

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской
Федерации
(Сеченовский Университет)

Методические рекомендации по дисциплине:

МЕДИЦИНСКАЯ БИОХИМИЯ

основная профессиональная образовательная программа
высшего образования - программа специалитета

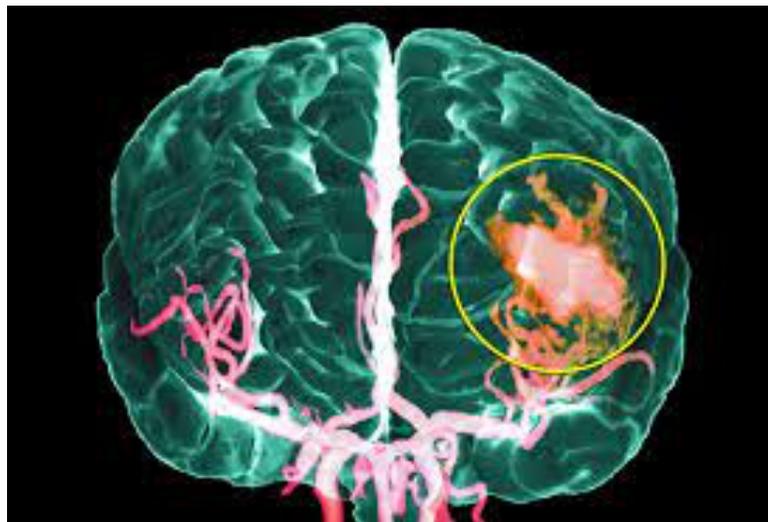
33.05.01 Фармация

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ

ЛЕКЦИЯ 1

Горенкова НА
доцент кафедры биохимии
Сеченовского Университета

Молекулярные механизмы нейродегенеративных нарушений при инсульте мозга



СИМПТОМЫ ИНСУЛЬТА



Улыбка:
кривая

Движение:
слабость
в руке

Артикуляция:
нарушена речь

Решение:
звони
03(103)

Десять ведущих причин смерти в мире по данным Всемирной организации здравоохранения



Итого **21,9%** случаев составляют болезни сердечно-сосудистой системы

SIGNS OF A STROKE



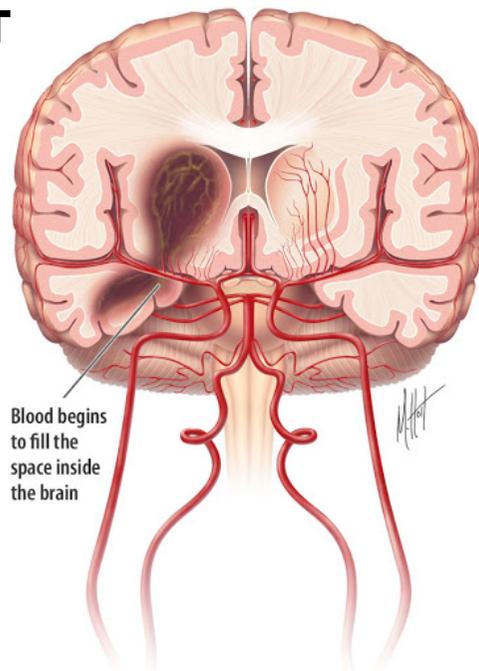
Remember, recognize these signs and act **FAST!**



Типы инсульта головного мозга

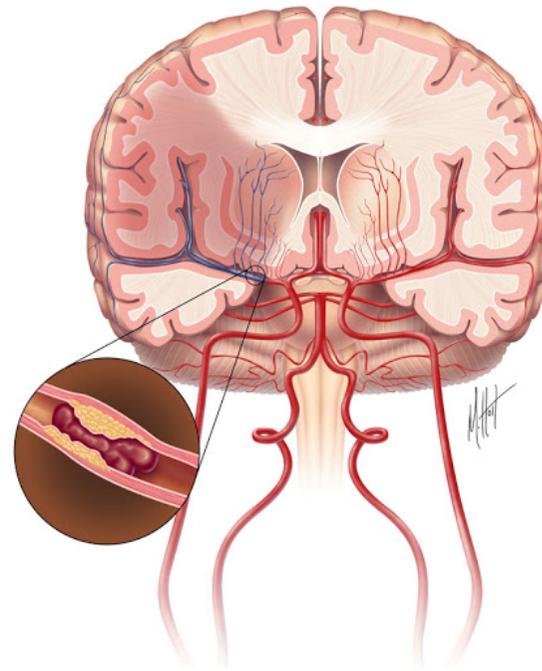
Инсульт – это острое нарушение мозгового кровообращения, симптомы которого сохраняются более одних суток

Геморрагический инсульт



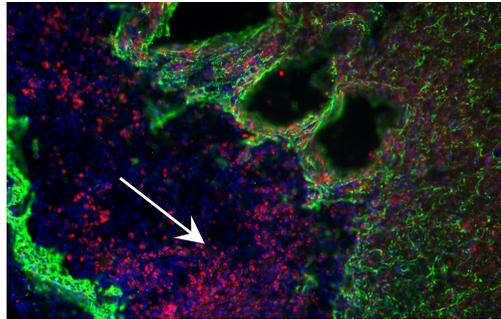
Ишемический инсульт

(инфаркт мозга, ишемия мозга)



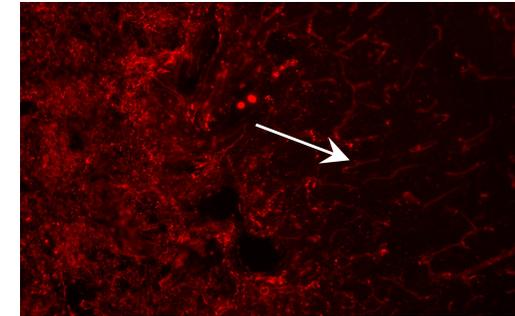
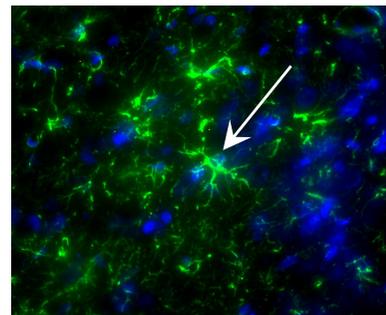
Нейродегенеративные изменения в тканях мозга после ишемического инсульта

активация
микроглии и
макрофагов

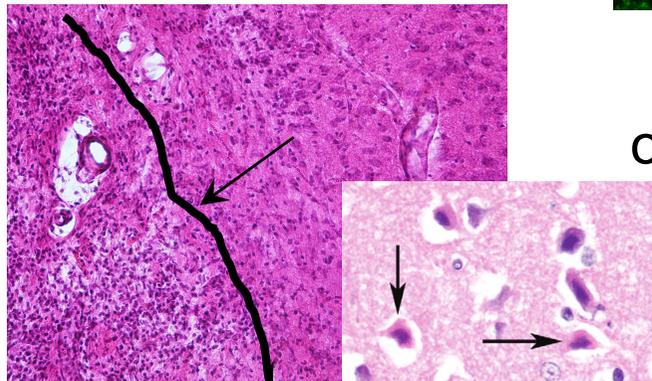


экспрессия
медиаторов воспаления:
цитокины IL1, IL6, TNF- α ,
а также C-peptide, ICAM-1,
VCAM, S/P-selectin, VWF,
глутамат)

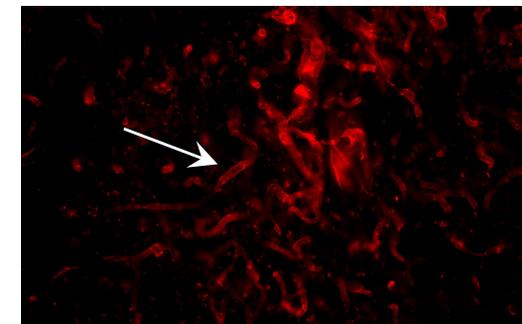
разрастание
нейроглии
(астроциты)
и процесс
рубцевания



нарушение локального
кровоснабжения,
с последующей
интенсивной
реваскуляризацией



отмирание
нервных
клеток
(некроз)



Молекулярные патологические механизмы при недостатке снабжения кислородом тканей мозга

гипоксическая
ишемия
тканей

перекисное
окисление
липидов

запуск
воспалительных
процессов

некроз

апоптоз

реперфузионное
повреждение
тканей

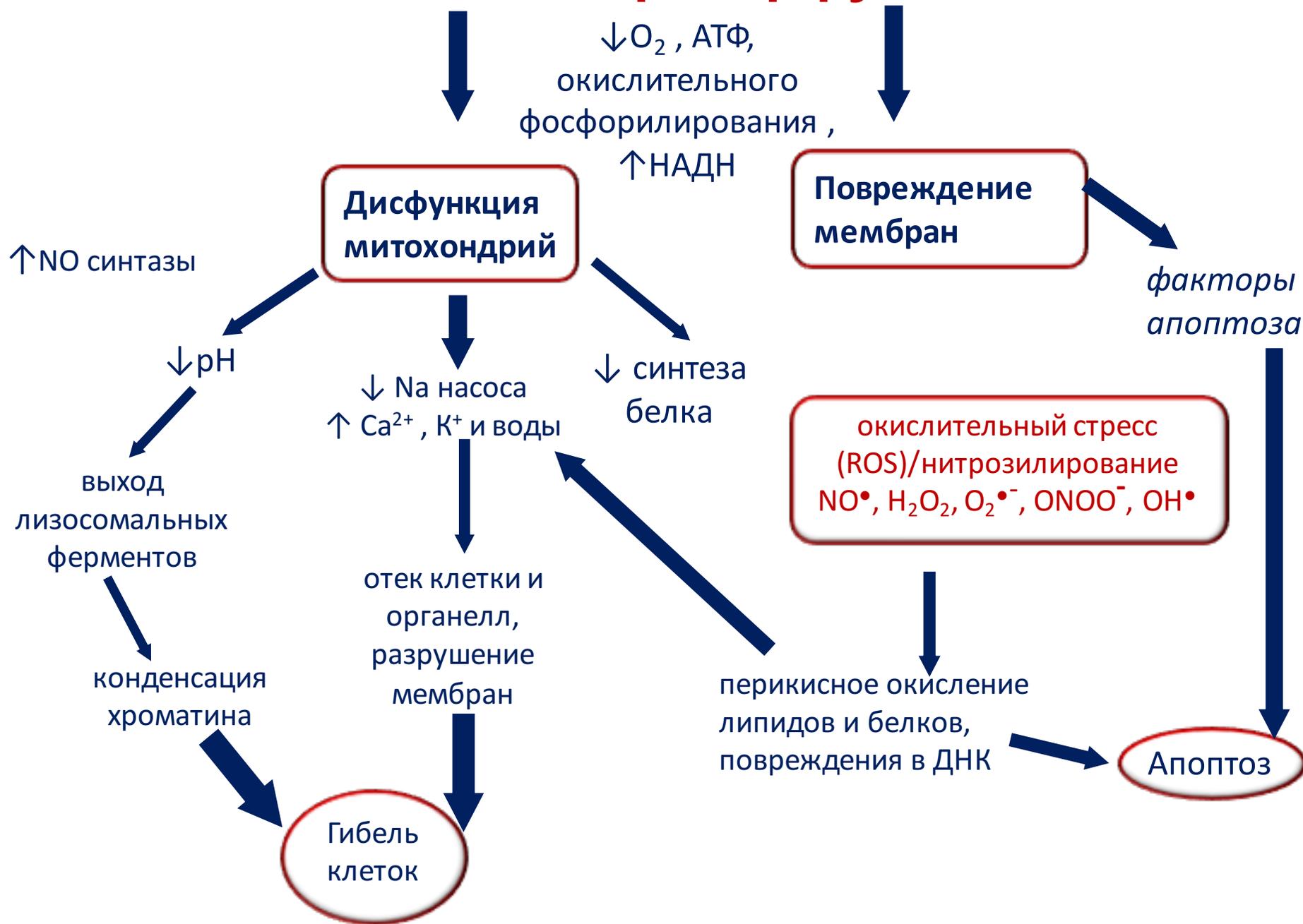
рубцевание
тканей

Постишемическая цитотоксичность и окислительный стресс в результате ишемии-реперфузии

