

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ НИЖЕГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО»
(ННГУ им. Н.И. Лобачевского)
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»

На правах рукописи

КЛИМЕНКО МАРИЯ ОЛЕГОВНА

**ВЛИЯНИЕ 3D СКАФФОЛДА НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ
КИСЛОТЫ НА РЕПАРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ТКАНИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ**

1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:
доктор биологических наук
Мария Валерьевна Ведунова

Нижний Новгород - 2026 г

Оглавление

Введение	4
1. Обзор литературы	11
1.1 Нейродегенерация	11
1.1.2 Черепно-мозговая травма	13
1.1.3 Глиальные опухоли головного мозга	16
1.2 Стратегии репарации последствий нейродегенерации	21
1.3. 3D биоинженерные конструкции - скаффолды	25
1.3.1. Гиалуроновая кислота	29
1.3.2 Нейротрофические факторы BDNF и GDNF	32
2. Материалы и методы исследования	38
2.1 Объект исследования	38
2.2 Схема эксперимента	38
2.3 Моделирование черепно-мозговой травмы	44
2.4 Моделирование ортотопической трансплантации клеток глиомы	45
2.5 Тест Условный рефлекс пассивного избегания	46
2.6 Водный лабиринт Морриса	47
2.7 Тест “Открытое поле”	48
2.8 Оценка неврологического статуса	49
2.9 Гистологическое исследование	50
2.10 Магнитно-резонансная томография	51
2.11 Методы статистической обработки	52
3. Результаты и их обсуждение	53
3.1 Оценка эффективности скаффолда после моделирования ЧМТ	53

3.2 Оценка эффективности скаффолда с нейтрофическими факторами BDNF и GDBF при моделировании ЧМТ	59
3.3 Оценка биосовместности скаффолда с темозоломидом	70
3.4 Оценка эффективности скаффолда с темозоломидом в модели глиомы	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	81
ВЫВОДЫ	85
Список сокращений	87
ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА	88

Введение

Ежегодно 1,6 миллиона человек во всем мире переносят черепно-мозговую травму (ЧМТ) легкой степени, которая, даже при отсутствии грубых морфологических дефектов, нередко ассоциирована с отсроченными когнитивными нарушениями и проявляющимися расстройствами памяти (Sandmark, et al., 2017), что приводит к существенному снижению качества жизни и является актуальной проблемой современной физиологии и медицины (Perlow et al., 2021).

В структуре нейрохирургической помощи при травматических повреждениях и нейродегенеративных процессах, включая опухолевые заболевания, доминирующим вмешательством остается резекция патологического очага с последующей реконструкцией тканевого дефекта. Однако в посттравматическом периоде или на фоне хронического течения патологии неизбежно развивается нейровоспаление, формирующее пул вторичных реакций. Патофизиологический каскад этих явлений включает реактивный глиоз, гиперпродукцию провоспалительных медиаторов в паренхиме и рекрутирование эффекторных клеток периферического иммунитета, что усугубляет изначальное повреждение (Zhao et al., 2017, Chew and Danti, 2017; Eslahi et al., 2021).

Одним из методов коррекции последствий травмы головного мозга может выступать тканезаместительная терапия с использованием биоинженерных конструкций - скаффолдов, которые обеспечивают локальное восстановление архитектоники нервной ткани. Ключевым преимуществом данных конструкций является возможность тонкой настройки их физико-химических свойств и интеграции биологически активных молекул, что превращает скаффолды не просто в каркас для клеточной адгезии, но и в эффективную систему пролонгированной доставки биологически активных веществ.

Наиболее перспективным материалом для создания нейросовместимых скаффолдов является гиалуроновая кислота (ГК). В ряду биополимеров, пригодных для этих целей, ГК занимает особое положение, обусловленное ее

статусом основного структурного гликозаминогликана внеклеточного матрикса головного мозга. ГК выступает в качестве активного участника сигнальных каскадов, регулирующих деление и фенотипическую дифференцировку нейральных предшественников. Это обеспечивает высокую аффинность к тканям центральной нервной системы (Jensen et al., 2020).

В последнее время особый интерес исследователей сосредоточен на фотополимеризуемых гидрогелях на основе метакрилизованной ГК, характеризующихся широким диапазоном модуляций упруго-вязких свойств и универсальностью в отношении комбинирования с иными биоматериалами. Это позволяет получать скаффолды с прогнозируемой скоростью биodeградации, синхронизированной с репаративными процессами в нервной ткани (Savelyev et al, 2018; Spater et al, 2020).

В области репаративных исследований наблюдается тенденция к разработке гибридных биоинженерных конструкций, объединяющие скаффолды и иммобилизованные биоактивные лиганды. Подобные платформы обеспечивают биомиметическую и биоразлагаемую физическую поддержку тканей, а также активируют биологические сигналы для модуляции репарации, что способствует усилению восстановления морфофункциональной организации нейрон-глиальных взаимодействий (Zhang, Yu, 2025).

Ключевая роль в реализации нейропротекторного потенциала подобных систем отводится эндогенным нейротрофическим факторам, среди которых особый интерес вызывают нейротрофический фактор мозга (BDNF) и глиальный нейротрофический фактор (GDNF). Эти белки выполняют широкий спектр функций ЦНС: являются регуляторами синаптической пластичности и нейрогенеза, принимают непосредственное участие в адаптации и выживании нервных клеток при ряде патологий, включая ишемию, гипоксию и другие нейродегенеративных процессы (Skaper, 2018, Walker, Xu, 2018, Mitroshina et al., 2019, Mitroshina et al., 2020, Liu et al., 2023, Stansberry, Pierchala, 2023, Geoges, Das, 2023). Несмотря на широкий спектр

применения данных нейротрофических факторов вопрос об их доставки к месту травмы остается в разработке. Несмотря на широкий терапевтический потенциал BDNF и GDNF, критическим ограничением их применения в клинике остается нерешенность проблемы эффективной таргетной доставки этих молекул к очагу повреждения, что обуславливает актуальность разработки новых подходов в данном направлении.

Использование скаффолдов в тканезаместительной терапии возможно и с терапевтическими веществами. Перспективной мишенью для локальной имплантации конструкций-носителей с тераностическими агентами служит инициальная опухоль. Важной задачей выступает обеспечение адресной доставки цитостатиков, позволяющей поддерживать терапевтическую концентрацию препарата непосредственно в зоне поражения и тем самым нивелировать системную токсичность классической химиотерапии. Подобный стратегический подход, потенцирует эффективность противоопухолевого лечения и способствует сохранению целостности окружающей нервной паренхимы, что снижает повреждение здоровых тканей (Eslahi et al., 2021, Yang et al., 2025). Особого внимания заслуживает оценка действия цитостатика и продуктов деградации гиалуронового скаффолда на микроокружение формирующейся глиальной опухоли, что может определять как противоопухолевую эффективность, так и безопасность предлагаемого подхода.

Цель и основные задачи исследования:

Целью исследования является изучение влияния 3D скаффолдов на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты с различными биологически активными соединениями на репаративный потенциал и функциональную активность головного мозга мышей.

Для достижения поставленной цели был сформулирован ряд задач:

- Изучить биосовместимость 3D скаффолдов на основе гиалуроновой кислоты с нервной тканью головного мозга *in vivo*;

- Исследовать роль нейротрофических факторов BDNF и GDNF в составе скаффолдов в механизмах репарации ткани головного мозга, а также в восстановлении двигательной активности и когнитивных функций животных после ЧМТ;

- Выявить влияние скаффолдов с темозоломидом на торможение развития опухолевого процесса в ткани головного мозга и поведенческий фенотип животных.

-

Научная новизна:

Впервые в условиях *in vivo* показано, что применение скаффолдов на основе метакрилизованной гиалуроновой кислоты в экспериментальной модели черепно-мозговой травмы способствует сохранению моторных и когнитивных функций животных в посттравматическом периоде. Принципиально значимым результатом явилась верификация возможности использования указанных конструкций в качестве платформы для адресной доставки терапевтических молекул, в частности нейротрофических факторов BDNF и GDNF. Сравнительный анализ репаративной эффективности выявил потенциал скаффолдов, насыщенных GDNF, что сопровождалось статистически значимым уменьшением выраженности некротических изменений и перифокального отека, а также сохранением гистоархитектоники нервной ткани в перифокальной зоне повреждения.

В работе впервые продемонстрирована возможность использования состоятельность гиалуроновых скаффолдов с цитостатическим агентом в условиях опухолевой прогрессии. Установлено, что локальное депонирование носителей, содержащих противоопухолевый препарат, непосредственно в зону активно пролиферирующего новообразования сопровождается регрессией опухолевого роста.

Теоретическая и практическая значимость:

Полученные в работе Клименко М.О. данные об использовании 3D скаффолдов на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты на репарационный потенциал ткани головного мозга *in vivo* расширяют теоретические знания о механизмах взаимодействия трансплантата и нервной ткани головного мозга, а также имеют практическое применение для разработки тканезамещающих технологий при лечении посттравматических расстройств. Снижение неврологического дефицита и реконсолидация памяти у животных, а также поддержание нервной ткани в зоне травмы с помощью скаффолда при воздействии на мозг нейротрофических факторов, являются важными параметрами успешной репарации. Установлено, что локальное длительное депонирование цитостатика темозоломида в составе скаффолда обладает значимым противоопухолевым потенциалом, проявляющимся в торможении развития глиомы в экспериментальной модели *in vivo*. Разработанные Марией Олеговной методологические подходы и полученные результаты используются в учебном процессе ИББМ.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Скаффолды на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты обеспечивают сохранение неврологических и когнитивных функций при черепно-мозговой травме, реализуя нейропротекторный эффект через активацию BDNF- и GDNF-опосредованных механизмов репарации;
- Локальная доставка темозоломида в низких концентрациях в составе скаффолда эффективно тормозит развитие глиомы и поддерживает морфофункциональную целостность нервной ткани, демонстрируя тераностический потенциал разработанной системы.

Личный вклад автора:

Автор лично участвовал в проведении работы на всех этапах экспериментального исследования, обработке и интерпретации полученных результатов диссертации. Так же совместно с соавторами принимал участие в написании научных статей, докладов и апробации результатов исследования на семинарах и конференциях.

Достоверность научных результатов:

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и надёжностью использования экспериментальных методов исследования, а также аргументами и выводами, основанными на научных результатах, совпадают с результатами независимых исследований в литературе.

Апробация работы:

Основные результаты работы были представлены на международных и российских мероприятиях: XXI Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (24 - 29 февраля 2020, Курчатовский институт, Санкт-Петербург), 73-я всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (28 - 30 октября 2020, Нижний Новгород), международной конференции Volga Neuroscience Meeting 2021 (Нижний Новгород, 2021)., 77-я всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (15 – 19 апреля, 2024, Нижний Новгород), 78-я всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (14 – 18 апреля, 2025, Нижний Новгород), 79-я всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (24 – 28 марта, 2026, Нижний Новгород) и др.

Публикации:

По теме диссертации опубликовано 14 работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), рекомендованных перечнем ВАК, 14 тезисов в сборниках всероссийских и международных конференций. Получен патент на изобретение "Способ *in vivo* определения биосовместимости скаффолдов для нейротрансплантации", номер RU2021137181A от 16.12.2021.

Структура и объем диссертации:

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 103 страницах и содержит 22 рисунок и 5 таблиц. Список литературы содержит 158 источников.

Благодарности:

Автор выражает благодарность за разработку трехмерных биоинженерных конструкций скаффолдов на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты Савельеву А.Г., Хайдукову Е.В., Звягину А.В. и лаборатории лазерной биомедицины ФНИЦ "Кристаллографии и фотоники" РАН.

1. Обзор литературы

1.1 Нейродегенерация

Механическая травма головного мозга инициирует комплексный каскад патофизиологических реакций, в котором выделяют первичное повреждение, возникающее в момент воздействия, и вторичное, с отсроченным развитием; их совокупность определяет степень и стойкость неврологического дефицита — от временного до постоянного (Galgano, et al., 2017) (Рис.1).

Первичное повреждение, вызванное травмой головного мозга (ТГМ), происходит в течение короткого промежутка времени, примерно 100 миллисекунд. Внутрицеребральное кровоотечение приводит к кровоизлиянию и разрыву кровеносных сосудов внутри паренхимы головного мозга, приводящих к массовым поражениям нервной ткани (Mustafa, Alshboul, 2013).

