенных микроорганизмов. Животных поили фильтрованной водопроводной водой, прошедшей обработку ультрафиолетовым излучением. Работы с животными осуществляли в соответствии с ГОСТ 33215-2014[2] и ГОСТ 33216-2014[2]. Каждую неделю перед введением ГКП проводили клинический осмотр и взвешивание животных.

Проведение исследований было одобрено на заседании локального биоэтического комитета ИФАВ РАН (протоколы заседаний № 80 от 28.07.2023; № 81 от 30.08.2023).

Протокол ретроорбитального введения глиальных клеток-предшественников мышам линии C57BL/6J. Для оценки безопасности введения ГКП мышам и подбора дозы для хронического эксперимента было проведено два пилотных эксперимента.

В первом эксперименте животным контрольной группы вводили ретроорбитально по 150 мкл DPBS (фосфатно-солевой буфер в среде Дульбекко) (количество животных в группе n=9), а животным экспериментальной группы (n=9) — по 150 мкл ГКП, содержащего 500×10^3 клеток в одной дозе (кл./мышь). Инъекции проводили один раз в неделю в течение 2 мес. под общим изофлурановым наркозом.

Во втором эксперименте животные были разделены на четыре группы. В группе контроля (n=5) животным вводили ретроорбитально по 150 мкл DPBS, В трех экспериментальных группах (n=5 в каждой) животным вводили по 150 мкл ГКП, содержащего 150×10^3, 50×10^3, 15×10^3 кл./мышь соответственно. Инъекции проводили один раз в неделю в течение 1 мес. под общим изофлурановым наркозом.

Протокол проведения теста «Открытое поле». В первом эксперименте после двухмесячного введения клеток был проведен тест «Открытое поле» для оценки активности животных. Животных помещали в отдельную комнату для акклиматизации за 1 ч до начала теста. Установка «Квадратное открытое поле» представляет собой усеченный куб с размером сторон 40 см, в котором выделен центральный квадрат с размером сторон 20 см. Время теста для одного животного составляло 5 мин при ярком освещении (250 лк).

Забор биологического материала у животных. По окончании эксперимента у 5 животных из каждой группы прижизненно была взята кровь из подъязычной вены в объеме 150–200 мкл. Из массива данных для статистической обработки были исключены пробы крови с гемолизом.

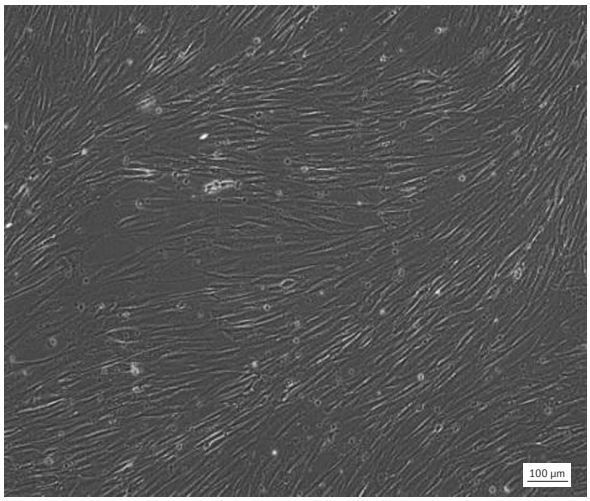
Головной мозг животного после эвтаназии и некропсии был последовательно зафиксирован в 10% растворе формалина (Labiko) (24 ч), 30% растворе сахарозы (АО «ЛенРеактив») (24 ч), растворе (1:1) сахарозы с Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek) (24 ч) и хранился при +4 ºС для последующего проведения иммуногистохимического исследования.

Иммуногистохимическое исследование коры головного мозга мышей. Образцы головного мозга мышей покрывали реагентом Tissue-Tek O.C.T. Compound. Подготовку сагиттальных срезов толщиной 7 мкм выполняли на криотоме Leica CM1950 (Leica Biosystems). Готовые срезы переносили на предметные стекла Superfrost Plus

[1] ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур.
[2] ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

(Thermo Fisher Scientific) и хранили при +4 °С. Демаскировку образцов проводили в 10-кратном цитратном буфере (Sigma-Aldrich, кат. № C9999) на водяной бане. Подготовленные образцы инкубировали в PBS с добавлением 1% раствора бычьего сывороточного альбумина («ПанЭко»), 0,05% Triton X-100 («ПанЭко») в течение 1 ч, а затем обрабатывали первичными антителами к маркеру астроцитов — глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) — 1:200 ab7260б (Abcam) и к микроглие — адаптеру 1, связывающему ионизированный кальций (IBA1) — 1:200 ab178847 (Abcam) и инкубировали ночь при +4 °С. Затем стекла отмывали от первичных антител и инкубировали с перекрестно-адсорбированными вторичными антителами. Для окраски образцов в первом эксперименте использовали вторичные антитела в разведении 1:1000 Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 568 (A-11011, Thermo Fisher Scientific); во втором эксперименте с разными дозами ГКП использовали вторичные антитела в разведении 1:600 Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor™ 488 (A-11008, Thermo Fisher Scientific) и 1:600 Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor™ 555 (A-21422, Termo Fisher Scientific). Окраску проводили в течение 2 ч в темноте. Затем стекла повторно отмывали, срезы инкубировали с раствором DAPI (Sigma-Aldrich, кат. № D9542) в PBS (разведение 1:1000) для контрастирования ядер. Заключение срезов под покровные стекла проводили с помощью среды Aqua-Poly/Mount (Polysciences).