Патогенез развития перекисного окисления липидов мембран с последующей гибелью клеток развивается в результате постгипоксической нехватки кислорода в тканях мозга, приводящей к утечке электронов из ЦПЭ и накоплению НАДН+Н в митохондриях.

Дальнейшая реоксигенация тканей приводит к массовому формированию свободных форм кислорода и активных радикалов. В результате такие частицы атакуют липиды мембран, белки клеток, наряду с повреждением структуры ДНК. Это приводит к обструкции мембран, невозможности работы ядерного аппарата и клеточной гибели.

Причины клеточной гибели в результате ишемии-реперфузии



Ключевые патогенетические изменения при некрозе и апоптозе

охватывает группу клеток

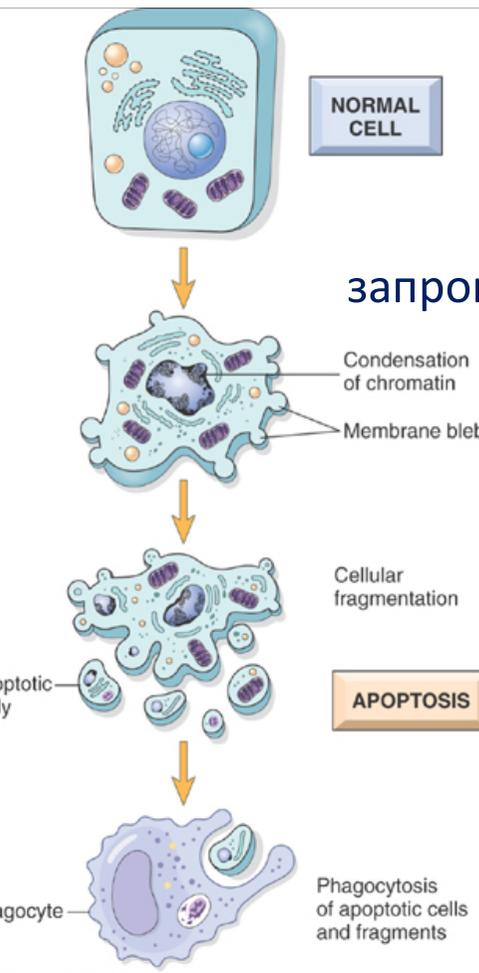
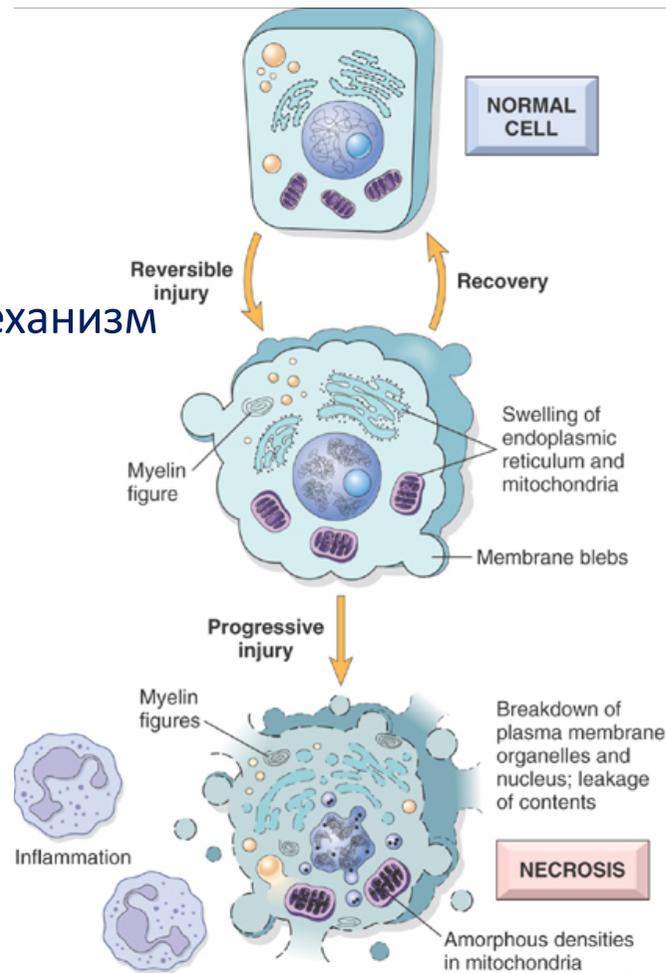
пассивный механизм развития