Со временем развивается вторичная травма и активирует несколько молекулярных и клеточных путей (Kochanek, et al., 2015; Pearn, et al., 2016) (рис.1). Происходит нарушение ионных потоков и аксонального транспорта. Поврежденные аксоны могут быть уязвимы для вторичной аксотомии и демиелинизации. Измененная клеточная проницаемость также увеличивает приток кальция, который вызывает митохондриальную дисфункцию, вызывая дальнейшие энергетические дефекты клеточной мембраны и некротические и апоптотические процессы. Эти молекулярные и клеточные изменения могут привести к развитию цитотоксического или вазогенного отека мозга и нарушению саморегуляции, вследствие чего объем внутричерепного содержимого растет за счет расширения сосудов или накопления воды (Stocchetti, Maas, 2014). Отек мозга обычно усиливается через 24–48 часов после травмы (Unterberg, et al., 2004). Разрушение эндотелиальной стенки сосудов головного мозга способствует активной экстравазации ионов и белков из внутрисосудистого в межклеточное (внеклеточное) пространство головного мозга. Все это приводит к накоплению объема во внеклеточном пространстве (Marmarou, et al., 2006). вследствие этого происходит повышение внутричерепного давления. Нарушение потенциала на мембране митохондрий

приводит к анаэробному метаболизму и истощению энергетического субстрата. Так же травма влияет на проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и способствует активации провоспалительного состояния (Corps, et al., 2015). Эта сложная серия событий начинается через несколько минут после травмы, и продолжается неделями или даже месяцами, особенно при развитии воспаления. Неоднородность ЧМТ обычно классифицируется в соответствии с клинической тяжестью и определяется по шкале комы Глазго (Teasdale, et al., 2014).

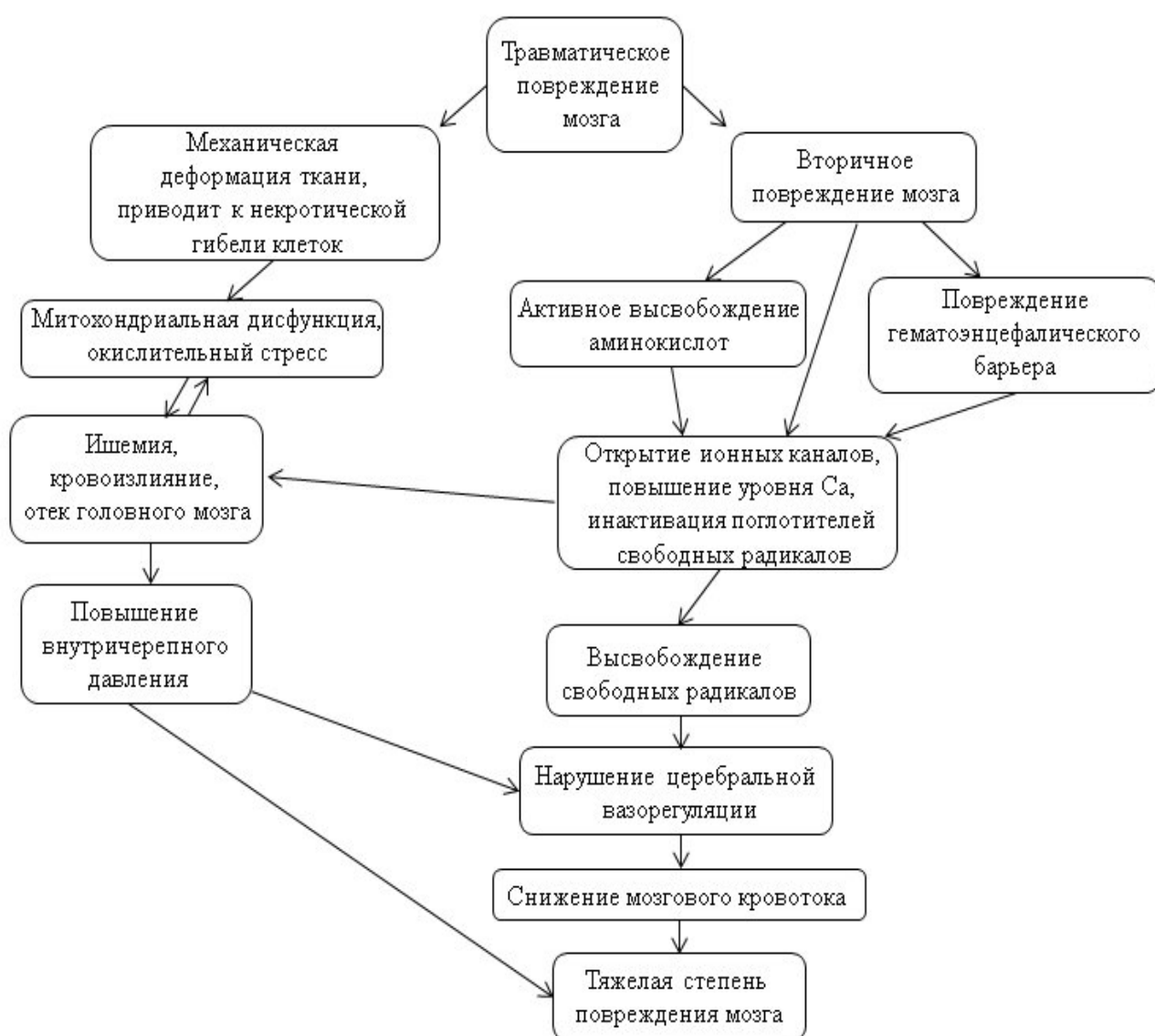


Рис.1. Развитие первичной и вторичной травмы головного мозга (Kaur, Sharma, 2018)

1.1.2 Черепно-мозговая травма

ЧМТ является наиболее распространенной причиной инвалидности и смерти среди молодых людей во всем мире (Langlois, et al., 2020). А также является наиболее распространенной причиной смерти (Taylor, et al., 2017). По статистике, ЧМТ зафиксировано чаще всего у детей и молодых людей (в возрасте от рождения до 24 лет), с последующим пиком заболеваемости у взрослых людей старше 75 лет (Dewan, et al., 2018). В группах с разными видами ЧМТ больше мужчин, чем женщин (Fear, et al., 2009; Herring, et al., 2011). Пожилой возраст (старше 75 лет) включает группу пациентов с самыми высокими показателями госпитализации и смертности. И в случае данного вида травмы возраст является гораздо более сильным показателем плохого исхода, чем причина травмы (Pandor, 2011). Основными причинами ЧМТ являются: автомобильные травмы, непреднамеренные удары или удары против объекта, спортивные травмы, травмы после нападения (Langlois, et al., 2006).

Для изучения особенностей первичного и вторичного повреждения головного мозга в основном используются модели животных с ЧМТ (Marshall, 2000). Основные анатомические особенности, которые определяют специфические условия в мозге грызунов и человека, сходны, включая общую организацию и ориентацию основных путей белого вещества, которые определяются расположением корковой мантии, центральным положением и ориентацией базальных ганглиев и таламуса, и связанные анатомические характеристики. Принципиальное различие между мозгом грызунов и человека заключается в ориентации ствола мозга относительно передне - задней оси. Тем не менее, широкое сходство между видами диктует, что в любой данной плоскости сопоставимые анизотропные условия будут встречаться в мозге грызунов и человека (Kilbourne, et al., 2009).

Моделируя ЧМТ в эксперименте, крайне сложно воспроизвести характер и объем повреждения, характеристики течения травматической болезни,

которые были бы сопоставимы с особенностями ЧМТ у человека. Необходима точная локализация повреждения и определенная тяжесть травмы. Используемые в настоящее время модели ЧМТ включают стандартизованные экспериментальные протоколы и хирургическую технику. При этом обязательно изучение в качестве контроля так называемых «ложнооперированных» животных, у которых выполняют используемые в эксперименте хирургические процедуры, кроме собственно нанесения травмы, включают такие процедуры, как обеспечение доступа к мозгу для травмирующего устройства, анестезия, поддержание температуры тела и мозга и т.д (Finnie, 2001; Laurer, 2000).

В литературных источниках преобладает оценка влияния методов лечения экспериментальной ЧМТ на различные биохимические, иммунологические, электрофизиологические показатели центральной нервной системы (ЦНС). На данный момент, недостаточно внимания уделяется изучению поведенческих реакций, неврологического статуса и неврологического исхода повреждения в эксперименте, в то время как эти данные имеют существенное значение в оценке предполагаемого эффекта лечения и влияния на исход травмы у человека (Белошидский, 2008).

По сравнению с моделью *in vitro*, модели *in vivo* поддерживают сложную внеклеточную среду и позволяют отследить сложные физиологические, поведенческие и гистопатологические изменения после травматического повреждения (O'Connor, et al., 2011).

На данный момент предложено несколько животных моделей для ЧМТ, и каждая из них имитирует клиническую картину ЧМТ. Наиболее используемые модели: жидкостное перкуSSIONное повреждение, контрольное повреждение в результате кортикального удара, повреждение в результате ускоренного падения груза (Xiong, et al., 2013).

Жидкостно-перкуSSIONное повреждение производит ЧМТ, которая характеризуется отеком мозга, внутримозжовидным кровоизлиянием и повреждением клеток коры головного мозга. Травма при использовании этой

модели может быть медианной (трепанационное отверстие выполняется по средней линии) и латеральной (Белошидский, 2008). В этой модели травма наносится действием ударной силы пульсовой волны жидкости на неповреждённую твёрдую мозговую оболочку через трепанационное окно. Использование этой модели, в особенности её центрального типа, ограничено высокой степенью тяжести травмы и смертностью из-за невозможности контролировать повреждения ствола мозга (Радьков и др., 2018).

Контролируемый кортикальный удар – это модель ЧМТ, обеспечивающая более контролируемое повреждение с точки зрения скорости, силы удара, времени и глубины пенетрации по сравнению с предыдущей моделью (Hall, et al., 2005). Как и при «жидкостно-перкуSSIONной модели», данная модель позволяет, помимо локальных, изучать травматические изменения в отдалённых отделах мозга, чувствительных к травме, таких как гиппокамп, зубчатая извилина и т. д. А также оценивать грубые двигательные нарушения и дефицит когнитивных функций (Радьков и др., 2018).

Повреждение в результате ускоренного падения груза (weight-drop) - это модель, которая генерирует открытую или закрытую травму головы (Цымбалюк, Кочин, 2008; Creely, et al., 2004). Результатом первого воздействия является ушиб коры с возможным подкорковым кровоизлиянием (Xiong, et al., 2013). Регулируя массу груза и высоту его падения, изменяют степень тяжести ЧМТ (Shapira, et al., 1988). Подобно другим способам нанесения ЧМТ у грызунов, при этой модели выявляют различные повреждения мозга, от легких, моделирующих сотрясение головного мозга, до очаговых ушибов (в месте падения груза на череп), сопровождающихся вторичной гибелью нервных клеток на отдалении. Также отмечены нарушения двигательной и когнитивной функций (Tang, et al., 1997a, 1997b).

Моделирование не только помогает понять патологическое прогрессирование после ЧМТ, но также позволяет разрабатывать терапевтические методики для предотвращения вторичных повреждений,

улучшения восстановления мозга после ЧМТ (Xiong, et al., 2013). Совершенствование способов моделирования ЧМТ в эксперименте, направленное на максимальное приближение параметров травмы к клиническим условиям – одно из основных направлений исследователя (Белошицкий, 2008; Adugna, et al, 2022).

1.1.3 Глиальные опухоли головного мозга

Еще одним фактором, оказывающим механическое воздействие схожее с травматическим повреждением, является формирование быстрорастущего опухолевого очага. По мере роста опухоль сдавливает соседние структуры мозга, вызывая повышение внутричерепного давления (Jayaramye et al, 2024, Wei et al, 2024).

Глиомы, представляющие собой первичные солидные опухоли центральной нервной системы, являются высокозлокачественными и склонны к быстрому инфильтративному росту, что наблюдается примерно в 70% случаев. Заболеваемость составляет примерно 5 случаев на 100 000 населения, при этом чаще всего они встречаются у людей старше 60 лет. Большинство глиальных опухолей головного мозга (около 2/3) локализуются в полушариях головного мозга (Ostrom et al., 2022). Глиомы обладают удивительной способностью активно преобразовывать внеклеточный матрикс, изменяя его структуру и биохимический состав в своих интересах. Это явление подчеркивает адаптивность и агрессивность глиом, а также указывает на сложные взаимосвязи между опухолевыми клетками и окружающей их матриксом (Wei, et al., 2024).

Инфильтративный рост этих опухолей и их первоначальное расположение снижают эффективность как первичного лечения, предполагающего удаление первичного очага опухоли, так и вторичного лечения, основанного на лучевой терапии. При высокозлокачественных глиальных опухолях наиболее перспективным методом лечения является

последующая химиотерапия (Ostrom et al., 2022). Однако даже при нарушении гематоэнцефалического барьера из-за развития онкологического процесса не все высокомолекулярные терапевтические средства могут проникать через него. Это ограничение существенно сужает возможности лечения в нейроонкологии.

Глиобластома — самая распространённая и наиболее опасная первичная опухоль головного мозга у взрослых — состоит из клеток с гетерогенными транскрипционными состояниями, которые адаптивно переключаются между состояниями в ответ на терапевтические воздействия и изменения микроокружения (Varn et al., 2022).