Изображения были получены на конфокальном микроскопе Leica TCS SP8 (Leica Microsystems),



Фотография выполнена авторами / The photograph is taken by the authors

Рис. 1. *Морфология глиальных клеток-предшественников. Световая микроскопия*

Fig. 1. *Morphology of glial progenitor cells. Light microscopy*

для их обработки использовали программу ImageJ. Было подсчитано общее количество иммунопозитивных клеток в случайно выбранных полях зрения в пределах среза мозга площадью 1 мм^2 для каждого образца.

Статистический анализ данных был проведен в программах SigmaPlot 15.0 и GraphPad Prism 7. Для проверки распределения на нормальность использовали критерий Шапиро–Уилка. В первом эксперименте в случае, когда распределение данных отличалось от нормального в тесте «Открытое поле», при оценке результатов биохимического и иммуногистохимического анализа был применен критерий Манна–Уитни, при прохождении теста на нормальность распределения использовали *t*-критерий Стьюдента.

Во втором эксперименте в случае отличия распределения данных биохимического анализа крови и иммуногистохимического исследования от нормального был применен ранговый дисперсионный анализ (ANOVA on ranks) с последующей обработкой тестом Данна, при нормальном распределении — однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика глиальных клеток-предшественников. ГКП были получены ранее из ИПСК человека путем их поэтапной дифференцировки и имели веретенообразную морфологию *(рис. 1),* согласно методике, указанной в X. Wei и соавт. [23].

Тест «Открытое поле». В эксперименте с высокой дозой клеток — 500×10^3 кл./мышь, проводили тест «Открытое поле» для оценки активности животных. В тесте оценивали общее пройденное животным расстояние, среднюю скорость движения, время, проведенное в периферической и центральной зонах. В течение 5 мин теста фиксировали поведенческие паттерны: вертикальные подъемы тела с опорой и без опоры, частоту аутогруминга, частоту дефекации. Между контрольной и экспериментальной группами значимых различий выявлено не было *(рис. 2, 3)*. Введение ГКП не повлияло на активность и поведение животных.

Поскольку в первом эксперименте даже при введении ГКП в высокой дозе клеток различий в поведении животных в тесте «Открытое поле» не обнаружено, во втором эксперименте этот тест не проводили.

Оценка уровня биохимических маркеров воспаления в крови мышей. По окончании обоих экспериментов проводили биохимический анализ венозной крови животных в каждой группе (*n*=5) и оценивали маркеры повреждения клеток.

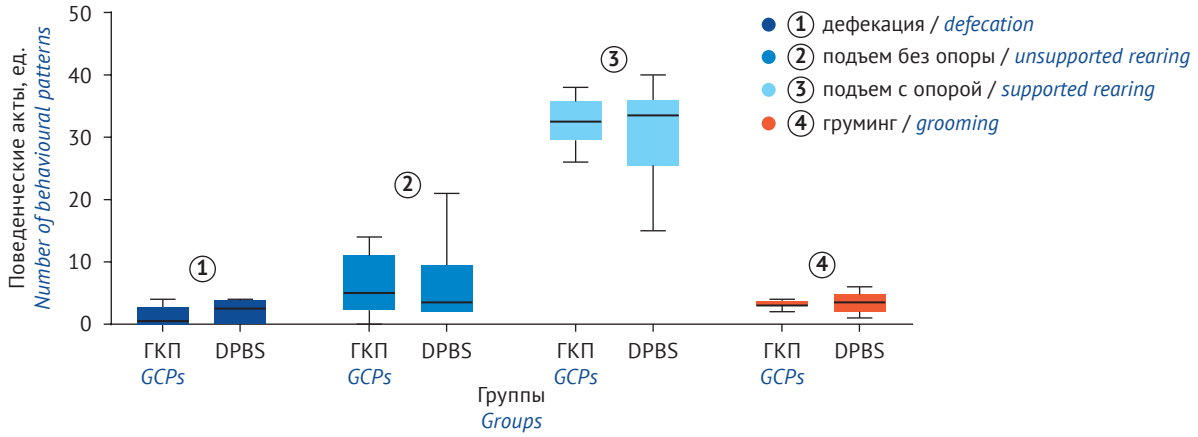


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. *Количество поведенческих паттернов животных при введении ГКП в дозе 500×10³ кл./мышь. ГКП — глиальные клетки-предшественники, DPBS — фосфатно-солевой буфер в среде Дульбекко. Данные проанализированы с помощью критерия Манна–Уитни и представлены в виде медианы и 25–75-го квартилей*

Fig. 2. *Behavioural patterns of animals injected with GCPs at a concentration of 500×10³ cells/mouse. GCPs, glial progenitor cells; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline. The data were analysed using the Mann–Whitney test and presented as the median and 25–75 quartiles*