без затрат АТФ

разрушение органелл

выход клеточного содержимого

сильный воспалительный ответ



единичный клеточный ответ

запрограммированная смерть клеток

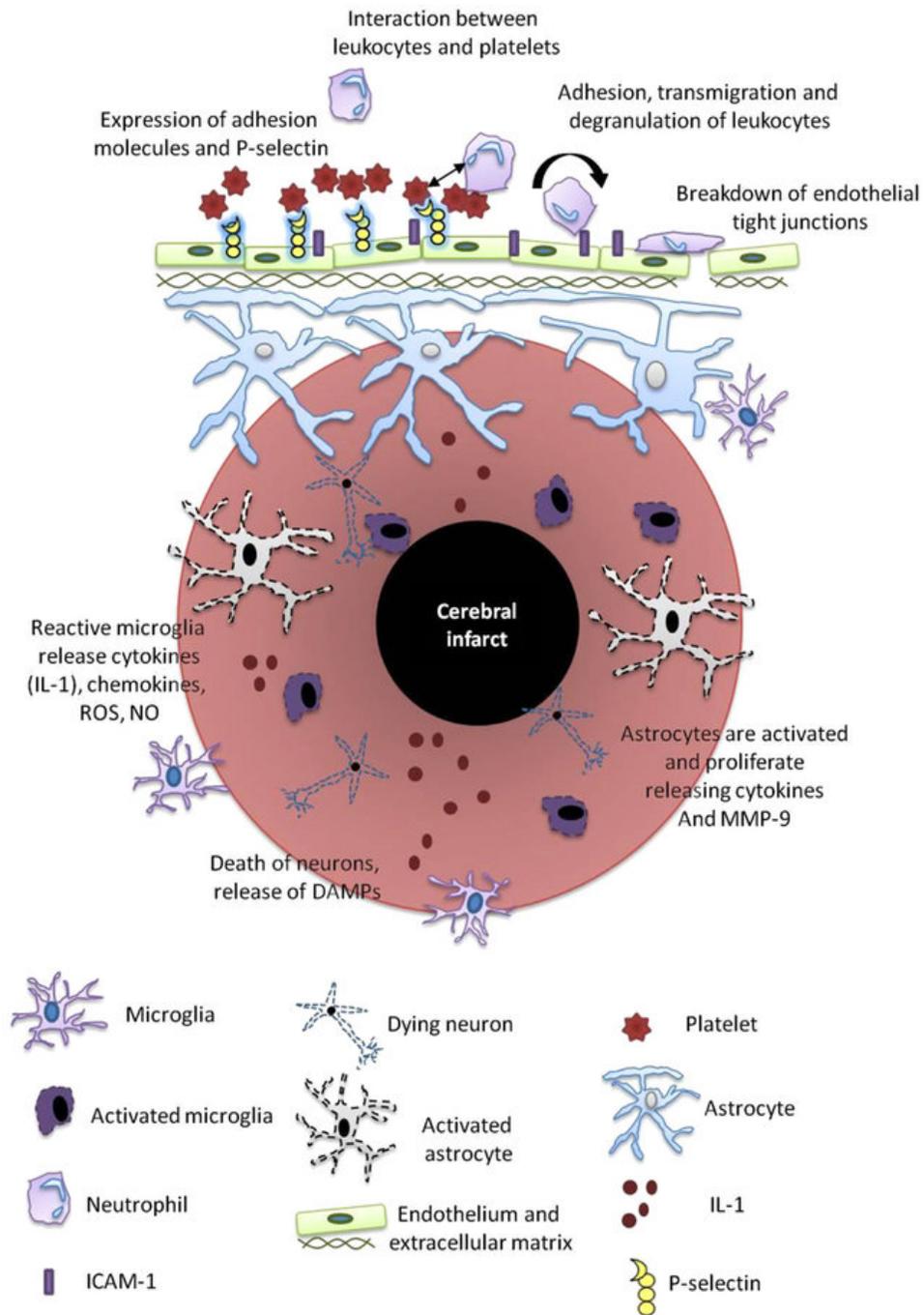
расход АТФ

без утраты целостности мембран

минимальный выброс содержимого клетки

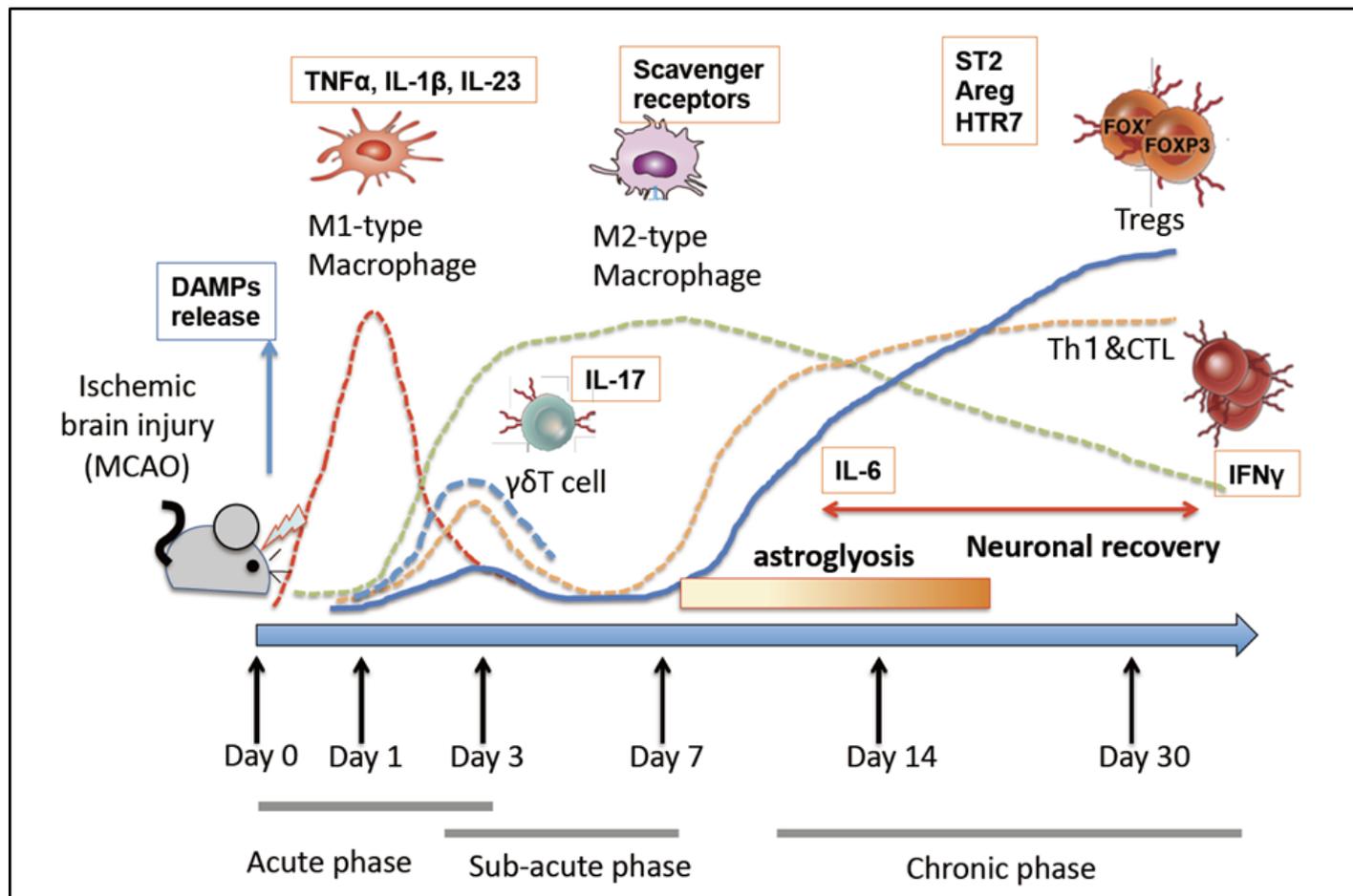
минимальный воспалительный ответ

Развитие воспалительной реакции при инсульте:



Молекулярные механизмы развития воспаления после инсульта имеют множественный характер, и затрагивают множество каскадом и молекулярных механизмов одновременно. В этом состоит суть мгновенно развивающихся осложнений и сложность их последующей коррекции. Такие механизмы могут включать локальный иммунный ответ микроглии, астроцитов, нейтрофилов, тромбоцитов, эндотелия мозга. Эти клетки высвобождают медиаторы, которые запускают воспалительный процесс, включающий синтез активных форм кислорода (ROS), оксида азота (NO), молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (DAMPs), металлопротеиназ (MMP), адгезивных молекул (ICAM) и интерлейкинов (IL-1)

Временные характеристики развития воспалительного ответа

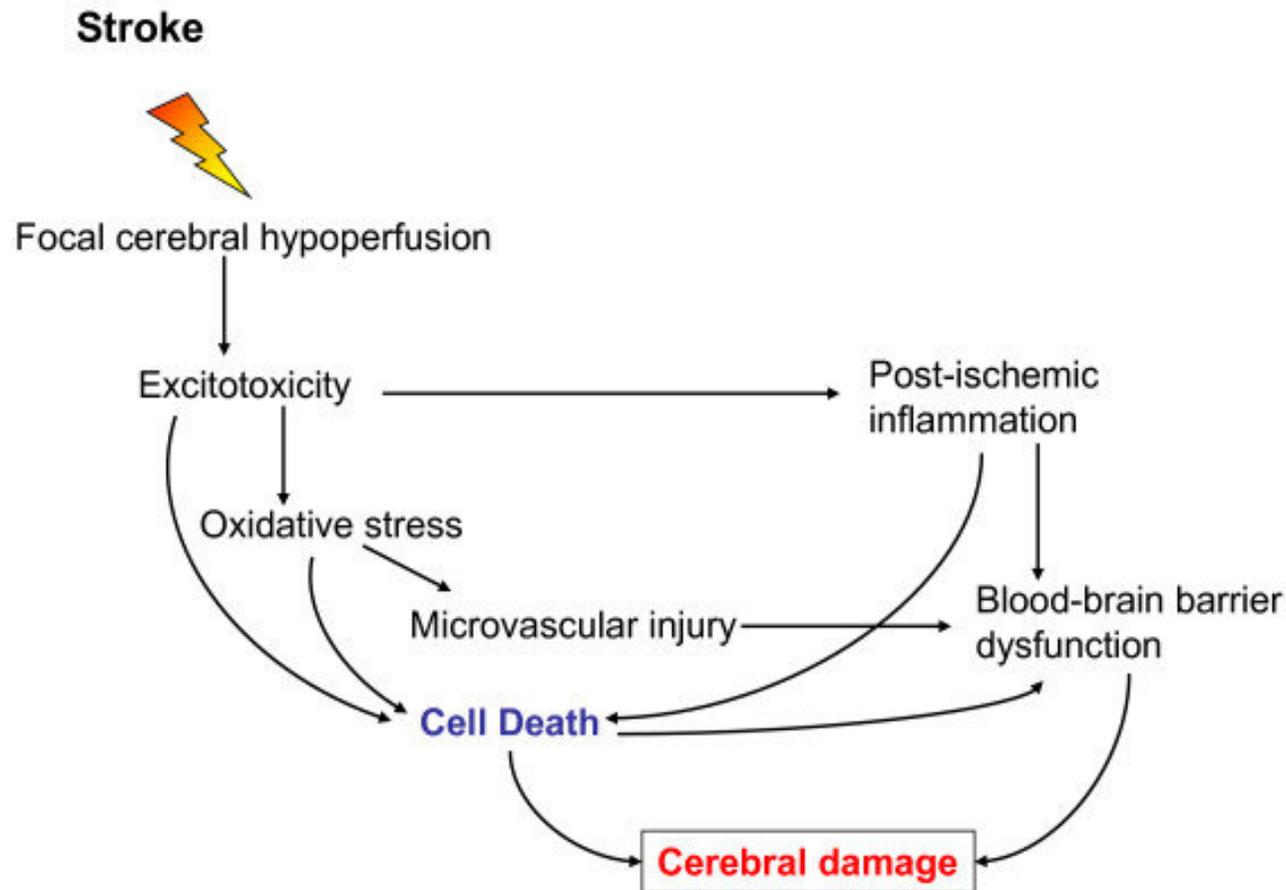


острая фаза:
0-3 день

подострая фаза:
3-10 дней

хроническая фаза:
10-30 дней

Общая схема патологических изменений после ишемического инсульта, приводящая к клеточной гибели и отмиранию тканей, и соответственно к функциональной несостоятельности пациента



Адаптационные изменения в тканях мозга после ишемического инсульта

НЕЙРОГЕНЕЗ

активация процессов
образования стволовых клеток в
определенных зонах мозга
(субвентрикулярная зона,
зубчатая извилина)

Низкая эффективность:

Адаптационная активация пост-
ишемического нейрогенеза чаще
всего не приводит к дальнейшей
нейрональной дифференцировке
(в основном глиальная
детерминанта)

АНГИОГЕНЕЗ

активация процессов образования
и роста новых сосудов,
в дальнейшем приводящая к
функционально активному
сосудистому руслу

Низкая эффективность:

Спонтанная ревазуляризация,
однако, не приводит к
образованию функционально
активного сосудистого русла ни
в зоне отмершей ткани, ни в
зоне *penumbra*

Терапевтические подходы к лечению последствий ишемического повреждения тканей головного мозга

- Антикоагуляционная терапия (аспирин, варфарин, статины)
- Тромболизис (tPA) и тромбоэкстракция («ловушки»)
- Терапия стволовыми клетками
- Использование нанотехнологий
- Комбинированное применение наноматериалов, стволовых клеток и физиологически активных веществ

Список используемой литературы:

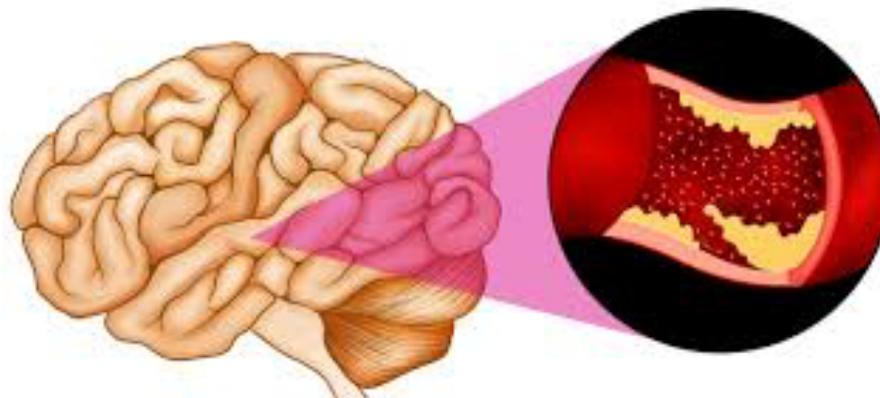
1. Bruce C V Campbell, Pooja Khatri. Stroke. *The Lancet*. 2020. SEMINAR: V:396, I:10244, P:129-142, July 1. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31179-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31179-X)
2. K.N. Murray, A.R. Parry-Jones & S.M. Allan. *Front. Cell. Neurosci.* Interleukin-1 and acute brain injury . <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00018>
3. Ito M, Srirat T, Nakamura T, Komai K, Yoshimura A. Ischemic Brain Injury and Regulatory T Cells. *OBM Neurobiology*. 2019. 3(1):19. doi:10.21926/obm.neurobiol.1901023
4. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of Translational Medicine*. 7(1):97. DOI: 10.1186/1479-5876-7-97
5. Sakai S, Shichita T. Inflammation and neural repair after ischemic brain injury. *Neurochem Int*. 2018.
6. Gary H. Danton and W. Dalton Dietrich. The Search for Neuroprotective Strategies in Stroke. *American Journal of Neuroradiology* . February 2004, 25 (2) 181-194.
7. Cell Death. RS. Hotchkiss, M.D., Andreas Strasser, Ph.D., JE. McDunn, and PE. Swanson, M.D. *N Engl J Med* 2009; 361:1570-1583. DOI: 10.1056/NEJMra0901217