Глиомы интегрируются в нейронные цепи. Опухолевые клетки проникают через настоящие глутаматергические (кальций-проницаемые, опосредованные AMPAR) синапсы между нейронами и глиомой. Нейронная активность в этих поражённых участках мозга способствует росту глиомы как за счёт митогенных паракринных факторов, регулируемых активностью, так и за счёт электрохимических сигналов. Электрохимическая передача сигналов осуществляется между нейронами и глиомой в одной субпопуляции клеток глиомы и через вызванные калием токи в другой субпопуляции клеток глиомы. Деполяризация мембраны клеток глиомы, вызванная электрохимической передачей сигналов, обусловленной активностью нейронов, способствует росту опухоли; однако механизмы, зависящие от напряжения, ещё не до конца изучены. Подгруппа клеток глиомы, которые реагируют на нейронную активность медленными входящими калиевыми токами, также образует сети «глиома-глиома» посредством щелевых контактов между длинными отростками раковых клеток, называемыми опухолевыми микротрубочками. Эта сеть глиом, связанных щелевыми контактами, напоминающая сеть астроцитов, связанных щелевыми контактами, в здоровом мозге, распространяет эти электрохимические сигналы и последующие кальциевые импульсы по сети глиом, усиливая

вызванные калием токи и способствуя развитию терапевтической резистентности (Venkataramani et al., 2019).

Отдельные клетки глиобластомы, не связанные с сетью опухолей, являются основными факторами эффективной инвазии. Опухоль проникает в мозг на разных уровнях: на молекулярном уровне - эта субпопуляция обогащена олигодендроцитарными клетками-предшественниками и нейрональными клетками-предшественниками. Интересно, что субпопуляция клеток инвазивной глиобластомы демонстрирует модели миграции, которые напоминают незрелые нейроны во время развития нервной системы (Taylor et al., 2022, Venkataramani et al., 2022).

В настоящее время растущее понимание роли нервных механизмов и нейрональных синаптических связей в росте, распространении и выживании клеток глиобластомы открывает возможности для новых терапевтических подходов (Venkataramani et al., 2024). Злокачественные опухоли головного мозга, такие как глиобластомы, развиваются в параллельном сплетении сложной нейронной сети. Нейронная активность способствует росту глиомы как за счет паракринной передачи сигналов (нейролигин-3 и нейротрофический фактор головного мозга (BDNF)), так и за счет возбуждающих электрохимических синапсов, опосредованные AMPAR (рецептором α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты) (Venkataramani, et al, 2019; Krishna, et al, 2023).

Несмотря на мультимодальную терапию, включающую максимально безопасную резекцию, лучевую терапию (ЛТ) и химиотерапию, прогноз при глиобластоме неблагоприятный: менее 12 % пациентов живут более 3 лет (выживаемость в долгосрочной перспективе). Хотя хирургическое вмешательство может помочь при ограниченном типе глиомы, таком как плеоморфная ксантоастроцитоме, субэпендимальная гигантоклеточная астроцитоме, пилоцитарная астроцитоме, хордоидная глиома и т. д.,

традиционные методы лечения диффузной глиомы взрослого типа часто оказываются неэффективными из-за внутренней и приобретённой терапевтической резистентности (Li et al., 2025).

Генотоксичные метилирующие агенты темозоломид (TMZ) и прокарбазин, а также хлорэтилирующая нитромочевина ломустин (CCNU) входят в стандартный набор средств для лечения злокачественных глиом (ЦНС 3-й и 4-й степени по классификации ВОЗ). Темозоломид (TMZ) остается основным препаратом для химиотерапии глиомы, однако механизмы внутренней и приобретенной резистентности существенно ограничивают его клиническую эффективность. Темозоломид является химиотерапевтическим препаратом, используемым преимущественно для лечения злокачественных опухолей головного мозга, включая глиобластомы и астроцитомы. Его механизм действия основан на алкилировании ДНК раковых клеток, что нарушает процессы репликации и вызывает апоптоз. Это свойство позволяет эффективно уничтожать быстро делящиеся раковые клетки, однако он так же оказывает воздействие на здоровую ткань головного мозга. TMZ считается хорошо переносимым препаратом среди цитостатиков, он обладает определенными токсическими эффектами, особенно при длительном применении и высоких дозировках. (Iturrioz-Rodríguez et al., 2023).

В противодействии алкилированию ДНК участвует метилтрансфераза MGMT. Она считается основным фактором, влияющим на устойчивость к темозоломиду. MGMT — это эндогенный фермент, участвующий в репарации ДНК, который помогает поддерживать стабильность генома за счет исправления ошибок в репарации. При лечении темозоломидом MGMT может удалять метильную группу из Об-метилгуанина, тем самым нейтрализуя вызванное препаратом повреждение ДНК и снижая общую эффективность темозоломида. Таким образом, экспрессия гена MGMT, которая определяется статусом метилирования CpG в промоторной области гена MGMT, является важным фактором, влияющим на эффективность лечения

темозоломидом. Гиперметилирование промотора MGMT приводит к снижению экспрессии белка MGMT и, как было показано, коррелирует с увеличением продолжительности жизни пациентов с глиобластомой. Напротив, опухоли с неметилированным промотором (с повышенной активностью MGMT) обычно устойчивы к темозоломиду (Feldheim et al., 2019).

Кроме того, метаанализ показывает, что статус гена MGMT может меняться в процессе лечения, прогрессирования или рецидива опухоли. В опухолях с исходным метилированием гена MGMT при рецидиве после лечения темозоломидом снижается коэффициент метилирования, что позволяет предположить, что снижение метилирования промотора гена MGMT является механизмом развития терапевтической резистентности к темозоломиду. Более глубокое понимание механизмов, вызывающих изменения в метилировании гена MGMT, и их влияния на устойчивость к темозоломиду, будет иметь фундаментальное значение для комплексного лечения глиобластомы (Park et al., 2012).

Глиобластомы обладают высокой гетерогенностью и склонности к мутациям поэтому эти опухоли часто развивают резистентность к темозоломиду. К сожалению, более 50 % пациентов с глиобластомой, получающих темозоломид, не реагируют на терапию, при этом прогностических маркеров ответа на лечение темозоломидом, помимо статуса гена MGMT, не так много. Понимание механизмов резистентности к темозоломиду, и борьба с ней осложняются еще и тем, что резистентность может и врожденной характеристикой некоторых опухолей (Arora et al., 2019, Lee, 2016).

Несмотря на возможное иммуномодулирующее действием ТМЗ, этот алкилирующий агент является современным стандартом лечения

глиобластомы и в совокупности с скаффолдом будет иметь терапевтический синергетический эффект (Wang, et al, 2024).

1.2 Стратегии репарации последствий нейродегенерации

ЧМТ и хирургия головного мозга может быть связано с обширной потерей функциональной активности ткани головного мозга. Однако, на данный момент, не найдено клинически эффективной стратегии морфологической реконструкции головного мозга (Jiasong et al., 2009). Лечение направлено на предотвращение дополнительного повреждения головного мозга и оптимизацию условий для восстановления тканей. (Stocchetti, et al., 2017).

Терапевтические подходы, которые способствуют восстановлению и пополнению нейронов после нейродегенерации, должны способствовать восстановлению функций (Carlson, Saatman, 2018). Важно отметить, что наряду с деструктивными процессами, ЧМТ также вызывает нейровосстановительный ответ, который включает ангиогенез, нейрогенез и синаптической пластичности мозга (Werner J., Stevens R., 2015). Эти спонтанные регенеративные механизмы недолговечны и слишком слабы, чтобы противодействовать прогрессированию повреждения, но они могут указать путь к новым терапевтическим вариантам, если их соответствующим образом усилить (Sale, et al., 2009; Griesbach, et al., 2009).

Существующие в настоящее время подходы к нейропротекции, нейроваскулярной регенерации и нейровосстановлению были предложены в качестве терапевтических стратегий при ЧМТ. Однако большое количество клинических испытаний с использованием нейропротективной коррекции травмы не показали многообещающих результатов (Marklund, Hillered, 2011; Cook et al, 2025).

Нейропротекция определяется как совокупность механизмов, направленных на предотвращение гибели нейронов и снижение вторичных повреждений нервной ткани в ответ на эндогенные или экзогенные повреждающие факторы, отображающие специфические механизмы выживания нервных клеток, индуцирующие пролиферацию и дифференцировку нейронов (Miras - Portugal, et al., 2016).

На моделях животных было показано, что количество регенерированных нейронов у молодых животных больше, чем у старых животных. Процесс пролиферации и дифференцирования имеет пик через 2–5 дней после повреждения структурности нервной ткани, в то время как в некоторых исследованиях этот период увеличивается до 14 дней. В субвентрикулярной и субгранулярной зонах существует особая группа астроцитов, которые могут проходить дифференцировку и поддерживать функциональное состояние поврежденных нейронов (Richardson, et al., 2010).

Нейро- и клеточная трансплантация стали широко признанными в качестве мощных экспериментальных инструментов для изучения структурно-функционального развития, нейропластичности и регенерации центральной нервной системы взрослого человека (ЦНС). Были получены многообещающие результаты в восстановлении повреждений головного мозга и в восстановлении функции после ЧМТ (Lu, et al., 2007).

Технологии, которые позволяют проводить таргетную терапию на клеточном или молекулярном уровне, улучшая доставку лекарств и снижая побочные эффекты расширяют возможности лечения черепно-мозговой травмы и других повреждений мозга (Ling et al, 2023).

Терапия на основе стволовых клеток распространённая методика лечения многих заболеваний, в том числе и ЧМТ. В подобных экспериментах уже через месяц наблюдалось заметное увеличение эндогенной клеточной пролиферации, а также незрелая нейрональная дифференцировка в поврежденных участках коры и в субвентрикулярной зоне вместе с потоком

мигрирующих клеток по направлению к мозолистому телу крыс (TaLiri, et al., 2013).

Во взрослом мозге эндогенные нервные стволовые клетки в основном локализуются в субвентрикулярной зоне боковых желудочков и субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа. В субвентрикулярной зоне нервные стволовые клетки/клетки-предшественники дают начало нейронам и олигодендроглии. Большинство новых нейронов, образующихся в субвентрикулярной зоне, мигрируют через ростральный миграционный тракт и в конечном итоге становятся обонятельными интернейронами в обонятельной луковице. Небольшое количество новых нейронов, образующихся в субвентрикулярной зоне, по неизвестной причине перемещаются в кортикальные области, но это может быть связано с механизмами восстановления или обновления тканей. Аналогичным образом вновь образованные клетки зубчатой извилины перемещаются в слой гранулярных клеток и через несколько недель становятся полностью зрелыми в ходе процесса, известного как нейрогенез в гиппокампе взрослого мозга. Однако до сих пор неизвестно, могут ли эти нервные стволовые клетки в субвентрикулярной зоне и зубчатой извилине заменить утраченные нейроны после травмы (Adugna, et al, 2022).

На данный момент активно изучаются различные методики протезирования на основе нанотехнологий. Были разработаны наноматериалы, которые являются не токсичными для биологических тканей (Reis, et al., 2015). Широкое развитие в исследовательской деятельности получили полиэтиленгликоль-функционализированные гидрофильные углеродные кластеры, которые могут являться неким нановектором, загруженные гидрофобными лекарственными средствами (Berlin, et al., 2010). Кластеры способствуют устранению цереброваскулярной дисфункции, которая сопровождает ЧМТ. Они сохраняют свою способность облегчать окислительный стресс в культивируемых эндотелиальных клетках мозга (Marcano, et al., 2013).

Тканевая и клеточная терапия могут иметь преимущества перед однократной фармакотерапией в том, что: 1) трансплантаты могут анатомически реконструировать поврежденный мозг; 2) трансплантаты могут устанавливать связи с клетками-хозяевами; 3) можно использовать как транспортеры для ростовых факторов; 4) трансплантация (ТР) может также активировать скрытые пути, которые существуют в мозге, или стимулировать новообразованные пути после травмы, а затем способствовать функциональной активности (Lu, et al., 2007).

Успешность применения трансплантата частично зависит от выбора материала каркаса. Современные биоматериалы включают обширную группу синтетических и природных веществ, которые могут быть сформированы в структуры огромной сложности, которые передают определенную функцию. Возможное варьирование химических и физических свойств гарантирует, что биоматериалы могут быть пригодны для использования в качестве каркаса (Edgar et al., 2016, Edgar et al., 2020).

Тканевая инженерия дает возможность регенерировать поврежденные или потерянные, структуры без необходимости постоянных имплантатов. Биоразлагаемые и биоразрушаемые каркасы могут обеспечивать структурную и биомеханическую стабильность до тех пор, пока собственная ткань организма не сможет выполнять свои функции (Holzapfel, et al., 2017, Dey, et al., 2020).

Методы тканевой инженерии значительно продвинулись в последние годы. Существуют проблемы применимости и массового производства имплантов: биосовместимость, иммуногенность, биodeградация и токсичность. Конструкты, на основе разнообразных полимеров показали, что композитные или сополимеризованные каркасы более эффективны, чем с одним полимером, поскольку они позволяют сополимерам компенсировать недостатки, которые может иметь один полимер (Edgar et al., 2016). Иммуногенные материалы, вызывающие воспаление, препятствуют ремоделированию, которое необходимо для эффективности и выживаемости

трансплантата (Galler, et al., 2011). Наиболее успешные каркасные материалы облегчают клеточную адгезию, рост, миграцию и реагируют на молекулярные и физические сигналы в экспериментах *in vivo* (Böttcher-Haberzeth, et al., 2010). Биоразлагаемость материалов является фактором, специфичным для желаемой функции сконструированных тканей. Медленная биodeградация является предпочтительной для долгосрочных имплантатов, тогда как активная и быстрая биodeградация важна для стимулирования ремоделирования и замены биоматериалов в целях восстановления тканей (Liao, et al., 2014). Чтобы быть клинически эффективными, эти среды должны как можно точнее копировать основные характеристики нативного внеклеточного матрикса в клеточном и субклеточном масштабе (Pereira, Bartolo, 2015, Poluri, et al, 2025).