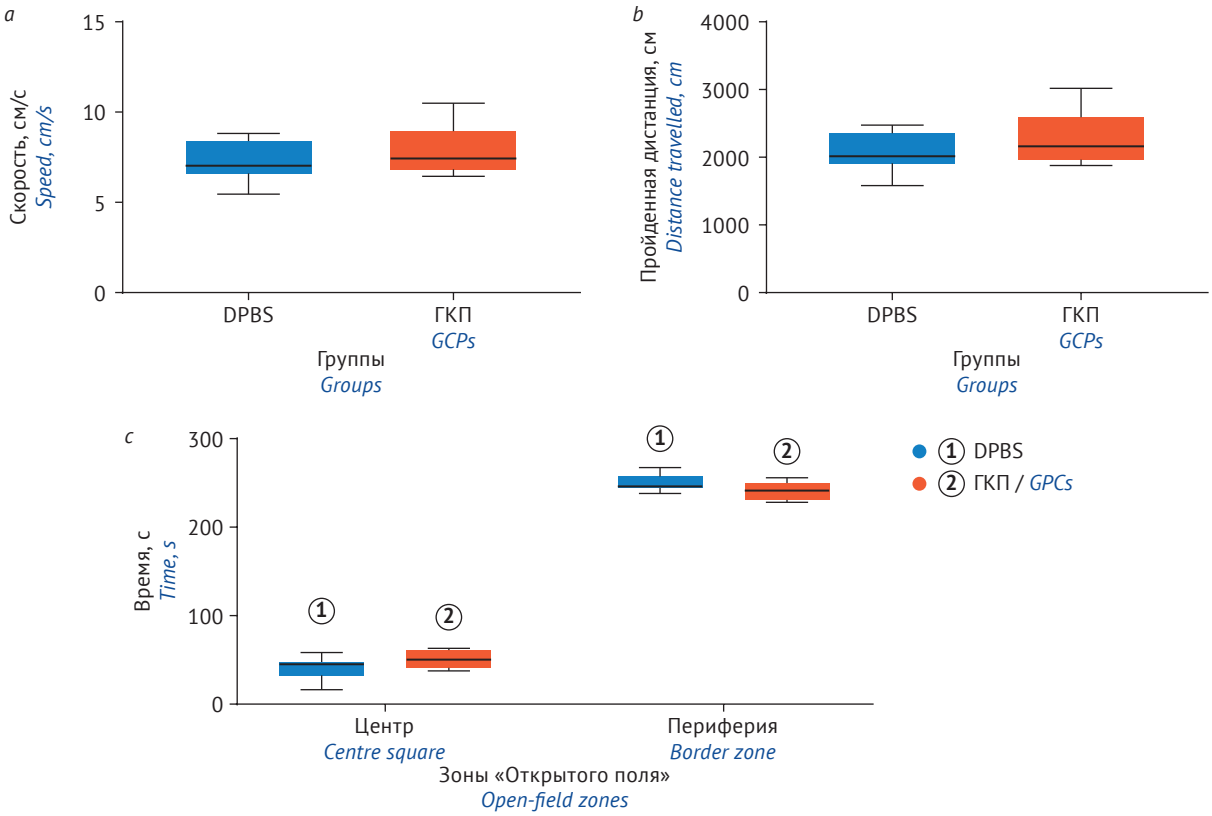


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. *Параметры активности животных при введении ГКП в дозе 500×10³ кл./мышь: a — скорость движения, b — пройденная дистанция, c — время активности. ГКП — глиальные клетки-предшественники, DPBS — фосфатно-солевой буфер в среде Дульбекко. Данные проанализированы с помощью критерия Манна–Уитни и представлены в виде медианы и 25–75-го квартилей*

Fig. 3. *Parameters of animal activity after administration of GPCs at a concentration of 500×10³ cells/mouse: a, speed of movement; b, distance traveled; c, time of activity. GPCs, glial progenitor cells; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline. The data were analysed using the Mann–Whitney test and presented as the median and 25–75 quartiles*

Для анализа были выбраны следующие показатели: аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), коэффициент де Ритиса (АСТ/АЛТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ), общий билирубин.

При ретроорбитальном введении ГКП в дозе 500×10³ кл./мышь наблюдали статистически значимое увеличение концентрации АСТ, АСТ/АЛТ, ЛДГ и общего билирубина. Повышение уровней данных ферментов в крови свидетельствует о различных состояниях, связанных с повреждением клеток и тканей органов животных, что может указывать на их иммунные реакции при ксеногенной трансплантации, вызванные инфильтрацией клеток в печень или другие паренхиматозные органы *(табл. 1)*.

Введение животным ГКП в более низких дозах 15×10³, 50×10³ и 150×10³ кл./мышь не приводило к повышению в крови концентрации маркеров повреждения клеток, что свидетельствует о возможном использовании ГКП в данных дозах для терапии заболеваний при введении в ретроорбитальный синус животных *(табл. 2)*.

Иммуногистохимическое исследование коры головного мозга. Для оценки нейровоспаления у животных после введения ГКП проводили количественную оценку активированных астроцитов и микроглии в головном мозге. При введении ГКП в дозе 500×10³ кл./мышь медианное значение количества GFAP-позитивных клеток в коре головного мозга мышей (*M*) составило 276 кл./мм² (*n*=9) и было достоверно выше, чем в группе контроля (*M*=226 кл./мм², *n*=16) при сравнении групп критерием Манна–Уитни (*p*=0,0235). Количество GFAP-позитивных астроцитов коры головного мозга мышей после иммуногистохимического окрашивания представлено на *рисунке 4*, опубликованном на сайте журнала[3].