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ

ЛЕКЦИЯ 2

Горенкова НА
доцент кафедры биохимии
Сеченовского Университета

**Терапевтические способы коррекции
последствий нейродегенеративных нарушений
в постинсультном состоянии**



1 тема:

Антикоагуляционная терапия,
тромболизис (tPA) и тромбоэкстракция

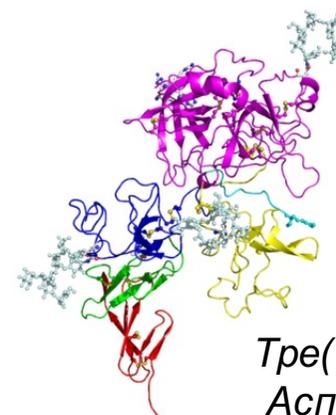
Терапевтические подходы к лечению последствий ишемического повреждения тканей головного мозга

- Антикоагуляционная терапия (аспирин, варфарин, статины)
- Тромболизис (препараты на основе tPA) (*единственный препарат одобренный FDA*)
- Тромбоэкстракция («ловушки»)
- Терапия стволовыми клетками
- Использование нанотехнологий
- Комбинированное применение наноматериалов, стволовых клеток и физиологически активных веществ

Наиболее известные препараты используемыми в тромболитической терапии острого инсульта

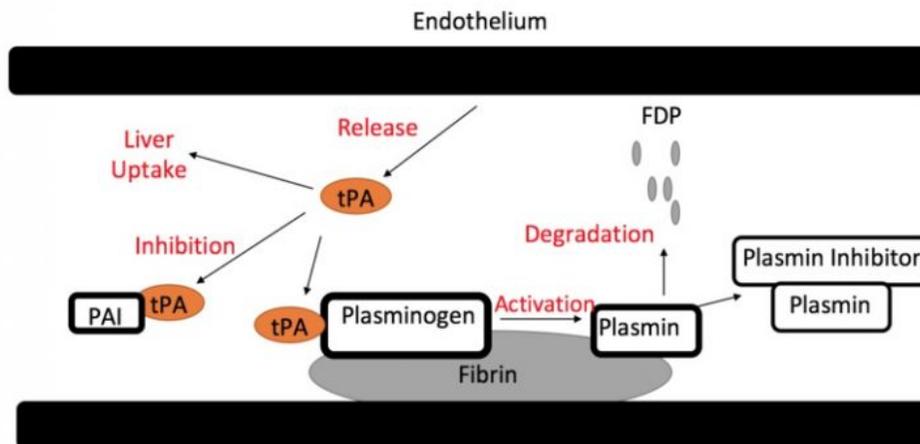
Альтеплаза:
препарат «второго поколения», специфически активирующий связанный с фибрином плазминоген, превращая его тем самым в плазмин

Теноплаза:
препарат «третьего поколения», генетически модифицированный тканевой активатор плазминогена, с целью повышения сохранности и эффективности



замены:
Тре(103) на Асп,
Асп(117) на Глу,
1 домен крингл,
замена в домене
протеазы

Схема действия тканевого активатора плазминогена:



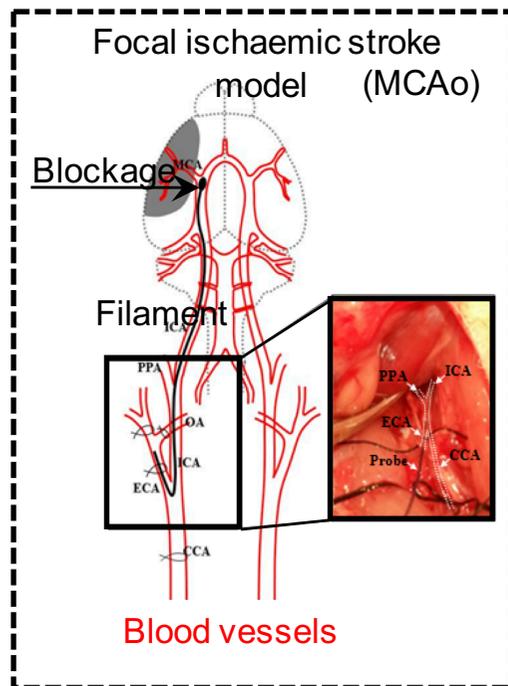
FDP =
продукты
деградации
фибрина

Ишемический инсульт: модели на животных

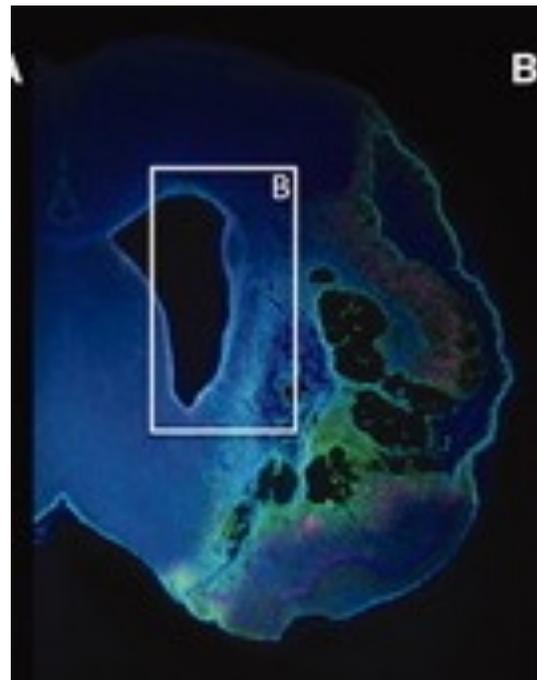
Валидация модели с использованием поведенческого тестирования (неврологический дефицит, локомоторная активность, способность к обучению)

Степень нейродегенеративных повреждений мозга оценивают с помощью иммуногистохимического анализа

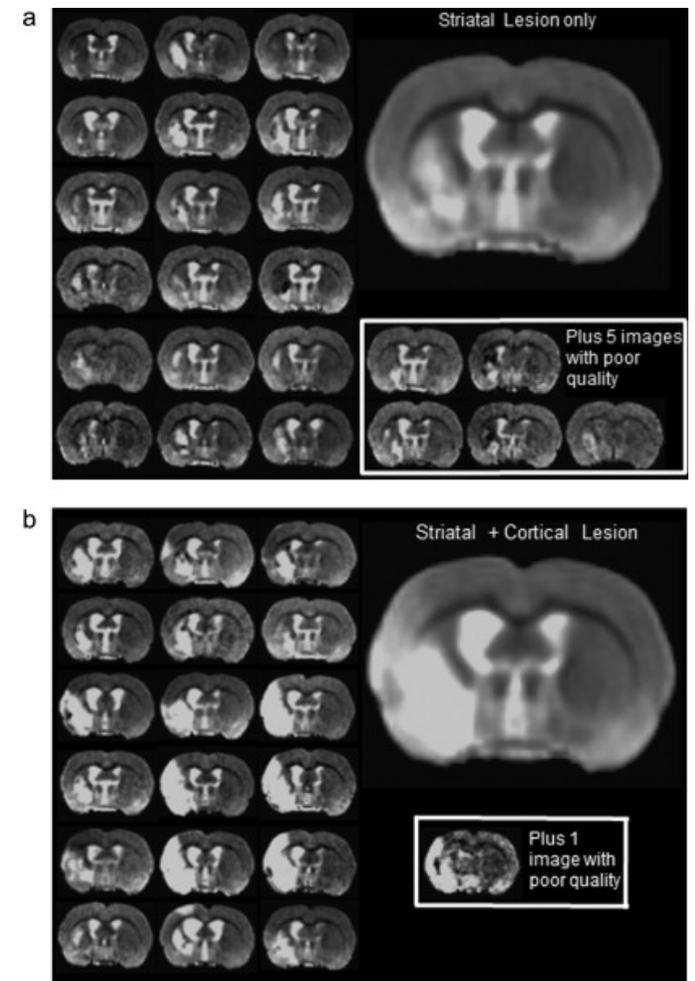
Неинвазивные методы определения повреждений нервной ткани: СТ, МРТ