1.3 3D биоинженерные конструкции - скаффолды

В качестве подходов для регенерации поврежденного участка головного мозга используют новые трехмерные (3D) скаффолды (СК) на основе полимерных биоматериалов (Shalumon, Chen, 2015). 3D-каркасы или скаффолды могут являться платформой для переноса в поврежденный участок головного мозга при травме различных веществ, которые будут участвовать в восстановлении во время регенерации, либо создавать обратный эффект (Lau, Wang, 2013).

Некоторые из самых ранних попыток создания биосовместимых каркасов были основаны на простых структурах с плоской двумерной (2D) геометрией. Приложения для 2D-трансплантатов широко изучены в области инженерии кожи (Böttcher-Haberzeth, et al., 2010). Однако, последовало множество негативных последствий в дальнейших исследованиях *in vivo*. Поэтому в настоящее время общие стратегии включают использование пористых трехмерных каркасов, которые служат шаблонами для формирования специфической ткани (O'Brien, 2011). Трехмерная биопечать уже использовалась для генерации и трансплантации нескольких тканей, включая

многослойную кожу, кости, сосудистые трансплантаты, трахейные шины, ткани сердца и хрящевые структуры, однако и она сопряжена со множеством сложностей (Kang, et al., 2016). Натуральные и синтетические полимеры являются наиболее широко используемыми биоматериалами, позволяющими изготавливать каркасы с широким спектром биологической активности, биомиметики, биodeградации и интерактивных свойств клеток (Purpi, et al., 2010). Сшитые между собой такие полимеры дают гидрогелевые каркасы гелеобразной консистенции. Одним из значимых преимуществ гидрогеля является способность изменять их скорость разложения путем изменения количества сшивок между полимерами (Shin, et al., 2003).

Встречающиеся в природе полимеры представляют собой подмножество биологически активных материалов, которые могут использоваться в тканевой инженерии. Они могут быть сгруппированы в три категории: полисахариды, белки и нуклеиновые кислоты (Seeberger, Carell, 2003). Как встречающиеся в природе соединения, эти материалы имеют благоприятные профили совместимости *in vivo*, как теоретически, так и эмпирически. Таким образом, они лучше подходят для преодоления проблем токсичности или антигенности. Такие биоматериалы, как коллаген и хитозан, имеют природное происхождение и обладают превосходной биосовместимостью, биоразлагаемостью и экономичностью. Оба материала хорошо реагируют на факторы роста и содержатся во внеклеточном матриксе.

По сравнению с природными полимерами синтетические вещества имеют ограниченную иммуногенность и пониженную биологическую активность, которые снижают риск отторжения *in vivo*, но имеют больший потенциал вызывать воспалительные реакции по сравнению с другими биоматериалами (O'Brien, 2011). Синтетические материалы остаются выгодными, поскольку их легко изготавливать при относительно низких затратах (Smith, et al., 2014). Поликапролактон (ПКЛ) — синтетический биосовместимый полимер, известный своей простотой в обработке, биосовместимостью и стабильностью. Этот синтетический полимер широко используется в

инженерии костной ткани, но из-за его гидрофобной структуры он снижает адгезию клеток и их биологическую активность. Поэтому для обеспечения биосовместимости ПКЛ должен содержать добавки. Отличным решением этой проблемы является гидроксипатит (ГА), который повышает гидрофильность, улучшает прикрепление клеток и улучшает механические свойства (Zimmerling, et al., 2021). Полигликолевая кислота (ПГА) – идеальный материал для создания ячеистых (пористых) каркасов, так как продемонстрировал свою быструю деградацию *in vivo* (Jacobs, et al., 2016). Благодаря простоте производства ПГА можно использовать для создания индивидуальных конструкций. ПГА в основном используется для доставки лекарств, стентирования сосудов и тканевой инженерии. Однако быстрая деградация снижает механическую прочность ПГА и делает его непригодным материалом для биоинженерии тканей, которые требуют высокой несущей способности. Часто используют сочетание полиэтиленгликоля (ПЭГ) и полибутилентерефталата (ПБТ). Их комбинация полезна, потому что ПЭГ обеспечивает эластичность, а ПБТ обеспечивает жесткость. Каркасы ПЭГ / ПБТ легко гидратируются, что позволяет увеличить диффузию питательных веществ через каркас, что делает пористость менее определяющим фактором роста ткани (Mahmood, et al., 2006).

Среди методов биотехнологии, применяемых в настоящее время для производства биомедицинских трехмерных конструкций, технологии фотопроизводства вызывают все больший интерес благодаря их превосходному разрешению, точности и способности точно манипулировать биоматериалами, клетками и терапевтическими молекулами в трехмерных средах (Lutolf, 2012).

Фотополимеризация является одним из наиболее изученных методов создания ковалентно сшитых гидрогелей путем воздействия на светочувствительную систему ультрафиолетовым (200–400 Нм) или видимым светом (400–800 Нм) (Nguyen, West, 2002). Использование световой энергии обеспечивает быстрое образование гидрогелей – от нескольких секунд до

нескольких минут, в условиях биосовместимой реакции и низких дозах иницирующих радикалов. Такое быстрое формирование обеспечивает легкий контроль пространственно-временного образования геля на соответствующих масштабах длины (Nguyen, Alsberg, 2014).

Перед 3D-печатью необходимо сшивать гидрогели, и один из способов сделать это — использовать фотохимические методы. Чтобы вызвать сшивание с помощью фотометодов, в вещество должна быть введена молекула, которая создает свободные радикалы в присутствии излучения, способствующего образованию новых связей. Этими дополнительными факторами являются фотоинициаторы. Один из них - рибофлавин-SPS-гидрохинон (инициатор–катализатор-ингибитор), который может создавать 3D-конструкции путем УФ-сшивания в 3D-принтере на основе литографии (SLA) (Mu, et al., 2020).

3D-фотопроизводство включает в себя группу методов, использующих энергию света для запуска ряда химических реакций в светочувствительной системе (Bartolo, et al., 2009). Фотопроизводство позволяет изготавливать персонализированные, сложные трехмерные структуры через многоэтапный протокол, который полностью реализован в аддитивных технологиях биопроизводства, и начинается с генерации компьютерной твердотельной модели (Melchels, et al., 2012).

На регенеративный потенциал тканеинженерного каркаса влияет множество факторов, в том числе топография, состав поверхности, пористость, гидрофильность, размер, форма и механическая прочность (Laird et al., 2021).

Биопечать, основанная на трехмерных компьютерных моделях, может быть реализована различными методиками печати (микромолдинг, экструзионная и т.д.), при которых происходит постепенная полимеризация гидрогелевых веществ (Рис. 2). Полимерная твердая композиция сшивается благодаря лазерному излучению. Скорость печати подбирается таким образом, чтобы обеспечить равномерный поток полимеризации. Печать

многослойная, поэтому каждое лазерное излучение должно успеть отвердить уже напечатанный слой до нанесения следующего. Получившиеся сложные биоконструкты являются актуальными разработкам для регенерации тканей и доставки терапевтических средств (Pereira, Bartolo, 2015).

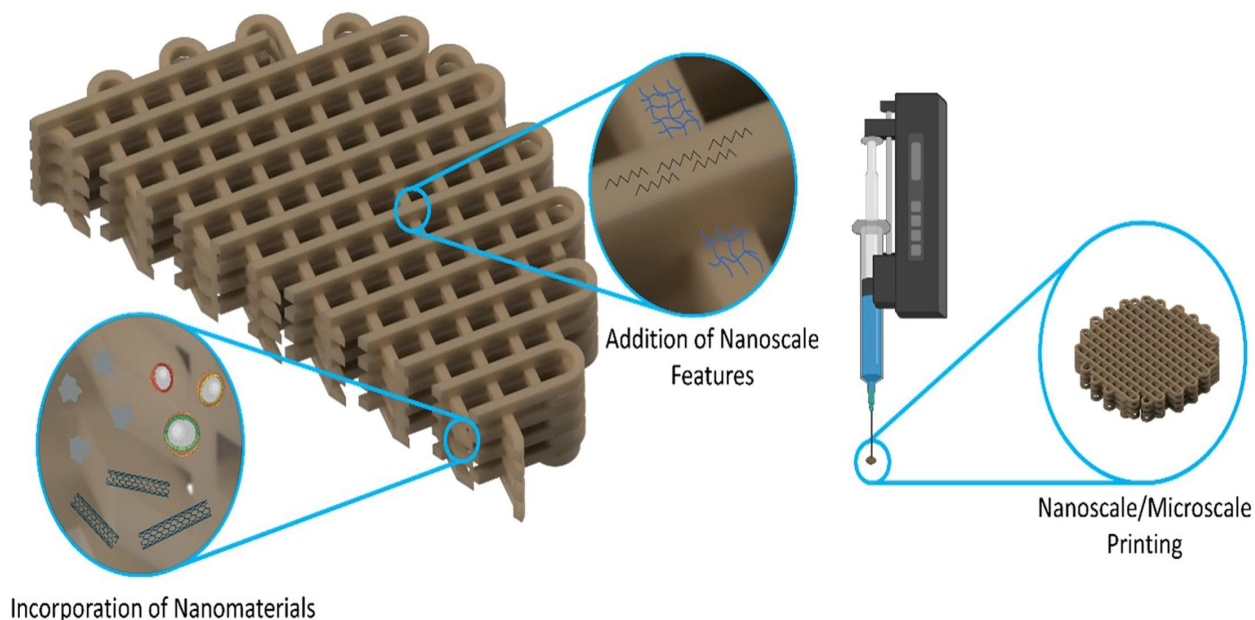


Рис. 2. 3D-скаффолды для тканевой инженерии (Laird et al., 2021)

1.3.1 Гиалуроновая кислота

Биосовместимые материалы необходимы для воссоздания естественной среды, способствующей восстановлению и регенерации поврежденных тканей. Природные материалы, такие как коллаген, фибрин и гиалуроновая кислота, широко используются вследствие их близости к естественным компонентам внеклеточного матрикса. Эти материалы не так долговечны, как их синтетические аналоги, и часто со временем разрушаются. Это может быть выгодно, потому что модификации конструкций могут контролировать скорость деградации в соответствии с терапевтическими потребностями (Lee, et al., 2001, Zhang et al., 2017)

Примером природного соединения для создания гидрогелевого каркаса является гиалуроновая кислота. Она представляет собой гликозаминогликан.

Высокий молекулярный вес и внутримолекулярные силы придают гиалуроновой кислоте высокую вязкоупругость (Curran, 2010).

Гиалуроновая кислота содержится почти во всех тканях человека. Она присутствует в хрящевой ткани и синовиальной жидкости, в нервной ткани, а также в составе внеклеточного матрикса стенки кровеносных сосудов. Этот гликозаминогликан обладает несколькими очень важными функциями. В первую очередь он влияет на взаимодействие клеток с межклеточным веществом и оказывает воздействие на клеточную функциональную активность. Так же является одним из ключевых компонентов процессов, связанных с миграцией клеток, таких как эмбриогенез, заживление ран, воспаление и метастазирование. Это обусловлено способностью гиалуроновой кислоты моделировать функциональное состояние фагоцитов и иммунокомпетентных клеток (Капулер и др., 2015).

Гиалуроновой кислоте отведена роль сигнальной молекулы, оказывающей воздействие через специализированные рецепторы цитоплазматической мембраны и некоторые интрацеллюлярные пути распространения сигналов на различные функции клеток (Lee J., Spicer P., 2000) Во время дифференцировки клеточного пула происходит накопление гиалуронана, что совпадает с процессом миграции клеток во внеклеточном матриксе (Хабаров и др., 2012). Будучи главным компонентом перичеллюлярного слоя, который формируется на поверхности пролиферирующих клеток, гиалуронан облегчает разделение клетки, а также формирует каналы разной степени гидратированности, способствующие миграции клетки. Функции гиалуронана включают барьерную и сигнальную.

Гиалуроновая кислота также является антиоксидантом, который способствует нейтрализации большого количества свободных радикалов, образующихся в мозге при травме. Кроме того, она участвует в дифференцировке клеток, пролиферации нейронов, миграции клеток, морфогенезе, ангиогенезе и синаптической пластичности (Rusakov, Dityatev, 2014).

Равновесие между синтезом и распадом гиалуроновой кислоты играет ключевую роль в определении не только количества молекулы, но и молекулярной массы гиалуроновой кислоты и, следовательно, ее свойств. Было высказано предположение, что гиалуроновая кислота с разной молекулярной массой может оказывать различное, а иногда и противоположное биологическое воздействие. Например, высокомолекулярная гиалуроновая кислота оказывает противовоспалительное действие, контролируя привлечение воспалительных клеток, в то время как низкомолекулярная гиалуроновая кислота обладает провоспалительным действием и способствует ремоделированию тканей в процессе заживления ран (Tavianatou, et al., 2019).