Во втором эксперименте при оценке нейровоспаления у животных после введения ГКП

Таблица 1. *Биохимические показатели крови мышей после введения высоких доз глиальных клеток-предшественников*

Table 1. *Biochemical blood parameters of mice after glial progenitor cells administration at high doses*

Название группы *Group*	Номер животного *Animal*	Результаты анализа крови *Blood test findings*					
		АЛТ, Ед/л *ALT, U/L*	АСТ, Ед/л *AST, U/L*	ЛДГ, Ед/л *LDH, U/L*	ГГТ, Ед/л *GGT, U/L*	Билирубин общий, мкмоль/л *Total bilirubin, μmol/L*	АСТ/АЛТ *AST/ALT*
ГКП 500×10³ клеток *GPCs, 500×10³ cells*	1	55	164	1306	<1	6,2	3
	2	56	159	2865	<1	10,8	2,8
	3	38	91	979	<1	5	2,4
	4	30	89	891	<1	5,3	3
	5	88	363	1561	<1	10,5	4,1
	среднее *mean*	53,4	173,2**	1520,4**	<1	7,56*	3,06*
Контроль (DPBS) *Control (DPBS)*	1	47	53	289	<1	2,8	1,1
	2	24	39	213	<1	3	1,6
	3	28	39	201	<1	3,1	1,4
	4	28	77	215	<1	2,7	2,8
	5	22	41	186	<1	2,7	1,9
	среднее *mean*	29,8	49,8	220,8	<1	2,86	1,76

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *ГКП — глиальные клетки-предшественники, DPBS — фосфатно-солевой буфер в среде Дульбекко, АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспартатаминотрансфераза, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, ГГТ — гамма-глутамилтранспептидаза.*
** Уровень значимости — p<0,05 по сравнению с контролем (t-критерий Стьюдента).*
*** Уровень значимости — p<0,05 по сравнению с контролем (критерий Манна–Уитни).*
Note. *GPCs, glial progenitor cells; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase.*
** The significance of differences from the control group was p<0.05 (Student t-test).*
*** The significance of differences from the control group was p<0.05 (Mann–Whitney test).*

[3] https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig4

Таблица 2. *Биохимические показатели крови мышей после введения низких доз глиальных клеток-предшественников*

Table 2. *Biochemical blood parameters of mice after glial progenitor cells administration at low doses*

Название группы *Group*	Номер животного *Animal*	Результаты анализа крови *Blood test findings*					
		АЛТ, Ед/л *ALT, U/L*	АСТ, Ед/л *AST, U/L*	ЛДГ, Ед/л *LDH, U/L*	ГГТ, Ед/л *GGT, U/L*	Билирубин общий, мкмоль/л *Total bilirubin, μmol/L*	АСТ/АЛТ *AST/ALT*
ГКП 150×10³ клеток *GPCs, 150×10³ cells*	1	26	83	767	0	4,8	3,2
	2	20	43	296	0	3,2	2,1
	3	26	119	883	0	4,9	4,6
	4	26	120	542	0	3,1	4,6
	5	26	85	279	0	2,5	3,3
	среднее *mean*	24,8	90	553,4	0	3,7	3,56
ГКП 50×10³ клеток *GPCs, 50×10³ cells*	1	26	95	399	0	2,8	3,7
	2	23	91	542	0	2,6	3,9
	3	52	67	351	0	2,8	1,3
	4	34	96	740	0	4,2	2,8
	5	23	59	314	0	3,1	2,5
	среднее *mean*	31,6	81,6	469,2	0	3,1	2,84
ГКП 15×10³ клеток *GPCs, 15×10³ cells*	1	29	49	375	0	3,1	1,7
	2	31	86	718	0	3,4	2,7
	3	42	64	528	0	3,1	1,5
	5	86	131	673	0	2,6	1,5
	среднее *mean*	47	82,5	573,5	0	3,05	1,85
Контроль (DPBS) *Control (DPBS)*	1	31	72	565	0	3,9	2,4
	2	28	103	1045	0	4,5	3,6
	3	26	85	530	0	2,9	3,3
	среднее *mean*	28,3	86,67	713,3	0	3,77	3,1

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *ГКП — глиальные клетки-предшественники, DPBS — фосфатно-солевой буфер в среде Дульбекко, АЛТ — аланин-аминотрансфераза, АСТ — аспартатаминотрансфераза, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, ГГТ — гамма-глутамилтранспептидаза.*
Note. *GPCs, glial progenitor cells; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase.*

в низких дозах было отмечено, что среднее число GFAP-позитивных клеток в коре головного мозга мышей, получавших ГКП в дозе 150×10³ кл./мышь, было достоверно выше, чем в группе контроля, при уровне значимости (p) равном 0,046 *(рис. 5)*. У животных, получавших ГКП в дозе 15×10³ и 50×10³ кл./мышь, не наблюдали статистически значимых различий с группой контроля. Количество GFAP-позитивных астроцитов коры головного мозга мышей после иммуногистохимического окрашивания представлено на *рисунке 6*, опубликованном на сайте журнала[4].