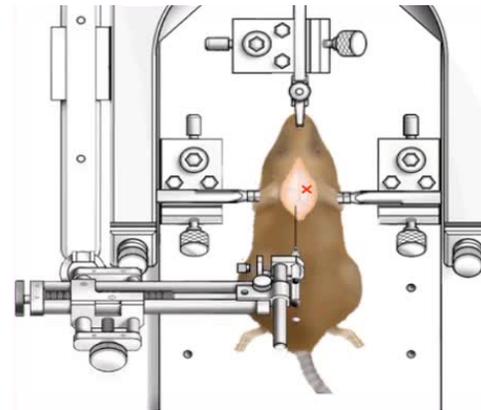
DOI: 10.1161/str.27.9.1616



<https://doi.org/10.1002/stem.1024>



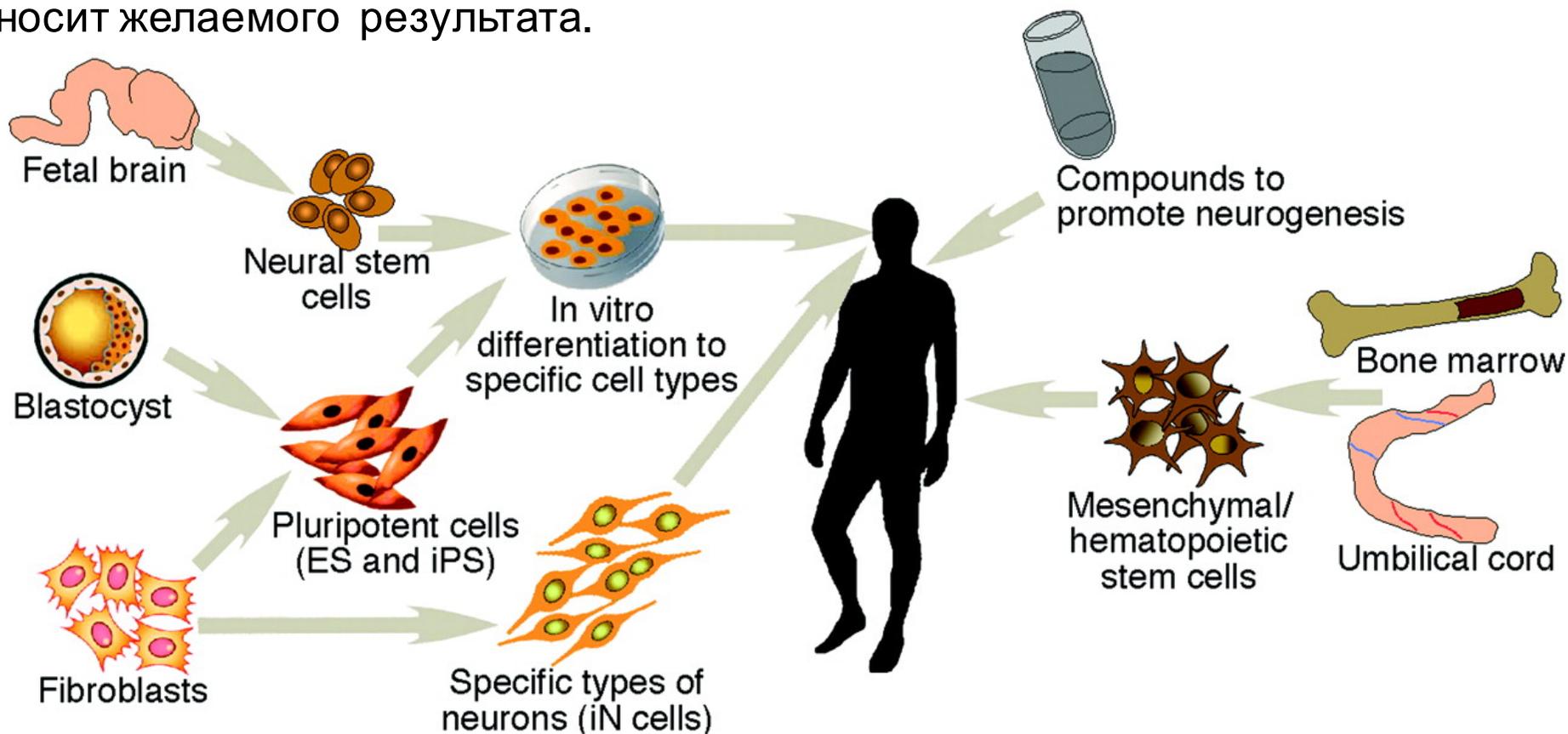
В зависимости от места локализации дегенеративного повреждения (в нашем случае, инфаркта нервных тканей головного мозга), используют различные методы введения материалов и/или препаратов. Это может быть внутривенное или внутримозговое введение. Так, если повреждения локализованы в срединной области головного мозга, для введения препарата используют систему стереотаксических координат.



Тема 2:

Терапия стволовыми клетками

При лечении патологических изменений в тканях мозга, вызванных острым ишемическим инсультом, может применяться терапия стволовыми клетками. В основном такую терапию применяют для коррекции нейродегенеративных изменений, которые выражаются в массовом отмирании так называемой «нервно-сосудистой ниши», процессе, который уже нельзя остановить и можно лишь пытаться восстановить впоследствии. За 30 лет интенсивных исследований в этом направлении имеются довольно успешные результаты, однако степень риска и осложнений, при переходе от лабораторных манипуляций с моделями к клиническим испытаниям на добровольцах, остается довольно высокой и не приносит желаемого результата.



Типы клеточных культур, применяемые в терапии инсульта, дозы и временные интервалы:

CTX – стволовые клетки человека

HSCs – гемапоэтические стволовые клетки

MAPCs – плюрипотентные клетки-предшественники

MNCs – моноклеарные клетки

MSCs – мезенхимные стволовые клетки

Reports	Stem cell type	Route	Dose	Timing
Laboratory studies				
Mays et al. [59]	MAPCs	i.c.	0.4 million	7 days
Mays et al. [59]	MAPCs	i.v.	4 million	1–7 days
Acosta et al. [89]	MSCs	i.v.	4 million	60 days
Borlongan et al. [90]	MSCs	i.c.	0.2 million	3 hours
Clinical trials				
Bang et al. [45]	MSCs	i.v.	100 million	4 weeks
Savitz et al. [46]	MNCs	i.v.	100 million	1–3 days
Prasad et al. [47]	MNCs	i.v.	280.75 million	18.5 days
Banerjee et al. [48]	HSCs	i.a.	100 million	7 days
Hess et al. [49]	MAPC	i.v.	400–1,200 million	24–48 hours
Steinberg et al. [50]	SB623	i.c.	2.5–10 million	6–60 months
Hess et al. [60]	MAPC	i.v.	1,200 million	18–36 hours
Kalladka et al. [91]	CTX-DP	i.c.	2–20 million	6–60 months
Lee et al. [92]	MSCs	i.v.	50 million	4 weeks

Терапия стволовыми клетками человека имеет определенные положительные результаты, включая промотирование нейро- и ангиогенеза

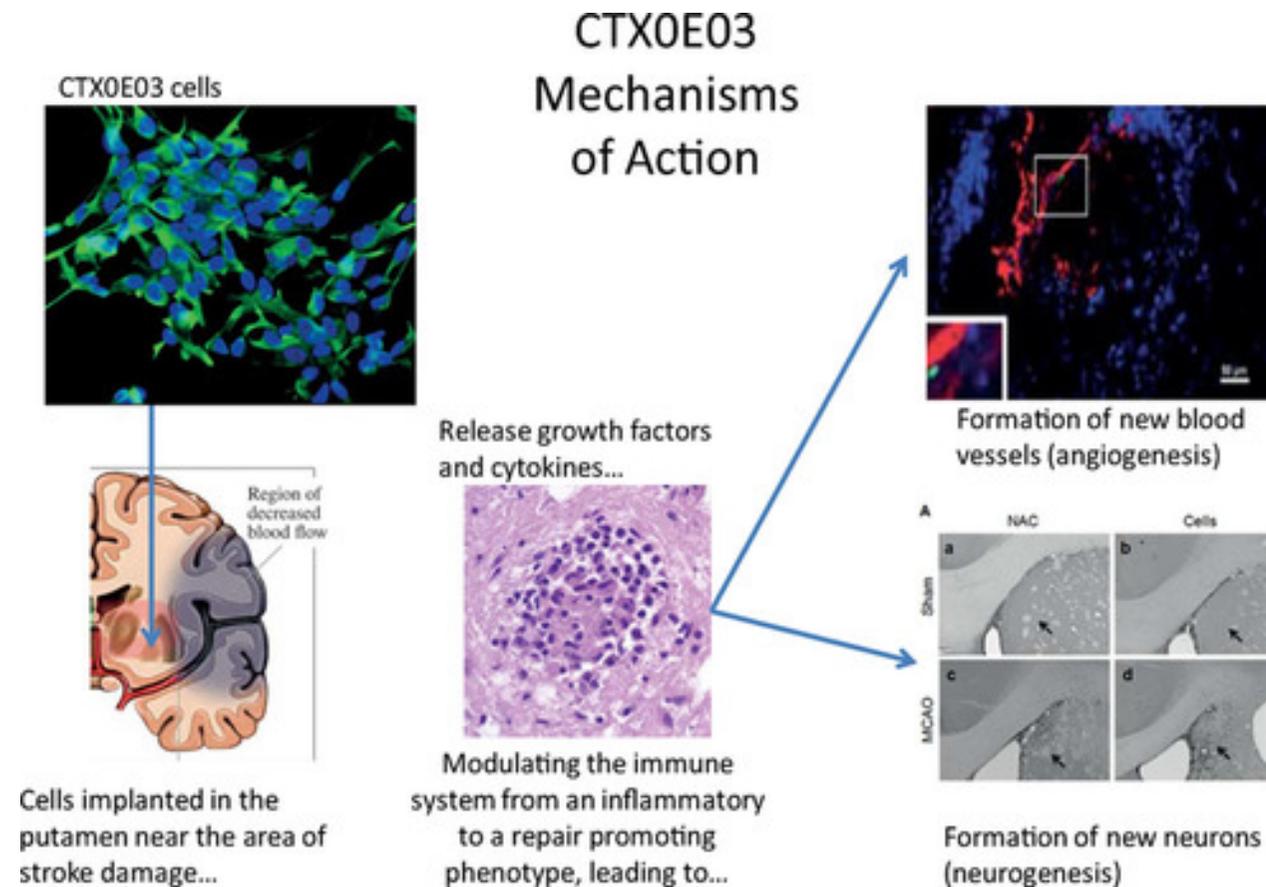
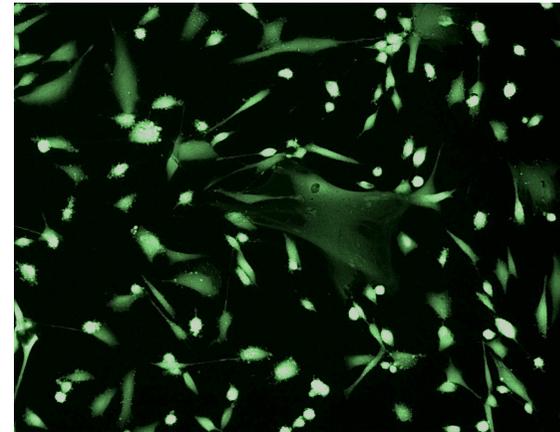
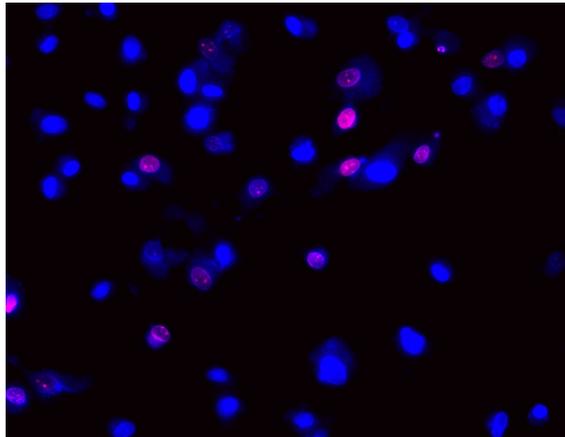


Figure 3. Summary of CTX cells mechanisms of action in ischemic stroke. Reprinted from Sinden et al⁷⁸ with permission. Copyright ©2007, the Oxford University Press.