Гиалуронидаза, фермент, деградирующий внеклеточный матрикс, вызывает одновременную деполяризацию мембраны и резкий приток кальция в нейроны. После разрушения внеклеточного матрикса частота спонтанных потенциалов действия быстро возрастает во вставочных нейронах. При этом в пирамидных клетках поля CA1 гиалуронидаза, напротив, снижает возбудимость, уменьшает поступление Ca^{2+} в дендритные шипики и нарушает долговременную потенцию (LTP) (Hayani et al., 2018).

По итогу исследований при разрушении основного компонента внеклеточного матрикса – гиалуроновой кислоты происходит снижение долговременной потенции. Гиалуронан изменяет активность потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа (L-VDCC), увеличивает поверхностную подвижность AMPA-рецепторов, содержащих эндогенную субъединицу GluR1, α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты, и увеличивает поверхностную экспрессию NR2b, субъединицы NMDA-рецепторов N-метил-D-аспартата (Sokolov et al., 2025).

Нейродегенерация сопровождается обширным повреждением нервной ткани, поэтому для восстановления утраченной функции скаффолд на основе гиалуроновой кислоты обеспечивает структуру, необходимую для миграции и размножения клеток, способствующих заживлению раны. Модифицированные

формы гиалуроновой кислоты были использованы в сочетании с факторами, способствующими росту костей, такими как мезенхимальные стволовые клетки человека, для стимуляции роста костей *in vivo*. Гиалуроновая кислота естественным образом разлагается гиалуронидазой *in vivo*, и в недавних исследованиях эта особенность была использована для контролируемого изменения скорости деградации с целью оптимизации роста костей (Patterson, et al., 2010, Zhang et al., 2015).

Гиалуроновая кислота является естественным компонентом мозговой ткани, поэтому ее биodeградация происходит в соответствии с физиологическими закономерностями, что сводит к минимуму вероятность образования нежелательных продуктов метаболизма. Высокая гидрофильность гиалуроновой кислоты также означает, что каркасы, созданные на ее основе, обладают хорошими адгезивными свойствами и создают благоприятную микросреду для клеток (Abatangelo et al., 2020). Более того, ГК может быть химически модифицирован простыми методами, которые позволяют создавать поперечные связи полимерных цепей с образованием высоко настраиваемых скаффолдов (Spearman et al., 2020).

Использование скаффолдов из гиалуроновой кислоты, созданных методом трехмерной фотопечати, представляет собой современную технологию в восстановительной медицине, применимую при лечении ЧМТ и заместительной терапии глиомы. Благодаря своей биологической совместимости они способны стимулировать регенерацию тканей и индивидуально подходить к конструкции имплантатов.

1.3.2 Нейротрофические факторы BDNF и GDNF

В последние годы наблюдается тенденция к увеличению комбинации скаффолдов и факторов роста для создания биоактивной системы, которая не только обеспечивает биомиметическую и биоразлагаемую физическую поддержку для роста ткани, но также исследует биологические сигналы для

модуляции регенерации ткани (Shalumon, Chen, 2015; Caballero, 2019; Subbiah, Subbiah, 2019).

Использование эндогенных регуляторных молекул для коррекционных возможностей функционально активных клеток при нейродегенерации является перспективным направлением нейробиологии. Поддержание жизнеспособности нервных клеток с помощью биологически активных молекул, таких как нейротрофические факторы BDNF и GDNF является наиболее актуальным терапевтическим методом в исследованиях. Данные белковые соединения способствуют дифференцировке и миграции клеток. Факторы роста BDNF и GDNF привлекают все больше внимания как модуляторы синаптической передачи в зрелой ЦНС. Они обладают регулируемой секрецией в нейронах и могут транспортироваться к терминалям, где положительно или отрицательно модулируют быструю синаптическую передачу (Gibon, Barker, 2017; Ferrini, et al., 2021).

Нейротрофические факторы BDNF и GDNF предотвращают нейродегенерацию, способствуют росту аксонов, поддерживают синаптическую пластичность и обеспечивают функции высшей нервной деятельности, включая обучение и память (Park, Poo, 2013; Colucci-D'Amato, et al., 2020; Mahato, Sidorova, 2020).

Эти представители классов нейротрофических факторов, синтезирующиеся нейронами и глиальными клетками головного мозга и принимающие участие в процессах роста и развития клеток, играют ключевую роль в выживании и оказывают выраженное нейропротекторное действие при развитии патологических состояний центральной нервной системы (Numakawa, et al., 2018; Skaper, 2018).

Нейротрофины синтезируются в виде белков-предшественников — препронеуротрофинов, которые после процессинга образуют пронеуротрофины. Последние могут секретироваться либо подвергаться протеолитическому расщеплению с образованием зрелых форм, обладающих отличной от проформ биологической активностью (Yang, et al., 2014).

BDNF – важнейший фактор роста нейронов. Он участвует в процессах дифференцировки нейронов и их выживании, стимулирует синаптическую пластичность, необходимую для формирования процессов обучения и памяти. Дефицит данного нейротрофина ассоциирован с такими заболеваниями, как депрессия, шизофрения. Повышение уровня BDNF может способствовать улучшению когнитивных функций и общего психического здоровья. Поддержание высокого уровня экспрессии BDNF для профилактики и терапии нейродегенеративных заболеваний являются перспективными средствами замедления прогрессирования болезни Альцгеймера и Паркинсона (Egan et al., 2003).

GDNF – фактор роста, выделяемый глиальными клетками, которые поддерживают функциональную активность нейронов. GDNF способствует выживанию и росту мотонейронов, особенно чувствительных к повреждениям, участвует в регенерации периферических нервов. Этот фактор важен для нормального функционирования аксонов и миелиновых оболочек, обеспечивая поддержку клеток центральной нервной системы. Недостаточность GDNF связана с дегенерацией нейронов и развитием неврологических заболеваний, таких как Паркинсон и амиотрофический склероз. В клинических исследованиях показан потенциал применения GDNF как защитного агента против нейродегенерации, однако, применение фактора ограничено сложностью доставки препарата непосредственно в мозг, так как этот белок слабо проникает через гематоэнцефалический барьер. Использование вирусных векторов для повышения продукции GDNF в ткани головного мозга при болезни Паркинсона демонстрирует не только восстановление поврежденных нейрональных сигнальных путей, но и предотвращение дальнейшего разрушения нейронов. (Cintrón-Colón, et al., 2020).

Значительный вклад BDNF и GDNF был выявлен в активации внутренних механизмов функционального восстановления поврежденной мозговой ткани после травм и других неврологических расстройств. Поэтому данные

нейротрофические факторы играют важное звено в доклинических исследованиях регенеративной медицины (Cacialli, 2021).

BDNF в головном мозге представлен в больших количествах, в отличие от других нейтрофинов и в мозге грызунов так же его экспрессия превышает уровень экспрессии GDNF. Структура гена BDNF является схожей у человека и грызунов (Ilchibaeva et al., 2015).

Регуляторную роль в синаптической пластичности играет BDNF, который способен влиять и индуцировать как долговременную потенцию, так и депрессию. BDNF регулирует работу постсинаптических глутаматных рецепторов. При нейродегенеративных заболеваниях уровень продукции BDNF снижается, это в свою очередь, может привести к нарушению возбуждающей / тормозной нейротрансмиссии, поэтому роль BDNF в регуляции ГАМК-ергической передаче имеет весомое значение, так как для нормальной работы мозга необходим баланс в тормозном и возбужденном состоянии нейронных сетей (Porcher et al., 2018). После повреждения уровень BDNF увеличивается, стимулируя процессы регенерации нейронов и улучшая восстановление повреждённых тканей. Это достигается путём активации TrkB-рецепторов, которые инициируют сигнальные пути, ведущие к увеличению синтеза белков, необходимых для репарации повреждений. Экспериментальные исследования показывают, что экзогенное введение BDNF улучшает исходы после ТГМ, снижая объём поражения и отека нервной ткани. GDNF также проявляет защитные свойства при травматическом поражении ЦНС. (Kaplan, et al., 2010, Guo, et al., 2022).

Регуляция миграции нервных клеток, поддержание функционирования и жизнеспособности нейронов, проявление антиапоптотических эффектов, а также регуляция активности факторов транскрипции проявляет нейротрофический фактор GDNF. Этот фактор стимулирует синаптогенез, участвует в стабильности и формировании при повреждениях дендритов и аксонов нейронов гиппокампа и коры больших полушарий. GDNF также проявляет защитные свойства при травматическом поражении ЦНС. Как было

показано в исследованиях на животных моделях, введение GDNF снижает степень апоптоза нейронов и способствует восстановлению аксональных волокон. Механизм действия GDNF включает стимуляцию рецептора Ret, что приводит к запуску внутриклеточных каскадов, направленных на защиту и восстановление нейронов (Duarte, et. al., 2012, Ibanez, Andressoo, 2017). В исследованиях подтверждается, что при формировании долговременной памяти из кратковременной повышение уровня экспрессии BDNF в гиппокампе и коре больших полушарий, происходит в процессе формирования новых навыков и обучения. Таким образом, можно отметить, что BDNF и GDNF играют важную роль в обучении и формировании памяти (Klug et al., 2012; Mitre et al., 2017). Эти нейтрофические факторы обладают выраженным цитопротекторными свойствами и способствуют выживаемости нервных клеток при различных травмах (Huang et al., 2017).

Несмотря на выраженный нейропротекторный потенциал, остается открытым вопрос о целесообразном способе стимуляции этих эндогенных сигнальных молекул с минимальным риском побочных эффектов. На сегодняшний день не разработаны терапевтические методики с подходящим способом доставки и фармакокинетикой, обладающие способностью воздействовать только на целевые молекулы с минимальным риском побочных эффектов (Castren, Antila, 2017).

BDNF и GDNF являются нейротрофическими факторами, оказывающими значительное влияние на процессы регенерации и выживания нейронов после ЧМТ и при опухолевых заболеваниях, таких как глиома. Оба фактора играют ключевую роль в функционировании нервной системы и имеют потенциальное значение для разработки новых методов лечения нейродегенеративных заболеваний, так как участвуют в процессах поддержания и восстановления нервной ткани. Добавление биоактивных соединений, таких как факторы роста, увеличивает эффективность восстановления, стимулируя процесс регенерации. загрузка нейротрофических факторов BDNF и GDNF в *crfaajkl*s различного состава усиливала регенерацию периферических нервов при повреждении спинного мозга,

а так же обеспечивала положительную динамику восстановления ткани головного мозга при экспериментальном инсульте (Cook et al., 2017, Cacialli, 2021). Показано, что экзогенная или эндогенная стимуляция выработки нейротрофических факторов BDNF и GDNF оказывает выраженный нейропротекторный эффект, способствуя сохранению жизнеспособности клеток, в том числе не входящих в нейронно-глиальные сети (Gustafsson, et al., 2021).

2. Материалы и методы исследования

2.1 Объект исследования

Материалом для исследований ЧМТ *in vivo* послужили самцы мышей линии C57Bl/6 (3–4 месяца). Животные содержались в виварии Национального исследовательского Нижегородского государственного университета, и исследовательская работа проводилась в соответствии с требованиями приказом №267 МЗ РФ от 19.06.2003, а также в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» и отвечали требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов», и были согласованы с биоэтической комиссией ННГУ.

Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 708н (от 23 августа 2010 года), в котором описаны правила содержания и использования лабораторных животных, а также с директивой Европейского парламента 2010/63/EU (от 22 сентября 2010 года) о защите животных, используемых в научных целях. Процедуры также были одобрены Комитетом по биоэтике Нижегородского государственного университета имени Н. И. Лобачевского (протокол № 44 от 16 октября 2020 года).

В завершении эксперимента совершается безболезненное умерщвление животного. Утилизацию биологического материала производили в соответствии с санитарными правилами и нормами N2.1.7.2790-10 от 12 декабря 2010 года «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

2.2 Схема эксперимента

В ходе исследования были рассмотрены два варианта нейродегенеративного изменения ткани головного мозга – черепно-мозговая травма и глиобластома, и дальнейшее поддержание поврежденной ткани с помощью скаффолдов на основе

метакрирированной гиалуроновой кислоты, а также с добавлением различных терапевтических агентов.

На первом этапе работы провели моделирование черепно-мозговой травмы с помощью метода свободного падения груза (рис.3,4). После введения животного в хирургический наркоз производилось формирование трепанационного окна размером 1*2 мм толщиной 2 мм (Jiasong, et al., 2009). Место удара размещалось под пластиковой полый стойкой высотой 0,80 м. Внутри стойки располагался груз с тупой поверхностью массой 4 грамма.

В посттравматический период на 7 сутки проводилось удаление поврежденной ткани коры головного мозга, и имплантация скаффолдов на основе метакрирированной гиалуроновой кислоты.