Количество IBA1-позитивных клеток в коре головного мозга мышей в группе животных, получавших ГКП в дозах 150×10³ и 50×10³ кл./мышь, было в среднем выше, чем у животных, которым вводили препарат в дозе 15×10³ кл./мышь, однако различий с группой контроля (введение DPBS) не отмечено *(рис. 7)*. Количество

[4] https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig6

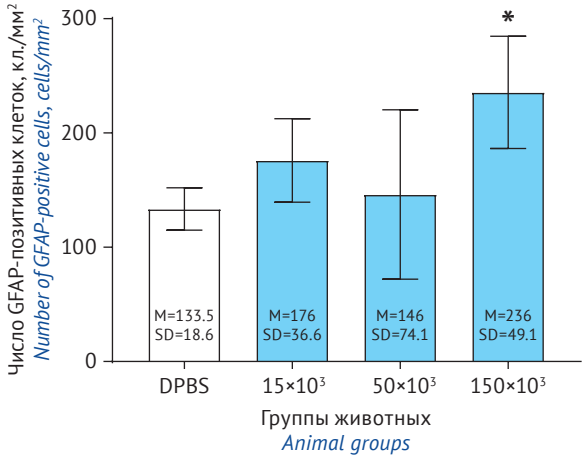


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным /
The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. *Результаты однофакторного дисперсионного анализа с корректировкой Даннета для множественных сравнений числа GFAP-позитивных клеток коры головного мозга мышей в группах животных, получавших 150×10³, 50×10³, 15×10³ глиальных клеток-предшественников или фосфатно-солевой буфер в среде Дульбекко (DPBS). M — среднее число GFAP-позитивных клеток, SD — стандартное отклонение, GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок.*
** Уровень значимости p<0.05*

Fig. 5. *One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test for the number of GFAP-positive cells in the cerebral cortex of mice after administration of glial progenitor cells at doses of 150×10³, 50×10³, or 15×10³ cells/mouse or Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS). M, mean number of GFAP-positive cells; SD, standard deviation; GFAP, glial fibrillary acidic protein.*
** The significance level was p<0.05*

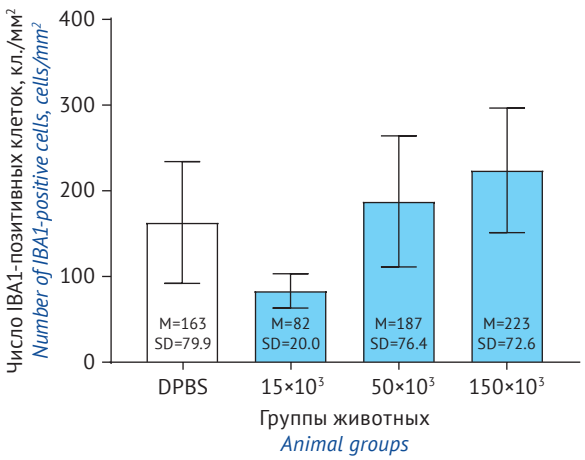


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным /
The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 7. *Результаты однофакторного дисперсионного анализа с корректировкой Даннета для множественных сравнений числа IBA1⁺-клеток коры головного мозга мышей в группах животных, получавших 150×10³, 50×10³, 15×10³ глиальных клеток-предшественников или фосфатно-солевой буфер (DPBS). M — среднее число IBA1-позитивных клеток, SD — стандартное отклонение, IBA1 — адаптер 1, связывающий ионизированный кальций*

Fig. 7. *One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test for the number of IBA1-positive cells in the cerebral cortex of mice after administration of glial progenitor cells at doses of 150×10³, 50×10³, or 15×10³ cells/mouse or Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS). M, mean number of IBA1-positive cells; SD, standard deviation; IBA1, ionised calcium-binding adaptor molecule 1*

IBA1-позитивной микроглии коры головного мозга мышей после иммуногистохимического окрашивания представлено на *рисунке 8*, опубликованном на сайте журнала[5].

Наиболее изученными клеточными трансплантатами для терапии различных неврологических заболеваний являются препараты на основе МСК и НСК человека [22, 24]. Показано, что МСК обладают иммуносупрессорными свойствами и как при ксеногенной, так и аллогенной трансплантации не вызывают значимых иммунологических реакций. Однако их длительное введение в организм все еще недостаточно изучено [25]. Внутривенное введение аллогенных МСК ($10×10^6$ кл./кг) крысам не приводило к значимым изменениям биохимических показателей через 2 недели после введения, однако вызывало воспаление легких [26]. В другом исследовании изучали безопасность двукратного внутривенного введения МСК, полученных из пуповины человека, крысам в дозах с различным количеством клеток (от $3,0×10^5$ до $1,5×10^7$ кл./кг, что примерно соответствует $9×10^3$–$4×10^6$ кл./мышь), при этом не было показано ни острой, ни долгосрочной токсичности клеток [27]. Длительное (11 мес.) введение НСК человека крысам не приводило к снижению жизнеспособности животных или к видимым негативным последствиям, однако детальное изучение безопасности авторы не проводили [28]. Кроме того, было показано, что интраназальное введение аллогенных НСК детям с церебральным параличом в течение 3 мес. не вызывало значительных побочных эффектов такой терапии и в целом оказалось безопасным для пациентов [29].