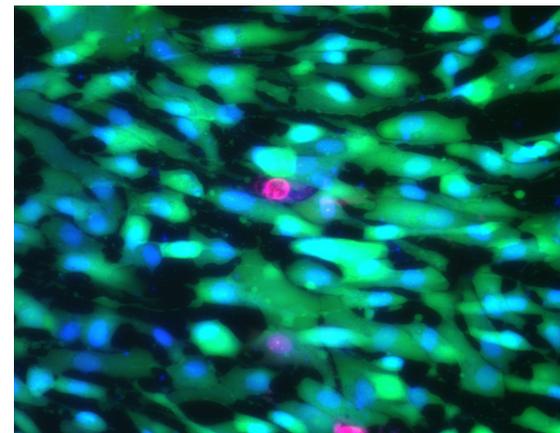
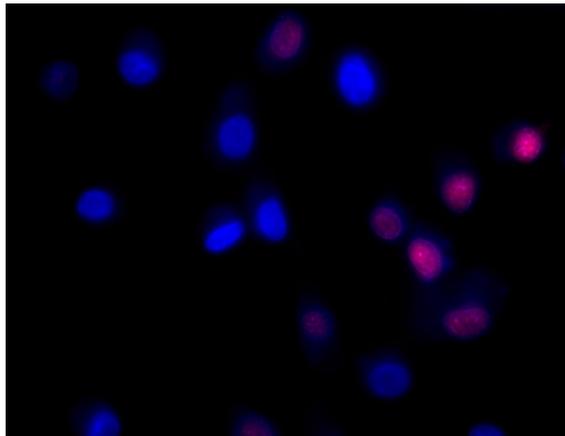
Культуры стволовых клеток выращивают в среде и затем подготавливают к процессу трансплантации. Они могут подвергаться окраске или другим манипуляциям непосредственно перед процессом трансплантации

культура
мезенхимных
клеток,
3 дня, 10x
PKH
DAPI



культура
стволовых
клеток
человека,
3 дня, 4x

культура
мезенхимных
клеток,
3 дня, 40x
PKH
DAPI

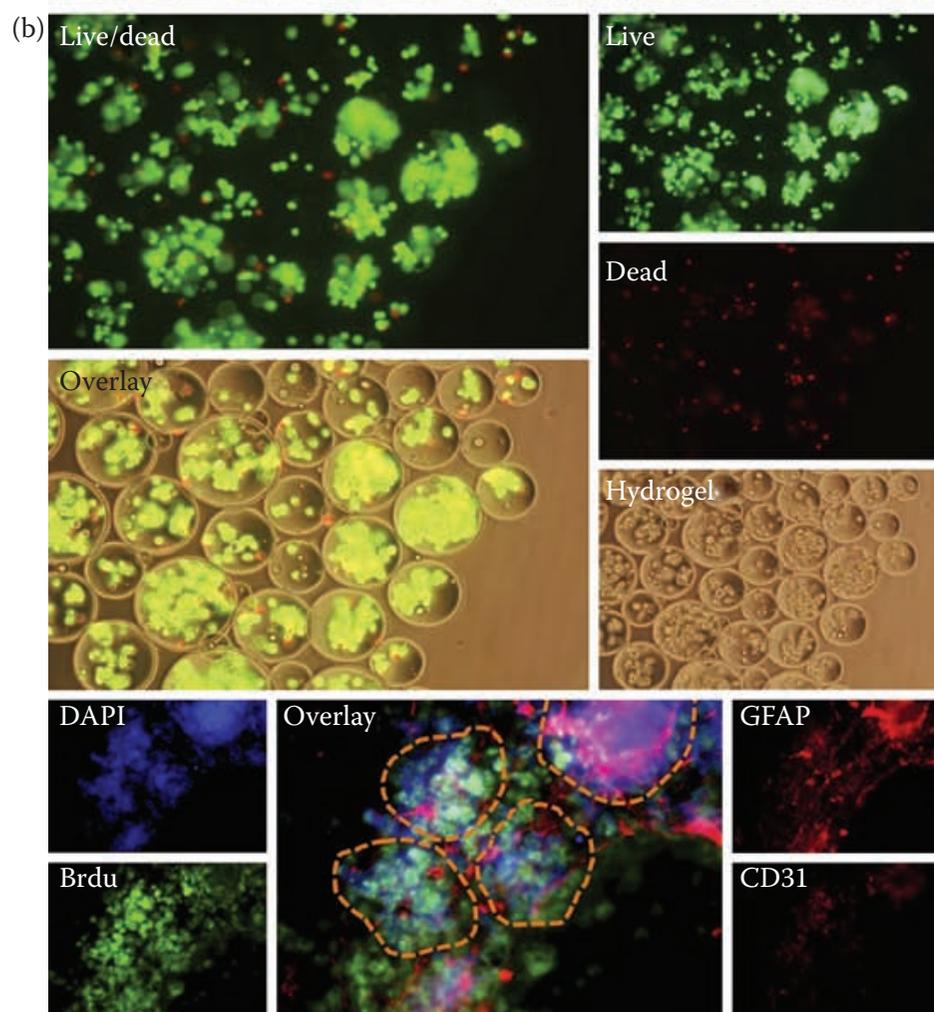


культура
стволовых
клеток
человека,
7 дней, 40x
Ki67
PKH
DAPI

Тема 3:

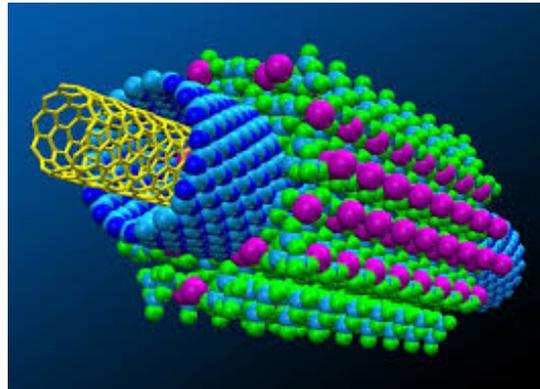
**Комбинированное применение
наноматериалов, стволовых клеток и
физиологически активных веществ**

Для увеличения биодоступности, а также в целях сохранности клеток в процессе их трансплантации, используют клеточные суспензии в составе биоматериалов



Natalia Gorenkova¹, Christy Franco², Zahra Hassani¹, Jack Price¹, Jennifer L. West², & Michel Modo¹. MRI-guided transplantation of polyethylene-glycol (PEG) hydrogel-encapsulated brain endothelial and neural stem cells in a rat model of stroke. *Biomaterials*, *submitted*

Наномедицина использует нанотехнологии и различные материалы размеров наночастиц (структура которых измеряется в *нм*, миллиардных долях метра), имеющих синтетическое и натуральное происхождение, для введения лекарственных или клеточных препаратов в терапевтических целях



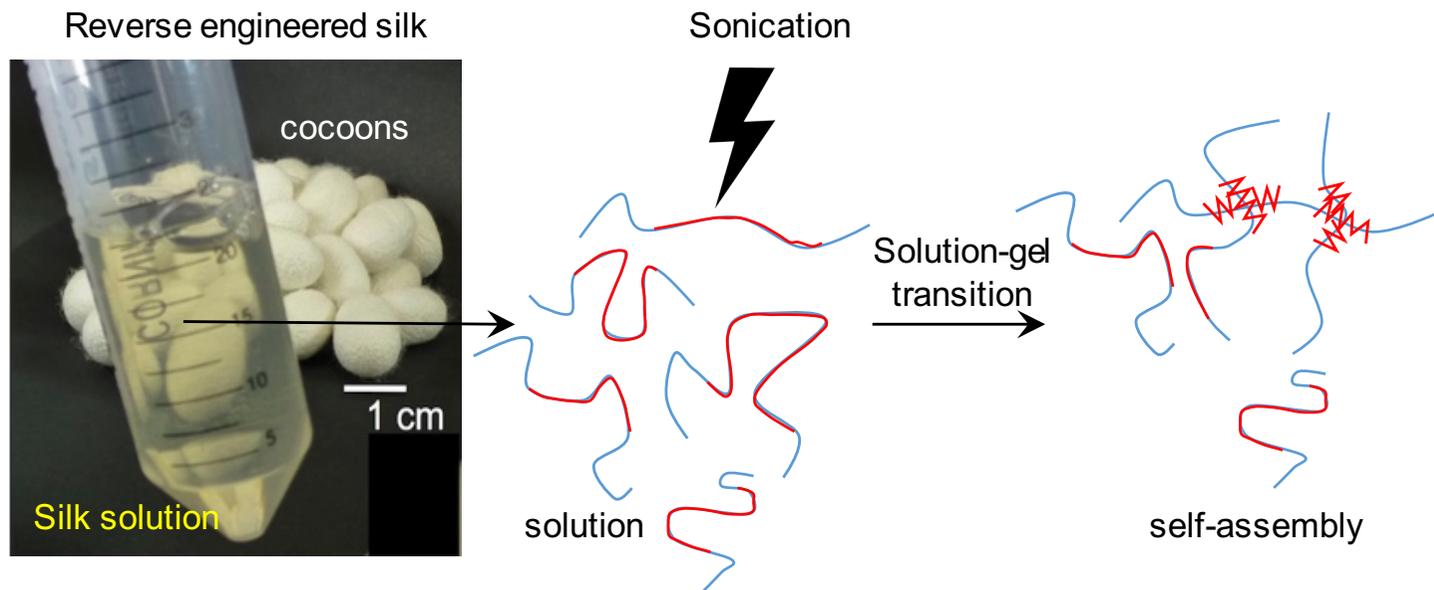
**Наноматериалы
искусственного
происхождения:**

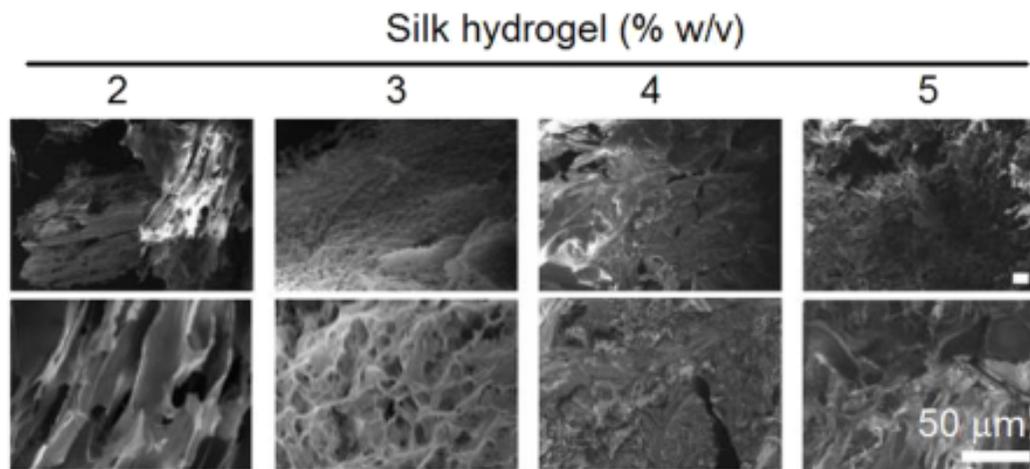
- гибридные гидрогели и частицы, на основе полиэтиленгликоля (PEG)
- материалы на основе поли-(L-лактид-со-)гликолида (PLGA)