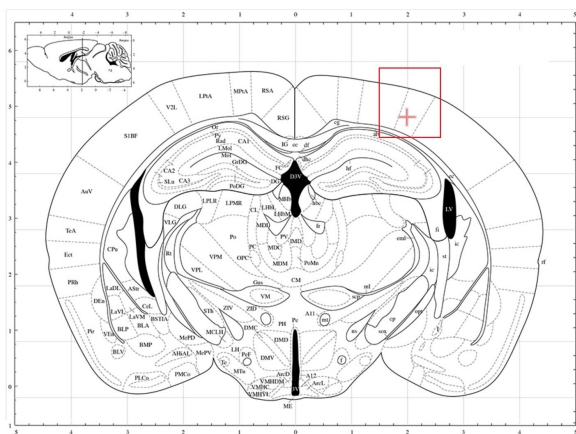


Рисунок 3. Стереотаксическое расположение очага ЧМТ.

В исследовании так же использовались скаффолды, которые были нагружены рекомбинантными человеческими белками нейротрофического фактора GDNF и BDNF (rhBDNF, 248-BDB R&D Systems, rhGDNF, 212-GD, R&D Systems, США) 100 нг/скаффолд (рис.1).

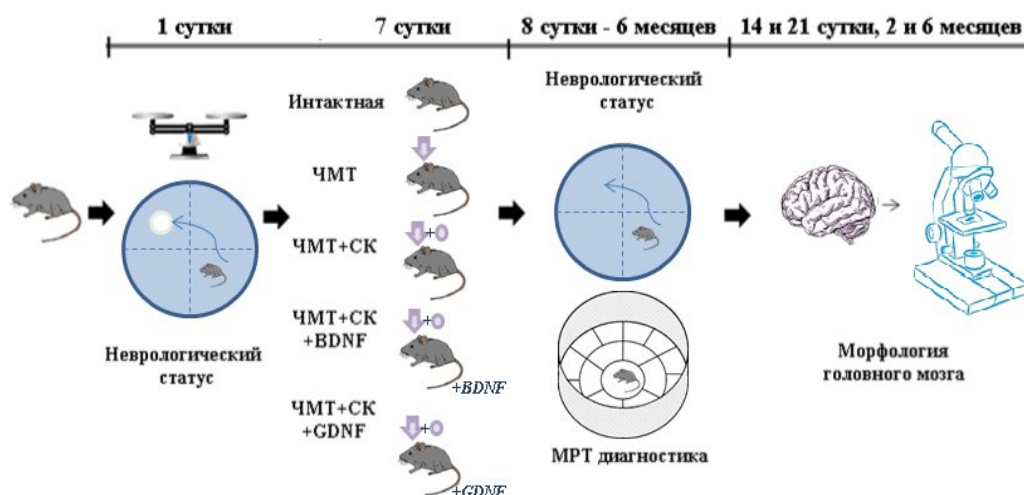


Рисунок 4. Схема эксперимента оценки эффективности скаффолда с добавлением нейротрофических факторов BDNF и GDNF при ЧМТ

На следующем этапе работы рассмотрели имплантацию клеточную линию глиомы GL261, известную своей высокой агрессивностью (Szatmári et al., 2006), для моделирования активного роста опухоли и метастазирования. В качестве основного противоопухолевого препарата рассматривалась комбинация скаффолда с темозоломидом. Ортотопическая трансплантация клеток глиомы GL261 (3×10^4 клеток в 2 мкл PBS) и последующая трансплантация скаффолда (2мм × 2мм × 2мм) проводилась в правое полушарие в мозговую ткань на глубину примерно $2 \pm 0,5$ мм. Животное было зафиксировано в стереотаксической рамке. Заранее было сформировано трепанационное окно. Скаффолд был нагружен цитостатическим препаратом темозоломидом (ТМЗ) с результирующей концентрацией активного вещества 0,67% (рис.5).

В течение 2 недель после инокуляции клеток глиомы и имплантации каркаса у мышей оценивали неврологический статус, общую двигательную активность и ориентированно-исследовательскую активность в условиях «открытого поля», а также когнитивные функции и способность к обучению в тесте пассивного избегания.

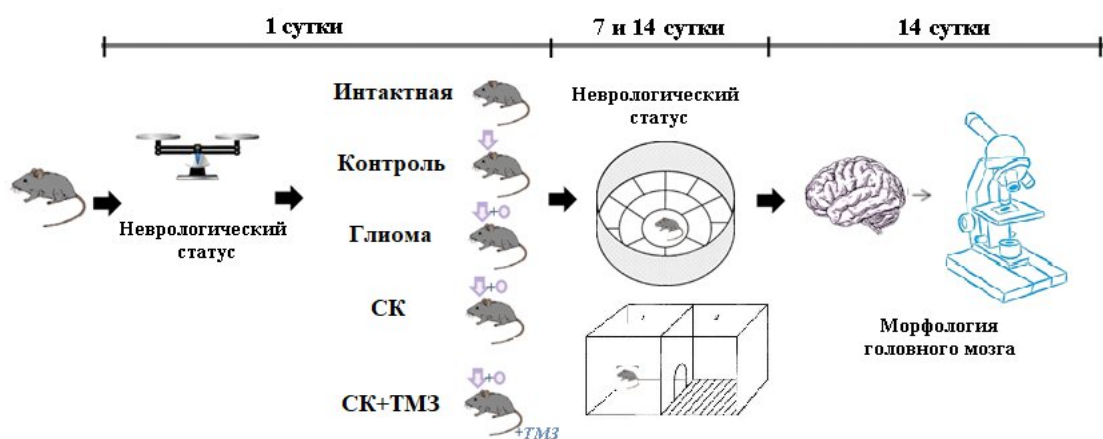


Рисунок 5. Схема эксперимента оценки эффективности скаффолда с добавлением темозоломида при модели глиомы

На каждом этапе работы использовались трехмерные конструкции скаффолды, в основе которых находится метакрилированная гиалуроновая кислота, обработанная фотоотверждаемой композицией (Savelyev et al., 2017).

Гиалуроновую кислоту (1 г) растворили в деионизированной воды, после чего добавили диметилформамида. В реакционную смесь добавили бромид тетраэтиламмония (1 г) в качестве катализатора межфазного переноса для улучшения растворимости глицидилметакрилата (GMA). Для минимизации риска контаминации были добавлены пенициллин-стрептомицин (5000 ЕД/мл и 5000 мкг/мл) и амфотерицин В (5000 мкг/мл). После полного растворения этих компонентов при постоянном перемешивании при температуре 25 °С добавили 14 мл НАГМ. Гиалуроновую кислоту, модифицированную глицином (НАГМ). Для оптимизации механических свойств гидрогелей добавляли нетоксичный линейный полимер ПЭГ-ДА ($M_n = 575$, 2,5 % по массе). Затем смесь растворяли в ультразвуковой ванне до получения однородной консистенции. Гелеобразование фотоотверждаемой композиции осуществлялось при световом возбуждении с помощью диода Vega-Solaris (ООО «Полироник», Россия). Экспонирование проводили УФ светом на длине волны 365 нм, интенсивностью 16 мВт/см².

В работе были протестированы следующие образцы биоинженерных 3D каркасов - скаффолдов:

- СК 1

Состав:

МГК (метакрилированная гиалуроновая кислота), синтез 11.1 – 20%

ПЭГ-ДА (полиэтиленгликоль диакрилат), Mn=575 – 2.5%

Рибофлавин моноклеотид – 0.0004%

Растворение композиции проводилось в NaCl, изотоническом растворе для инъекций 0,9% в ультразвуковой ванне до полного растворения.

- СК 2

Состав:

МГК (метакрилированная гиалуроновая кислота), синтез 11.1–20%

ПЭГ-ДА (полиэтиленгликоль диакрилат), Mn=575 – 2.5%

Рибофлавин моноклеотид – 0.0004%

Растворение композиции проводилось в 2%-ом растворе коллагена в ультразвуковой ванне до полного растворения.

- СК 3

Состав:

МГК (метакрилированная гиалуроновая кислота), синтез 5.3 – 20%

ПЭГ-ДА (полиэтиленгликоль диакрилат), Mn=575 – 2.5%

Рибофлавин моноклеотид – 0.0014%

Растворение композиции проводили в NaCl, изотоническом растворе для инъекций 0,9% в ультразвуковой ванне до полного растворения.

Трехмерные гидрогелевые структуры были изготовлены методом экструзионной печати (Später, et al., 2020). Формирование рисунка осуществлялось путем перемещения печатной платформы с помощью двух высокоточных шаговых двигателей (рис.6). 3D-структура формировалась послойно в соответствии с разработанной компьютерной моделью. Облучение запускает процесс гелеобразования, вызванный фотосшиванием полиакриламида. Осаждение гидрогелевого волокна на подложку визуально

контролировалось с помощью камеры (Scopetek DCM130, Китай), оснащенной светофильтром нейтральной плотности. Постэкспозиционная обработка при мощности 30 мВт/см^2 проводилась в течение 40 минут для достижения однородного фотосшивания слоев гидрогеля.

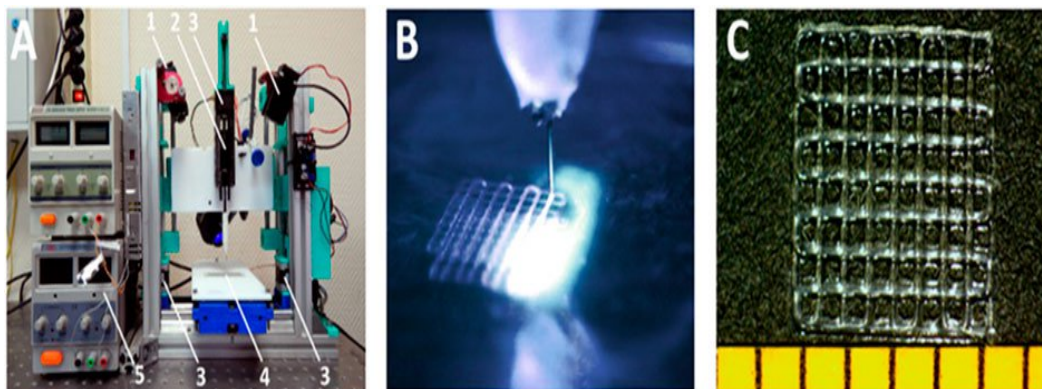


Рисунок 6. D-экструзионная печать с одновременным фотоотверждением. (А) установка для экструзии: 1) лазеры непрерывного излучения; 2) экструдер; 3) шаговые двигатели; 4) отсек для образцов; 5) блок питания. (В) фотоотверждение экструдированного гидрогеля. (С) структура гидрогеля на подложке.

На финальном этапе эксперимента трёхмерные скаффолдные конструкции экспонировали нейротрофическими факторами и темозоломидом.

Каркасы были стерилизованы в водных растворах этанола (74,1 %) и изопропанола (10 %) в течение 15 минут, подвергнуты воздействию ультрафиолетового излучения (365 нм) с плотностью мощности 160 мВт/см^2 в течение 30 минут и высушены в стерильных условиях. Нейротрофические факторы BDNF (рекомбинантный BDNF, 248-BDB, R&D Systems, США) и GDNF (рекомбинантный GDNF, 212-GD, R&D Systems, США) растворяли в воде в течение 1 часа в концентрации 30 нг/мкл. Скелетные каркасы помещали в водный раствор фактора роста на 15 минут, после чего аккуратно удаляли излишки жидкости с поверхности каркаса. Конечная концентрация нейротрофических факторов составила примерно 100 нг на скаффолд. Отдельные скаффолды были нагружены по такому же принципу раствором цитостатического препарата темозоломида с концентрацией 0,67 %.

2.3 Моделирование черепно-мозговой травмы

Перед началом работы животные были наркотизированы зоветилом и ксила. Хирургическую стадию наркоза определяют по отсутствию у животного проприоцептивных рефлексов.

В нашем случае ЧМТ открытого типа, то перед её моделированием необходимо сформировать в черепе подопытного животного трепанационное окно (отверстие) размером 1*2 мм толщиной 2 мм (Jiasong, et al., 2009). Первостепенно необходимо сделать разрез длиной 1 см по средней линии скальпа. Индуцированная полость поражения была обнажена со стороны правого полушария. Затем на коже головы, свободной от шерсти и обработанной асептическим раствором производят трепанацию фрезой костей черепа (2 мм латеральнее от срединной линии) (рис.7). Твердую мозговую оболочку оставляют неповрежденной. Краниотомии были выполнены рядом с центральным швом, правее от пересечения лямбды и брегмы.