Данные по изучению влияния долгосрочного введения ГКП при аллогенной или ксеногенной трансплантации в литературе отсутствуют. Однако известны примеры исследований, направленных на изучение терапевтических свойств ГКП при различных неврологических заболеваниях и свидетельствующих об отсутствии значимых побочных эффектов по крайней мере при однократном применении глиальных клеток [30].

В нашем исследовании введение сниженных доз ($50×10^3$ и $15×10^3$ кл./мышь) ксеногенных клеток не влияло на изменение биохимических

[5] https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig8

показателей крови животных в отличие от более высоких доз. Влияния ГКП на поведение животных выявлено не было, однако такое влияние вполне может быть незаметно при малой использованной выборке. При этом было обнаружено, что введение ГКП в дозе 150×10³ кл./мышь оказывало влияние на активацию глии головного мозга животных, что может быть связано с особенностями метаболизма введенных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование по выбору дозы биомедицинского клеточного продукта на основе глиальных клеток-предшественников (ГКП), полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, при многократном внутривенном введении в ретроорбитальный венозный синус мышей. Полученные результаты могут быть использованы при инъекциях стволовых/прогениторных клеток для минимизации осложнений у животных в доклинических исследованиях и создания основы для безопасного применения клеточной терапии в клинической практике.

Изучен профиль безопасности длительного (30 и 60 сут) ретроорбитального введения ГКП как потенциального препарата для терапии неврологических заболеваний. Показано, что продолжительное многократное введение клеток в синус мышей в концентрации 500×10³ кл./мышь приводило к повышению уровня ферментов АЛТ, АСТ, ЛДГ и общего билирубина в крови животных, что может быть связано с развитием воспалительной реакции из-за накопления человеческих клеток в таких васкуляризированных органах, как печень и легкие. При этом в головном мозге не наблюдали изменения количества астроцитарных клеток (GFAP+). Введение сниженных доз ГКП (50×10³ и 15×10³ кл./мышь) не вызывало изменения уровней маркеров, ассоциированных с повреждением клеток (АЛТ, АСТ, ЛДГ, ГГТ), а также общего билирубина по сравнению с аналогичными параметрами в группе контроля. При изучении воспалительных процессов в головном мозге было обнаружено увеличение числа активированных астроцитов (GFAP+) после введения ГКП в дозе 150×10³ кл./мышь, в то время как количество активированной микроглии (IBA1+) не отличалось от контрольного значения во всех группах.

Настоящее исследование является пилотным, поскольку данные о безопасности длительного ретроорбитального введения ГКП получены впервые. На основании приведенных в этой работе результатов можно сделать вывод, что применение стволовых клеток в дозах, не превышающих 50×10³ кл./мышь, при выбранном способе введения не вызывает воспалительных реакций в головном мозге животных (низкие уровни GFAP и IBA1) и не изменяет биохимических показателей крови (АЛТ, АСТ, ЛДГ, ГГТ, общего билирубина), что подтверждает безопасность их введения в течение продолжительного времени. Введение клеток в дозах 150×10³ кл./мышь не вызывает изменения показателей крови животных, но влияет на состояние астроцитов и глии головного мозга. Возможно, в этом и заключается их воздействие на организм.

Полученные результаты свидетельствуют о важности подбора оптимальной дозы ГКП для проведения клеточной терапии, а также о потенциальной безопасности длительной терапии ГКП при соблюдении оптимальных условий дозирования. Необходимы дополнительные доклинические исследования с целью определения терапевтической эффективности установленных доз препарата, а также для разработки оптимального протокола клеточной терапии с использованием ГКП перед клиническими испытаниями.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Cecerska-Heryć E, Pękała M, Serwin N, Gliziewicz M, Grygorcewicz B, Michalczyk A, et al. The use of stem cells as a potential treatment method for selected neurodegenerative diseases: review. *Cell Mol Neurobiol*. 2023;43(6):2643–73. https://doi.org/10.1007/s10571-023-01344-6
2. Cherkashova EA, Burunova VV, Bukharova TB, Namestnikova DD, Gubskii IL, Salikhova DI, et al. Comparative analysis of the effects of intravenous administration of placental mesenchymal stromal cells and neural progenitor cells derived from induced pluripotent cells on the course of acute ischemic stroke in rats. *Bull Exp Biol Med*. 2019;166(4):558–66. https://doi.org/10.1007/s10517-019-04392-5
3. Наместникова ДД, Губский ИЛ, Салихова ДИ, Леонов ГЕ, Сухинич КК, Мельников ПА и др. Терапевтическая эффективность внутриартериального введения нейральных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, при остром экспериментальном ишемическом инсульте у крыс. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019;21(1):153–64.
Namestnikova DD, Gubskiy IL, Salikhova DI, Leonov GE, Sukhinich KK, Melnikov PA, et al. Therapeutic efficacy of intra-arterial administration of induced pluripotent stem cells-derived neural progenitor cells in acute experimental ischemic stroke in rats. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019;21(1):153–64 (In Russ.). https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-1-153-164
4. Kalladka D, Sinden J, Pollock K, Haig C, McLean J, Smith W, et al. Human neural stem cells in patients with chronic