**Наноматериалы
натурального
происхождения:**

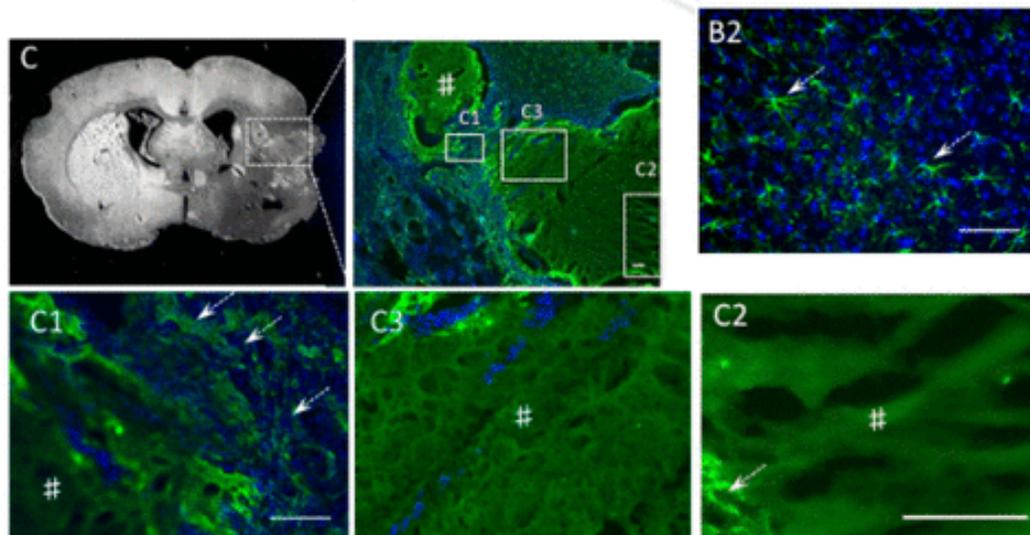
- на основе экстраклеточного матрикса
- коллагена
- смешанного типа с включениями клеточного матрикса
- гидрогели на основе шелка

Примером натуральной основы для биоматериала является шелк коконов тутового шелкопряда. Возможностей вариантов создания различных материалов на его основе довольно велико – наночастицы, гидрогели, спирали, трубки пр. Ниже представлен пример «зеленого» синтеза такого материала, основанный на спонтанной полимеризации 4% раствора шелкового субстрата с получением геля.



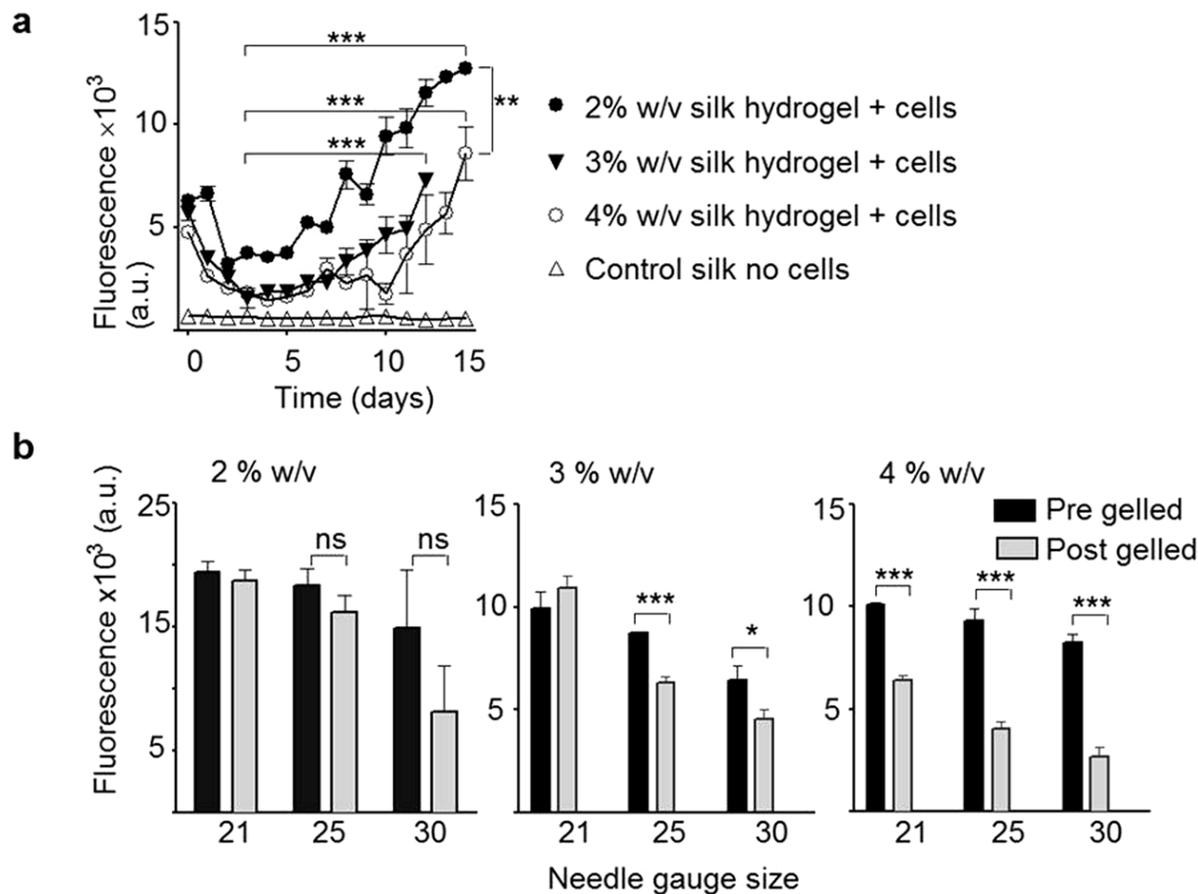


В начале эксперимента полученный биоматериал изучают в лаборатории, измеряя его свойства (устойчивость к воздействиям температуры, манипуляциям и т д , время полураспада, жесткость, пористость и др) и выбирают наиболее подходящий вариант для дальнейшей работы

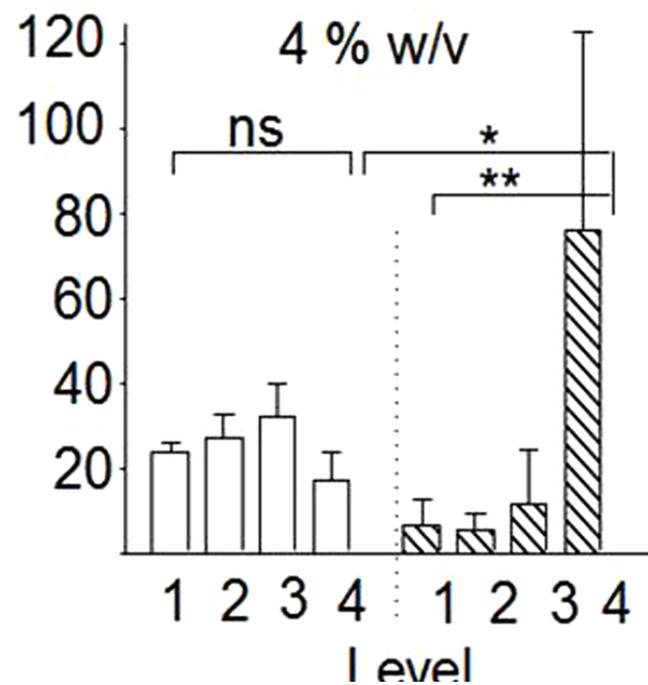
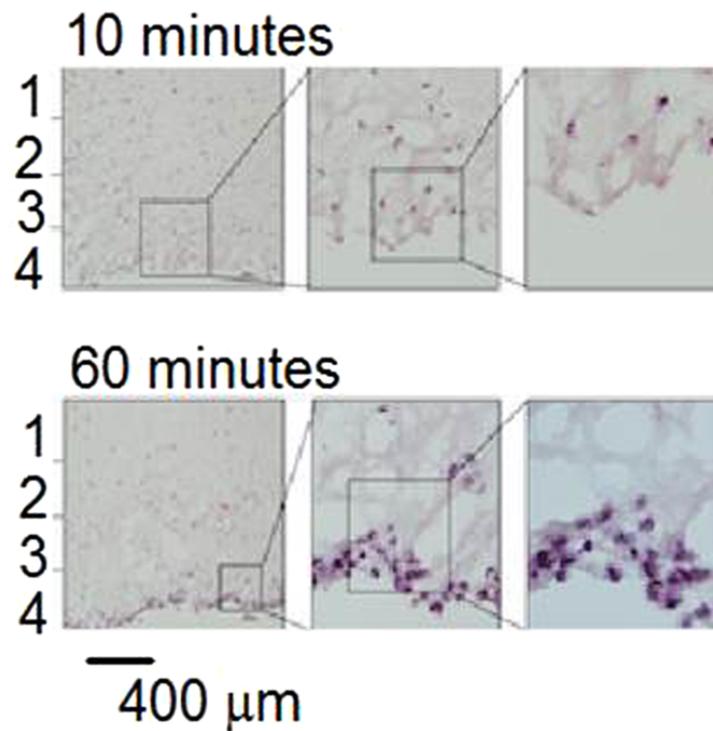