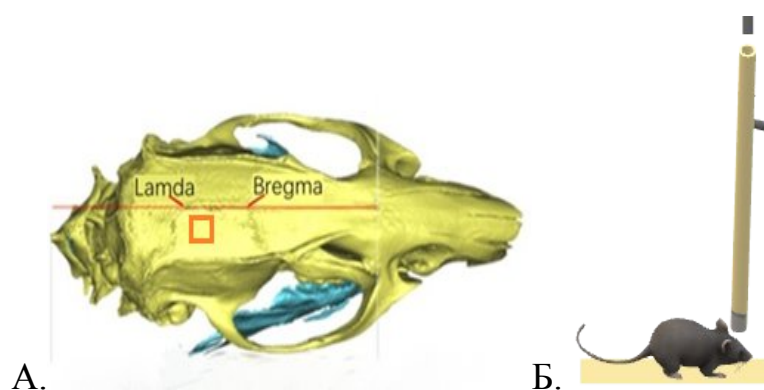


Рисунок 7. А.Череп грызуна, оранжевым квадратом показано место нанесения ЧМТ; Б.Модель свободного падения груза (Mishchenko, et al., 2022)

Механическую травму воспроизводили с помощью свободного падения груза. Животное жестко фиксировалось на подставке. Место удара размещалось под пластиковой полый стойкой высотой 0,80 м. Внутри стойки располагался груз с тупой поверхностью массой 4 грамма. Через данную станину сбрасывают груз для нанесения фокального удара по заданной

области головы. Во избежание перелома челюсти голову животного фиксировали на мягкой подкладке и достигали горизонтального расположения свода черепа к торцевому участку груза. Животное дышало самостоятельно.

После нанесения травмы кожу животных плотно ушивают хирургической нитью (0,2 мм), шов обрабатывают антисептическим раствором. По итогу создания ЧМТ мышью оставляют для восстановления от наркоза. Впоследствии животных обеспечивают послеоперационным уходом и свободным доступом к пище и воде.

Использование данной модели наиболее полно воспроизводит клиническую картину очагового повреждения, в том числе ушиба головного мозга, и позволяет изучать, помимо локальных, травматические изменения, сопровождающиеся вторичной гибелью нервных клеток в отдаленных отделах мозга, чувствительных к травме, таких как гиппокамп, зубчатая извилина, зрительный бугор, а также оценивать грубые двигательные нарушения, изменения тонкой координации движений, дефицит когнитивных функций (Балябин и др., 2015).

2.4 Моделирование ортотопической трансплантации клеток глиомы

При отсутствии проприоцептивных рефлексов голову мыши очищали от шерсти и фиксировали в стереотаксической раме (World Precision Instruments, США). Клетки глиомы GL2621 (3×10^4 клеток в 2 мкл фосфатно-солевого буфера) и каркас (2 мм × 2 мм × 2 мм) помещали в ткань мозга на глубину примерно 2 ± 0.5 мм. Затем рану зашивали, плотно стягивая прилегающие ткани хирургической нитью (0,2 мм), и обрабатывали антисептиком, чтобы избежать инфицирования. Для послеоперационного обезболивания был назначен метакам (0,002 мг/мл). После выхода из наркоза животных вернули в клетки и обеспечили послеоперационный уход с доступом к еде и воде (Mishchenko, et al., 2024).

2.5 Тест Условный рефлекс пассивного избегания

Методика исследования условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) считается базисной моделью для оценки действия фармакологических агентов и факторов окружающей среды на формирование и воспроизведение памятного следа. Тест УРПИ оценивает быстроту выработки рефлекса, и, соответственно, формирования долговременной памяти.

Установка для УРПИ представляет собой камеру, состоящую из 2-х отсеков: освещенного и затемненного с электропроводящим полом (рис. 7).

Мышь помещается в освещенный отсек камеры спиной к темному (стартовое положение). Под влиянием исследовательского поведения и врожденного предпочтения темных участков пространства (фотофобии) грызуны, как правило, достаточно быстро заходят в темный отсек (латентное время перехода фиксируется). После перехода в темный отсек камеры осуществляется подача электрического тока (0,3–0,6 мА) в течение 5 сек, после чего мышь возвращают в жилую клетку. Продолжительность первого обучающего тестирования составляет 180 сек.

Для оценки сохранности памятного следа, через 48 часов проводится повторное тестирование. Мышь тестируется в той же камере, но без подачи тока с регистрацией латентного периода перехода в темный отсек камеры. Продолжительность второго тестирования составляет 300 сек.

Считается, что, если животное не переходит в темный отсек камеры в течение 180 сек, памятный след полностью сохранен (Kruk-Slomka M., et al, 2021).

2.6 Водный Лабиринт Морриса

Нарушения когнитивных функций после экспериментальной ЧМТ у мышей, выявляемые путем оценки пространственной памяти в водном лабиринте Морриса (ВЛМ) (рис.8) (Morris, 1984)

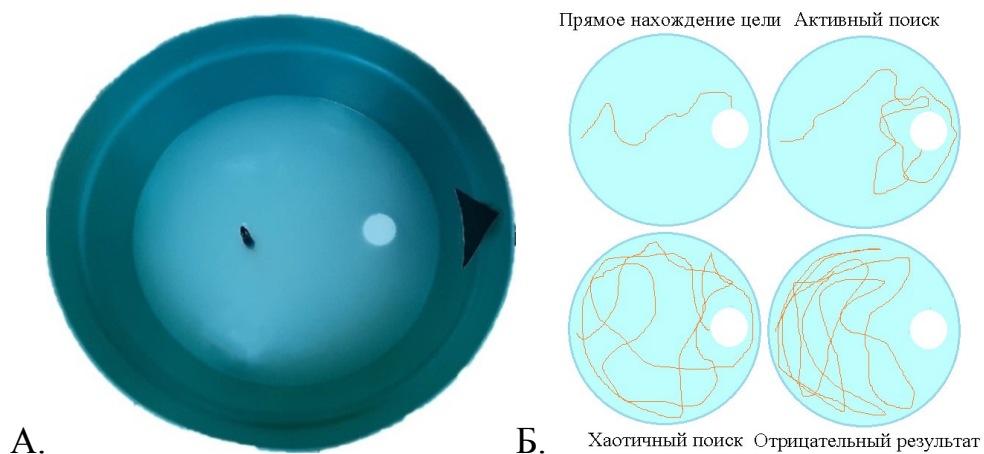


Рисунок 8. А. Установка водный лабиринт Морриса; Б. Основные стратегии поиска цели при отсроченном тестировании животных в ВЛМ

ВЛМ представляет собой круглый бассейн диаметром 90 см, заполненный теплой водой, которую делают непрозрачной путем добавления сухого молока. В постоянное место бассейна помещают подвижную платформу диаметром 10 см, поверхность которой находится на 1–2 см ниже поверхности воды. В течение 5 суток проводят тренировки животных длительностью 60 минут по 3 раза. Опуская животное в бассейн с разных сторон, их обучают находить платформу по внешнему визуальным ориентиру. Если животное до конца времени не находит платформу или спрыгивает с неё, то мышь ставят на платформу принудительно.

После нанесения травмы оценивают способность животного вспомнить местонахождение платформы. Для этого платформу удаляют и животное помещают в ВЛМ. С помощью программы Smart в течение 1 мин оценивают длительность пребывания животного в зоне, где раньше находилась платформа (Белошицкий, 2008). Так же оценивают траекторию движения животного в условиях отсроченного тестирования без платформы. Использование ВЛМ позволяет точно охарактеризовать тяжесть и эффективность методики лечения при экспериментальной ЧМТ.

2.7 Тест «Открытое поле»

Классическим методом анализа общей двигательной, ориентировочно-исследовательской активности, а также эмоционального состояния животного в ответ на фармакологическое воздействие или воздействие факторов окружающей среды является тест «Открытое поле». В данном тесте моделируется потенциально опасная ситуация для животного путем помещения в ярко освещённое пространство, значительно превышающее по размерам жилую клетку. Таким образом, это метод исследования поведения, основанный на конфликте двух мотиваций - инстинктивной тенденции к исследованию нового окружения и тенденции минимизировать возможную опасность со стороны такового.

Установка «Открытое поле» для мышей представляет собой круглую пластиковую арену белого/серого цвета (диаметр арены 97 см и высота стенок 42 см). Освещенность площадки во время проведения эксперимента должна составлять 200 Лк. За 1 час до проведения тестирования животное переносится из жилой комнаты в тихое, слабо освещенное помещение. Мышь помещают в центр арены и в течение 5 минут проводят регистрацию поведенческих реакций (для удобства чаще всего используется видеокамера).

Во время тестирования каждого объекта на протяжении пяти минут проводилось исследование на двигательную активность, характер перемещений. При этом регистрировался ряд поведенческих показателей:

1. Болюсы (уринации и дефекации).
2. Вертикальной активности (количество стоек)
3. Горизонтальная активность (суммарное количество прохождение квадратов поля на периферии и в центре)
4. Груминг (длительный и короткий).

Исследуется эмоциональная реактивность, общее исследование активности физиологических реакций животных, связанных со страхом, с

последующим выявлением групповой корреляции (Let al., 2020, Snyder C., 2021).

2.8 Оценка неврологического статуса

Для оценки динамики неврологических расстройств проводили исследование по шкале неврологического дефицита.

В ходе тестирования оценивают по модифицированной для мышей шкале оценки выраженности неврологического дефицита, где 7-10 баллов расценивается как выраженное повреждение, 4-6 баллов - умеренное повреждение и 1-3 баллов - как легкое (Beni-Adani, et al., 2001).

Данная шкала включает в себя тесты для выявления двигательной активности при подвешивании животного за хвост, особенности ходьбы по горизонтальной плоскости, координация движений, выраженность рефлексов (укол в подушечку лапки животного), мышечный тонус (подтягивание на перекладине), птоз и экзофтальм (Prickaerts, et al., 1999).

Для изучения степени сенсомоторных расстройств у взрослых грызунов используется ряд методов. В данном исследовании использовалась шкала оценки Гарсия, где максимально возможный балл 18, а минимально можно набрать 3 балла.

Оцениваемые параметры:

- ✓ Спонтанная активность в клетке за 5 мин;
- ✓ Симметричность вытягивания передних конечностей;
- ✓ Симметричность движений;
- ✓ Способность забираться по стенке проволочной клетки;
- ✓ Реакция на прикосновение к каждой стороне туловища;
- ✓ Ответ на прикосновение к вибриссам (Garcia, 1995., Sharma, et al, 2022).

2.9 Гистологическое исследование

Для изготовления срезов головной мозг фиксировали в 10% растворе формалина в течение двух суток, после чего 8 часов промывали водопроводной водой и оставляли на 12 часов в 70% спирте. Далее осуществляли дегидратацию материала в спиртах восходящей концентрации. После чего головной мозг помещали в смесь 95% спирта и ксилола, растворы ксилола. Для пропитки образцов парафином, их помещали в смесь парафина и ксилола, которая находилась в термостате при 37°C, и далее в парафин при 60°C. После пропитки объекты переносились в предварительно подогретые металлические формочки, заливались новой порцией расплавленного парафина.

Мозг разрезали на коронные срезы толщиной 5 мкм на ротационном микротоме MICROM HM650V (Германия) и помещали на предметное стекло. Для каждого мозга каждый третий срез (первые три и последние срезы исключены) был установлен на предметное стекло и высушен на воздухе.

Для изготовления криосрезов головной мозг фиксировали в 10% растворе формалина в течение суток при комнатной температуре. Следующие 24 часа мозг помещали сначала в 15% раствор сахарозы, а после на 24-48 часов в 30% раствор сахарозы (на 15 или 30 гр сахарозы 100 мл воды) для криозащиты.

После головной мозг устанавливали на платформу, постепенно заливая криогелем и замораживая внутри криостата при 30°C около 30-50 минут до полного застывания. Необходимо, чтобы зафиксированный в криогеле мозг, после размещения на панель для изготовления срезов, приспособился к температуре -20°C – - 26°C (около 20 минут). Это необходимое условие для более ровных и качественных срезов.

Мозг разрезали на коронные срезы толщиной 10 мкм на замораживающем скользящем криостате Leica CM1520 (Германия) и помещали на предметное стекло. Для каждого мозга каждый пятый срез был установлен на предметное стекло и высушен на воздухе.

Перед окрашиванием срезов для проникновения красителя в ткани необходимо провести их депарафинирование. Данная процедура осуществлялась последовательным помещением срезов в растворы ксилолов, спиртов нисходящей концентрации, и дистиллированную воду. Окрашивание образцов производилось гематоксилин-эозином. После чего срезы промывали водой, дегидратировались в спиртах восходящей концентрации, очищались в ксилолах и заключались в монтирующую среду.

При окрашивании срезов, изготовленных на криостате, стадия депарафинирования пропускается. Окрашивание производится гематоксилин-эозином. Каждый краситель необходимо наносить на образцы в неразбавленном виде. После срезы так же дегидратировались в спиртах восходящей концентрации, очищались в ксилолах и заключались в монтирующую среду.

2.10 Магнитно-резонансная томография

Магнитно-резонансная томография — это один из современных и безопасных видов исследования. Считается самым информативным при достоверности диагностики заболеваний. Позволяется детально визуализировать анатомические структуры. Аппарат позволяет получить сканирование (срезы проекций) тканей животного с помощью электромагнитных волн в магнитном поле высокой напряженности. Это позволяет рассмотреть орган или ткань трёхмерно.

Магнитно-резонансную томографию выполняли на томографе на высокопольном магниторезонансном томографе Agilent Technologies DD2-400 9.4 T (400 MHz) (Англия) с объемной катушкой M2M (H^1). Подогрев животных осуществлялся теплым воздухом с температурой 27°C. Животные находились под общей анестезией (золетил и ксила), в режиме T1 и T2 взвешенного изображения (ВИ). Размещение животного происходило вертикально с использованием холдера для фиксации животного внутри томографа. При проведении исследования мышь находилась

неподвижно-закреплённой внутри туннеля магнита аппарата около 40 минут. Для исследования головного мозга применяли поверхностную матричную радиочастотную катушку. Для получения и обработки результатов использовалась программа VnmrJ.