ischaemic stroke (PISCES): a phase 1, first-in-man study. *Lancet*. 2016;388(10046):787–96. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30513-x
5. Garitaonandia I, Gonzalez R, Christiansen-Weber T, Abramihina T, Poustovoitov M, Noskov A, et al. Neural stem cell tumorigenicity and biodistribution assessment for phase I clinical trial in Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2016;6:34478. https://doi.org/10.1038/srep34478
6. Neves AF, Camargo C, Premer C, Hare JM, Baumel BS, Pinto M. Intravenous administration of mesenchymal stem cells reduces Tau phosphorylation and inflammation in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2021;341:113706. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113706
7. Wang Z, Peng W, Zhang C, Sheng C, Huang W, Wang Y, Fan R. Effects of stem cell transplantation on cognitive decline in animal models of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5:12134. https://doi.org/10.1038/srep12134
8. Zhang Y, Ren Z, Zou C, Wang S, Luo B, Li F, et al. Insulin-producing cells from human pancreatic islet-derived progenitor cells following transplantation in mice. *Cell Biol Int*. 2011;35(5):483–90. https://doi.org/10.1042/cbi20100152
9. Yasuhara T, Matsukawa N, Hara K, Yu G, Xu L, Maki M, et al. Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2006;26(48):12497–511. https://doi.org/10.1523/jneurosci.3719-06.2006
10. Ryu JK, Kim J, Cho SJ, Hatori K, Nagai A, Choi HB, et al. Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease. *Neurobiol Dis*. 2004;16(1):68–77. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.01.016
11. Lee H, Yun S, Kim IS, Lee IS, Shin JE, Park SC, et al. Human fetal brain-derived neural stem/progenitor cells grafted into the adult epileptic brain restrain seizures in rat models of temporal lobe epilepsy. *PLoS One*. 2014;9(8):e104092. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104092
12. Karvelas N, Bennett S, Politis G, Kouris N-I, Kole C. Advances in stem cell therapy in Alzheimer's disease: a comprehensive clinical trial review. *Stem Cell Investig*. 2022;9:2. https://doi.org/10.21037/sci-2021-063
13. Tiwari S, Khan S, Kumar SV, Rajak R, Sultana A, Abjal Pasha S, et al. Efficacy and safety of neural stem cell therapy for spinal cord injury: a systematic literature review. *Therapie*. 2021;76(3):201–10. https://doi.org/10.1016/j.therap.2020.06.011
14. Wang Y, Yi H, Song Y. The safety of MSC therapy over the past 15 years: a meta-analysis. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):545. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02609-x
15. Wuputra K, Ku C-C, Wu D-C, Lin Y-C, Saito S, Yokoyama KK. Prevention of tumor risk associated with the reprogramming of human pluripotent stem cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):100. https://doi.org/10.1186/s13046-020-01584-0
16. Chapelin F, Khurana A, Moneeb M, Gray Hazard FK, Ray Chan CF, Nejadnik H, et al. Tumor formation of adult stem cell transplants in rodent arthritic joints. *Mol Imaging Biol*. 2019;21(1):95–104. https://doi.org/10.1007/s11307-018-1218-7
17. Zhou Q, Li T, Wang K, Zhang Q, Geng Z, Deng S, et al. Current status of xenotransplantation research and the strategies for preventing xenograft rejection. *Front Immunol*. 2022;13:928173. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.928173
18. Moll G, Ankrum JA, Kamhieh-Milz J, Bieback K, Ringden O, Volk H-D, et al. Intravascular mesenchymal stromal/stem cell therapy product diversification: time for new clinical guidelines. *Trends Mol Med*. 2019;25(2):149–63. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.12.006
19. Boltze J, Jolkkonen J. Safety evaluation of intra-arterial cell delivery in stroke patients — a framework for future trials. *Ann Transl Med*. 2019;7(Suppl 8):S271. https://doi.org/10.21037/atm.2019.12.07
20. Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M, Hoogstraten-Miller S. Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim (NY)*. 2011;40(5):155–60. https://doi.org/10.1038%2Flaban0511-155
21. Белоусова ЕВ, Салихова ДИ, Небогатиков ВО, Устюгов АА, Гольдштейн ДВ. Терапия болезни Альцгеймера на основе стволовых клеток. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2024;(1):52–60.
Belousova EV, Salikhova DI, Nebogatikov VO, Ustyugov AA, Goldshtein DV. Stem cell-based therapy for Alzheimer's disease. *Laboratory Animals for Science*. 2024;(1):52–60 (In Russ.). https://doi.org/10.57034/2618723X-2024-01-06
22. Salikhova D, Bukharova T, Cherkashova E, Namestnikova D, Leonov G, Nikitina M, et al. Therapeutic effects of hiPSC-derived glial and neuronal progenitor cells-conditioned medium in experimental ischemic stroke in rats. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4694. https://doi.org/10.3390/ijms22094694
23. Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L, Shi Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(6):747–54. https://doi.org/10.1038/aps.2013.50
24. Jovic D, Yu Y, Wang D, Wang K, Li H, Xu F, et al. A brief overview of global trends in MSC-based cell therapy. *Stem Cell Rev Rep*. 2022;18(5):1525–45. https://doi.org/10.1007/s12015-022-10369-1
25. Podestà MA, Remuzzi G, Casiraghi F. Mesenchymal stromal cells for transplant tolerance. *Front Immunol*. 2019;10:1287. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01287
26. Chin S-P, Saffery NS, Then K-Y, Cheong S-K. Preclinical assessments of safety and tumorigenicity of very high doses of allogeneic human umbilical cord mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2024;60(3):307–19. https://doi.org/10.1007/s11626-024-00852-z
27. Xu J, Liu G, Wang X, Hu Y, Luo H, Ye L, et al. hUC-MSCs: evaluation of acute and long-term routine toxicity testing in mice and rats. *Cytotechnology*. 2022;74(1):17–29. https://doi.org/10.1007/s10616-021-00502-2
28. Kyung J, Kim D, Shin K, Park D, Hong S-C, Kim TM, et al. Repeated intravenous administration of human neural stem cells producing choline acetyltransferase exerts anti-aging effects in male F344 rats. *Cells*. 2023;12(23):2711. https://doi.org/10.3390/cells12232711
29. Lv Z, Li Y, Wang Y, Cong F, Li X, Cui W, et al. Safety and efficacy outcomes after intranasal administration of neural stem cells in cerebral palsy: a randomized phase 1/2 controlled trial. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):23. https://doi.org/10.1186/s13287-022-03234-y
30. Rogujski P, Lukomska B, Janowski M, Stanaszek L. Glial-restricted progenitor cells: a cure for diseased brain? *Biol Res*. 2024;57(1):8. https://doi.org/10.1186/s40659-024-00486-1