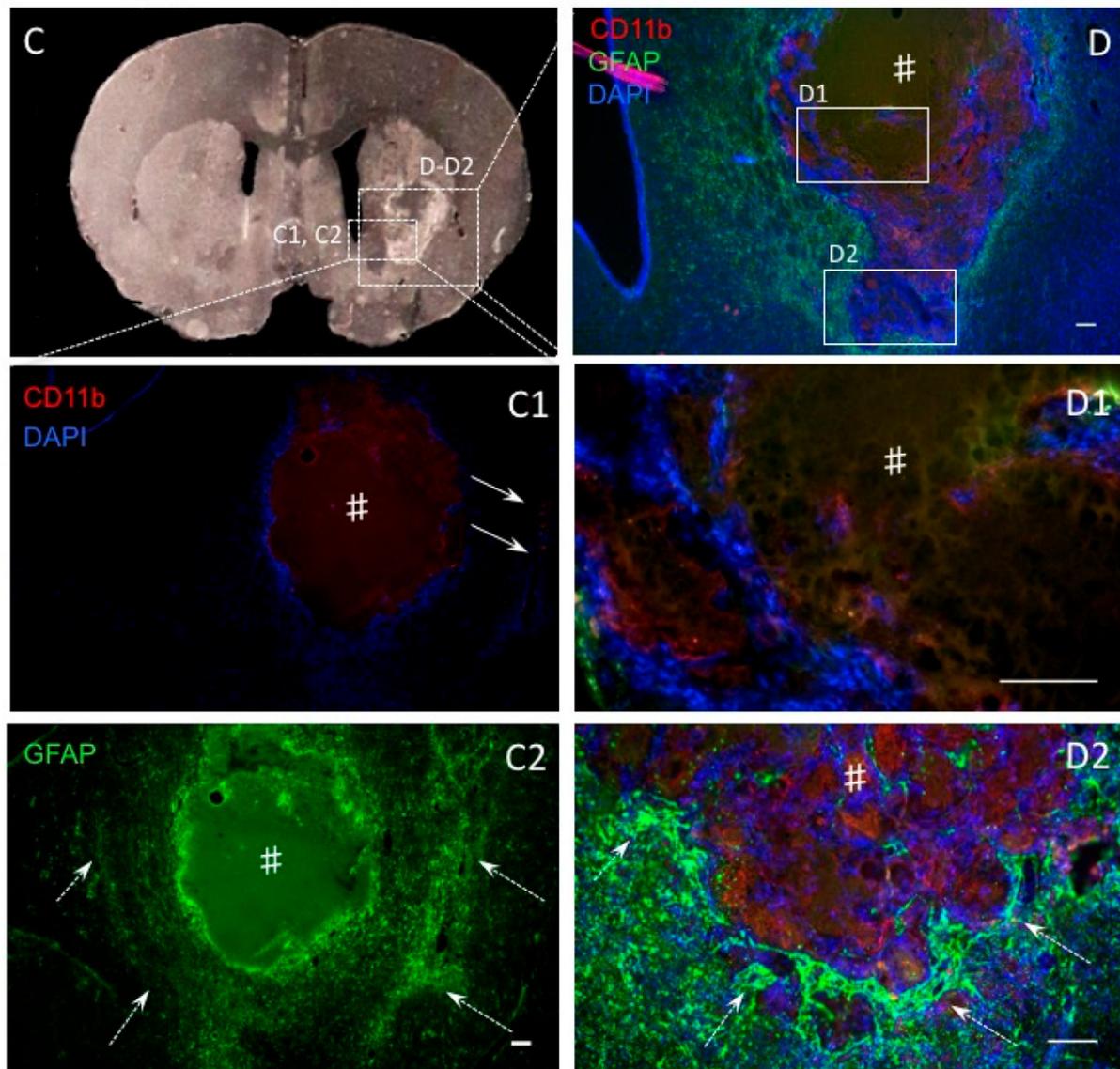
В дальнейшем, после имплантации биоматериала в поврежденную ткань, также измеряют его свойства: распределение в тканях «хозяина», время его распада или стабильность, а также взаимодействие с окружающими клетками и пр.

Перед тем как клетки будут инъецированы в поврежденную область, необходимо выбрать наиболее подходящий для их жизнедеятельности и сохранности тип биоматериала. То есть проводят эксперимент на скорость роста клеток в биоматериале и их продолжительность жизни



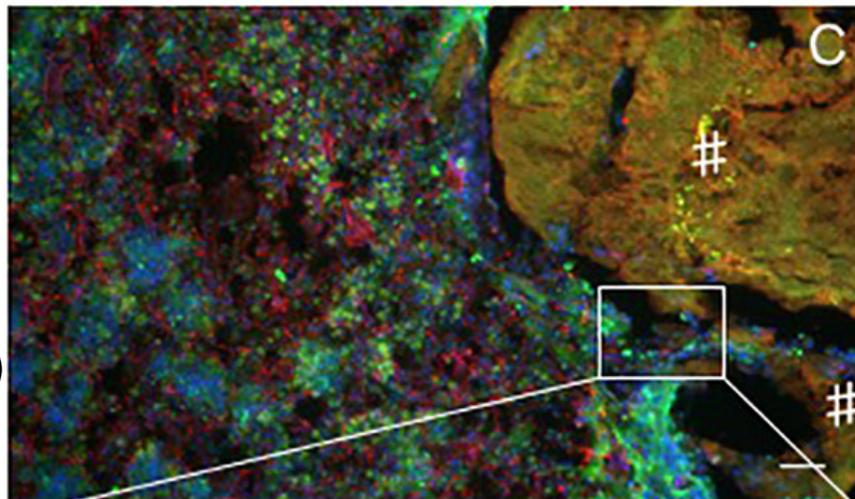
После введения материала с клетками в ткани, через определенное количество времени измеряют уровень выживаемости клеток и их распределение в тканях



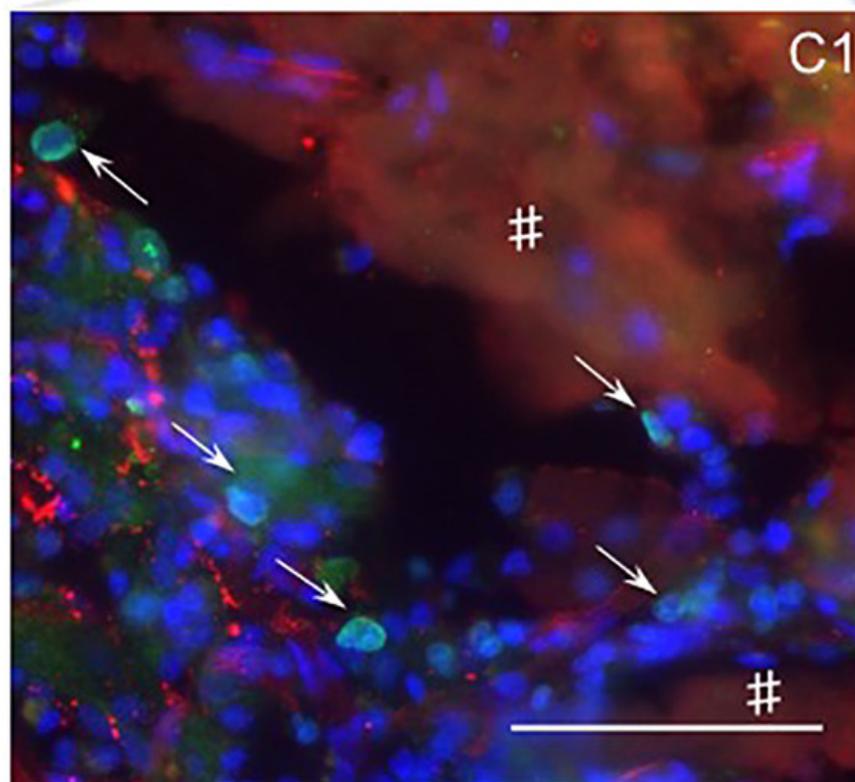


Так же проводят эксперимент на биосовместимость, то есть измеряют степень повреждения в самой ткани после введения материала. На гистологическом уровне это можно измерить, основываясь на ряде параметров, например, уровень воспалительной реакции (маркеры CD11b, Iba1, CD40), рубцевания (GFAP), а так же количество апоптотических изменений (антитела к Bcl2, каспазам -3, -9, цитохрому C)

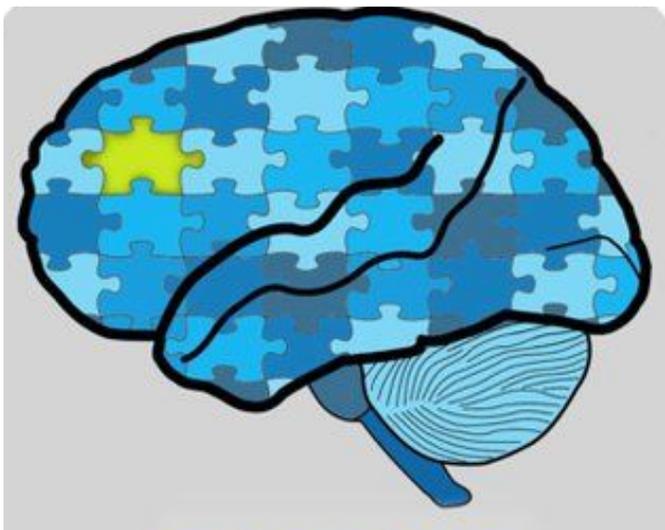
Нервная ткань
мозга (область
полосатого тела)



Трасплатнированный
биоматериал



Важно обращать
внимание на
положительное
окрашивание
клеточного ядра
(DAPI, *синий*), что
доказывает что
клетка живая и
исключает
возможность
ошибочного
окрашивания



В задачи постинсультной терапии входит разработка и внедрение в клинику разносторонних подходов к терапии нейродегенеративных изменений в мозге, учитывая тип, распространение, тяжесть ишемии, локализацию отмерших тканей и их функциональную нагрузку



Список используемой литературы:

1. Belayev, L.; Alonso, O. F.; Busto, R.; Zhao, W.; Ginsberg, M. D. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 1996, 27 (9), 1616– 1622, DOI: 10.1161/str.27.9.1616
2. Carmichael, S. T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. Review. *NeuroRx* 2005, 2 (3), 396– 409, DOI: 10.1602/neurorx.2.3.396
3. Catanese, L.; Tarsia, J.; Fisher, M. Acute Ischemic Stroke Therapy. Overview. *Circ. Res.* 2017, 120, 541– 558, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309278
4. Gorenkova, N., Osama, I., Seib, F. P., & Carswell, H. (2018). In vivo evaluation of engineered self-assembling silk fibroin hydrogels after intracerebral injection in a rat stroke model. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01024>
5. Meng, F.; Modo, M.; Badylak, S. F. Biologic scaffold for CNS repair. *Regener. Med.* 2014, 9 (3), 367– 383, DOI: 10.2217/rme.14.9
6. Modo, M.; Stroemer, R. P.; Tang, E.; Patel, S.; Hodges, H. Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage. *Stroke* 2002, 33 (9), 2270– 8, DOI: 10.1161/01.STR.0000027693.50675.C5
7. Nicholls, F.; Gorenkova, N.; Bible, E.; Franco, C.; Chau, D.; Tolia, C.; West, J.; Modo, M. Improving the treatment of stroke through nanotechnology. In: *The textbook of Nanoneurosurgery and Nanoneuroscience*. Kateb, B, Heiss, J. (eds). CRC Press, 2013 pp 283– 298
8. Osama, I., Gorenkova, N., McKittrick, C.M. et al. In vitro studies on space-conforming self-assembling silk hydrogels as a mesenchymal stem cell-support matrix suitable for minimally invasive brain application. *Sci Rep* 8, 13655 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31905-5>
9. Seib, F. P.; Herklotz, M.; Burke, K. A.; Maitz, M. F.; Werner, C.; Kaplan, D. L. Multifunctional silk-heparin biomaterials for vascular tissue engineering applications. *Biomaterials* 2014, 35 (1), 83– 91, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.053
10. *Cesario V. Borlongan. Concise Review: Stem Cell Therapy for Stroke Patients: Are We There Yet? Stem Cells Translational Medicine.* 2019. 8:983&988.