Дополнительная информация. На сайте журнала «*Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*» размещены рисунки 4, 6 и 8.
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig4
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig6
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig8

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *В.О. Небогатиков* — планирование исследования, выполнение эксперимента, проведение сравнительного анализа полученных результатов; сбор данных литературы; *Д.И. Салихова* — выполнение эксперимента, анализ полученных данных, систематизация и оформление результатов исследования, редактирование текста рукописи, сбор данных литературы; *Е.В. Белоусова* — работа с клеточными линиями, проведение вычислений, выполнение сравнительного анализа полученных результатов, работа с графическим материалом; *Е.В. Броновицкий* — работа с животными, статистическая обработка данных, редактирование текста рукописи; *Е.А. Орлова* — работа с лабораторными животными, редактирование текста рукописи; *М.А. Лапшина* — работа с клеточными линиями, редактирование текста рукописи; *Д.В. Гольдштейн, А.А. Устюгов* — основная идея исследования, редактирование текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Соответствие принципам этики. Проведение исследования было одобрено на заседании локального биоэтического комитета ИФАВ РАН (протоколы заседаний № 80 от 28.07.2023; № 81 от 30.08.2023).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования ИФАВ РАН за возможность использовать животных из биоресурсной коллекции с привлечением аппаратной базы Центра (Госзадание № FFSG-2024-0020).

Additional information. Figures 4, 6, and 8 are published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig4
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig6
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig8

Authors' contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Vladimir O. Nebogatikov* designed the study, conducted the experiments and the comparative analysis of the results obtained, and collected literature data. *Diana I. Salikhova* conducted the experiments, analysed the data obtained, collated and presented the study results, edited the manuscript, and collected literature data. *Ekaterina V. Belousova* worked with cell lines, performed calculations, conducted the comparative analysis of the results obtained, and worked with the graphical material. *Evgeny V. Bronovitsky* worked with animals, performed statistical processing of data, and edited the manuscript. *Ekaterina A. Orlova* worked with animals and edited the manuscript. *Mariya A. Lapshina* worked with cell lines and edited the manuscript. *Dmitry V. Goldshtein* and *Aleksey A. Ustyugov* conceived the main idea of the study, edited the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was approved at a meeting of the Local Bioethics Committee of the Institute of Physiologically Active Compounds (IPAC) of the Russian Academy of Sciences (RAS) (minutes of meetings No. 80 of 28.07.2023 and No. 81 of 30.08.2023).

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the Centre for Collective Use (IPAC, RAS) for the opportunity to use animals from the Bioresource Collection using the equipment of the Centre (State Assignment No. FFSG-2024-0020).

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Небогатиков Владимир Олегович, канд. биол. наук / **Vladimir O. Nebogatikov**, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2454-9255
Салихова Диана Ирековна, канд. биол. наук / **Diana I. Salikhova**, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7842-7635
Белоусова Екатерина Владимировна / **Ekaterina V. Belousova**
Броновицкий Евгений Вадимович / **Evgeny V. Bronovitsky**
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8321-0729
Орлова Екатерина Андреевна / **Ekaterina A. Orlova**
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5415-1523
Лапшина Мария Александровна, канд. биол. наук / **Mariya A. Lapshina**, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5111-5241
Гольдштейн Дмитрий Вадимович, д-р биол. наук, профессор / **Dmitry V. Goldshtein**, Dr. Sci. (Biol.), Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2438-1605
Устюгов Алексей Анатольевич, д-р биол. наук / **Aleksey A. Ustyugov**, Dr. Sci. (Biol.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1977-4797

Поступила 16.04.2024
После доработки 23.07.2024
Принята к публикации 21.08.2024
Online first 25.10.2024

Received 16 April 2024
Revised 23 July 2024
Accepted 21 August 2024
Online first 25 October 2024