Послойные срезы головного мозга в фронтальной плоскости с получением T1- и T2-томограмм, взвешенных по протонной плотности, осуществляют, применяя импульсную последовательность MGEMS (multi gradient echo multi slice, «разноградиентное многослойное эхо») с параметрами: TR=1000 мс, TE=1.49мс, количество эхо – 6, FOV – 20x20 мм, матрица – изначально использовалась 128x128, а затем 256x256, толщина среза – 1 мм, количество срезов – 15, время сканирования – 17мин 04 с. Далее выполняется исследование для получения диффузионно-взвешенных изображений головного мозга животных. Для этого используется импульсная последовательности SEMS + diffusion (spin echo multi slice, «многослойное спиновое эхо») параметрами: TR=1200 мс, TE=2 мс, FOV – 20x20 мм, матрица – изначально использовалась 128x128, а затем 256x256, толщина среза – 1 мм, количество срезов – 15, время сканирования – 17мин 04 с.

2.11 Методы статистической обработки результатов

Количественные данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Для статистического анализа использовали GraphPad Prism (v.9.0). Для анализа нормального распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. Различия между двумя независимыми группами оценивали с помощью теста Манна-Уитни. Различия между двумя зависимыми группами оценивали с помощью теста Вилкоксона. Различия между группами считались значимыми, если соответствующее значение p было меньше 0,05.

3. Результаты и их обсуждение

3.1 Оценка эффективности скаффолда после моделирования

ЧМТ

На первом этапе исследования был проведен анализ нескольких вариантов материала наиболее пригодного для нейротрансплантации. Образцы содержали в своем составе метакрилированную ГК (11.1 – 20%), полиэтиленгликоль диакрилат - (2.5%) и рибофлавин моноклеотид (0.0004%). Растворение композиции 1 (СК1) проводили в изотоническом растворе для инъекций 0,9% NaCl. Растворение композиции 2 (СК2) проводилось в 2%-ом растворе коллагена.

По данным оценки неврологического статуса было установлено, что черепно-мозговая травма (ЧМТ) приводит к формированию выраженного неврологического дефицита (рис. 9). В группе животных с ЧМТ наблюдались значимые нарушения, проявлявшиеся хватательным и защитным рефлексам. К 7-м суткам отмечалось снижение общей чувствительности к раздражителям и двигательной активности.

Трансплантация скаффолдов СК1 и СК2 способствовала редукции неврологического дефицита, что подтверждалось достоверно более высокими значениями по шкале Гарсиа и более низкими — по шкале неврологического дефицита относительно группы ЧМТ ($p < 0,05$).

Трансплантация скаффолда СК1 к 7-м суткам обеспечивала повышение общей активности животных, при этом рефлекс вытягивания передних конечностей соответствовал таковому в интактной группе. Животные из группы со скаффолдом СК2 к 7-м суткам демонстрировали агрессивное поведение, выражавшееся в повышенной ажитации.

Достоверные различия по шкалам неврологического статуса между группами с ЧМТ и группами трансплантации скаффолдов свидетельствуют о том, что скаффолд направлен на поддержание и улучшение функционального состояния соматосенсорной системы.

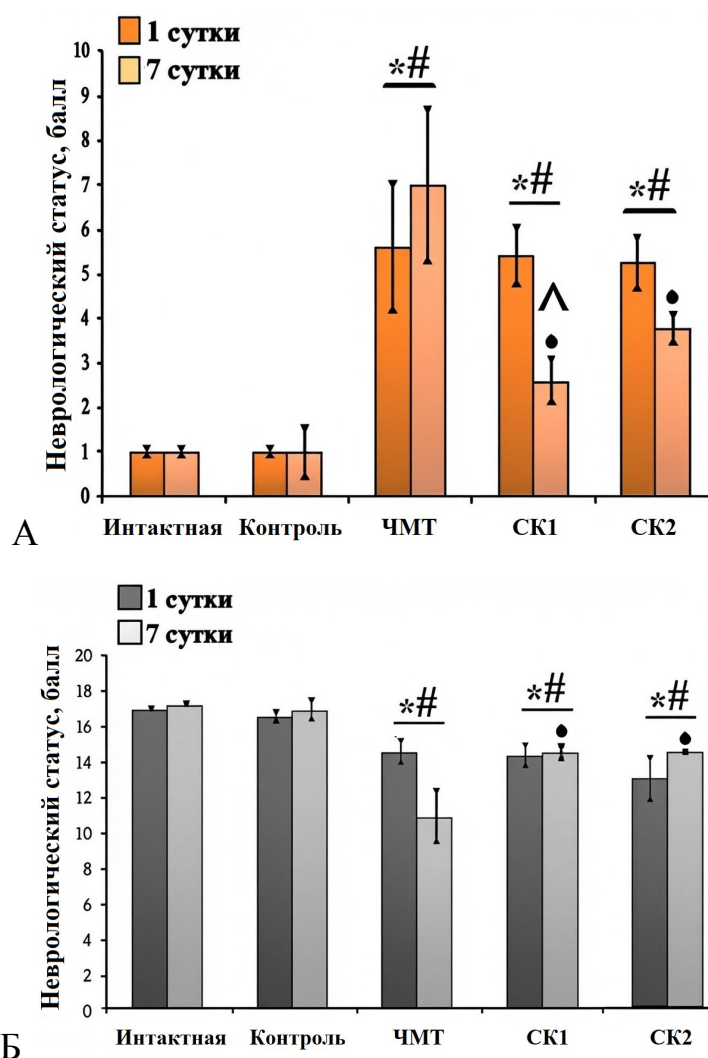


Рисунок 9. (А) Оценка неврологического дефицита и (Б) тест Гарсия * - относительно группы интактная, # - относительно группы контроль, . - относительно группы ЧМТ, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$), ^ - относительно 1 суток, $p < 0,05$, критерий Вилкоксона

При исследовании морфологических изменений в группе интактных животных была показана однородность нервной ткани. Клетки верхних слоёв коры имели округло-овальную форму с оформленным ядром и чёткими контурами, что соответствует нормальной ткани данной возрастной группы.

В группе с ЧМТ на гистологических образцах зафиксировано преобладание матрикса относительно общего количества клеток коры головного мозга, а также перичеселлюлярный и периваскулярный отёки и очаги некроза в области повреждения (рис. 10, табл. 1). Клетки преимущественно

приобретали звёздчатую или многоугольную форму. Обнаруженные морфологические изменения согласуются с литературными данными (Kaur, Sharma, 2018; Geoges, Das, 2023).

При трансплантации скаффолда СК1 к 7-м суткам отмечались его быстрая деградация и незначительные повреждения головного мозга. Наблюдался умеренный отёк клеток коры головного мозга. Некроз и отёк клеток снижались относительно показателей группы ЧМТ. Клетки преимущественно обладали округлой формой. При этом по мере приближения к области имплантата сома клеток приобретала более вытянутую форму, а ядро располагалось менее центрально.

При внедрении скаффолда СК2 наблюдался обширный по объёму некроз клеток, а также периваскулярный и перицеллюлярный отёки. На гистологических срезах выявлялись резко выраженный глиальный рубец и следы кровотечения. Видимые структурные элементы трансплантата на 7-е сутки отсутствовали. Поэтому СК2 не пригоден для реализации функции цитоподдержания нервной ткани в условии ЧМТ.

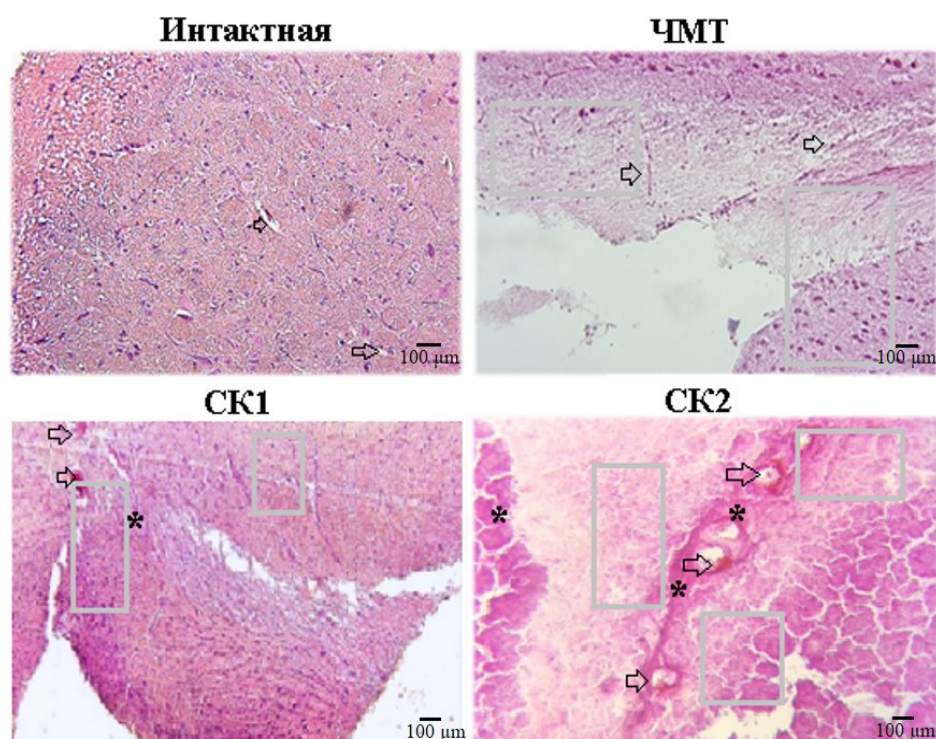


Рисунок 10. Репрезентативные гистологические образцы коры головного мозга мышей после черепно-мозговой травмы и трансплантации скаффолдов.

Окраска гематоксилин-эозином, ув. x10 *- глиальный рубец, серый прямоугольник – скопление некротических клеток, стрелочка – периваскулярный отек и участки кровоизлияния

Основываясь на гистологических данных, можно предположить, что скаффолд СК1 перспективен для дальнейшего изучения процессов репарации повреждённого участка нервной ткани при условии оптимизации сохранения его механических свойств.

С учётом недостатков СК1 и СК2 была разработана композиция СК3 на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты с повышенным содержанием рибофлавина, что направлено на длительное сохранение скаффолда в условиях нейротрансплантации.

При оценке неврологического статуса было показано, что неврологическое состояние животных с трансплантацией скаффолдов СК3 характеризуется как умеренное. На 7-е сутки после трансплантации параметры неврологического дефицита в данной группе составили $3,3 \pm 0,33$. Согласно

шкале Гарсиа, использование каркасов СКЗ снижает ноцицептивные проявления последствий хирургического вмешательства (1-е сутки после операции: СКЗ — $13,6 \pm 0,88$; 7-е сутки после операции: СКЗ — $15,6 \pm 0,33$).

К 7-м суткам неврологический статус животных достоверно ($p < 0,05$) отличался от показателей группы с ЧМТ по шкале Гарсиа. Нарушения состояния животного лёгкой степени тяжести выражались в снижении проприоцептивных реакций, общей активности и рефлексов одёргивания задних конечностей (рис. 11).

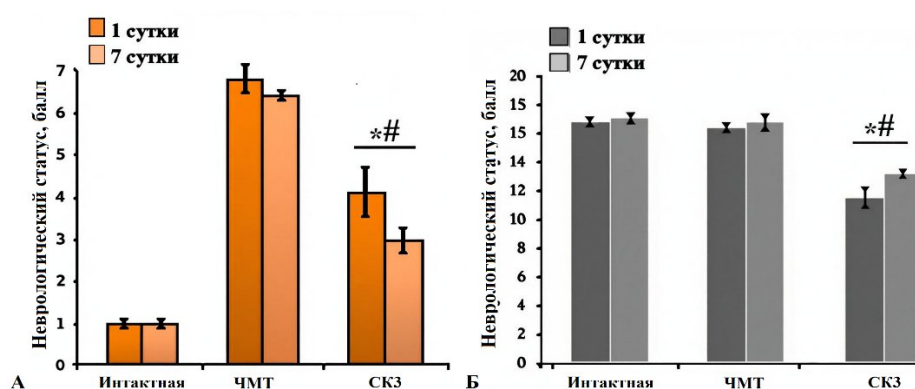


Рисунок 11. (А) Оценка неврологического дефицита и (Б) тест Гарсиа *-относительно группы интактная, #- относительно ЧМТ, критерий Манна-Уитни($p < 0,05$)

При морфологической оценке на 7-е сутки посттравматического периода зарегистрирована активная клеточная инвазия в структуру СКЗ (рис. 12, табл. 1). Репаративная активность подтверждалась идентификацией клеток с гипертрофией ядер, их периферической локализацией, а также бинуклеарных нейронов, совокупная доля которых в стандартных полях зрения достигала 30%. Поверхность скаффолда характеризовалась присутствием как отдельных мультиполярных клеток, так и конгломератов клеточных элементов.

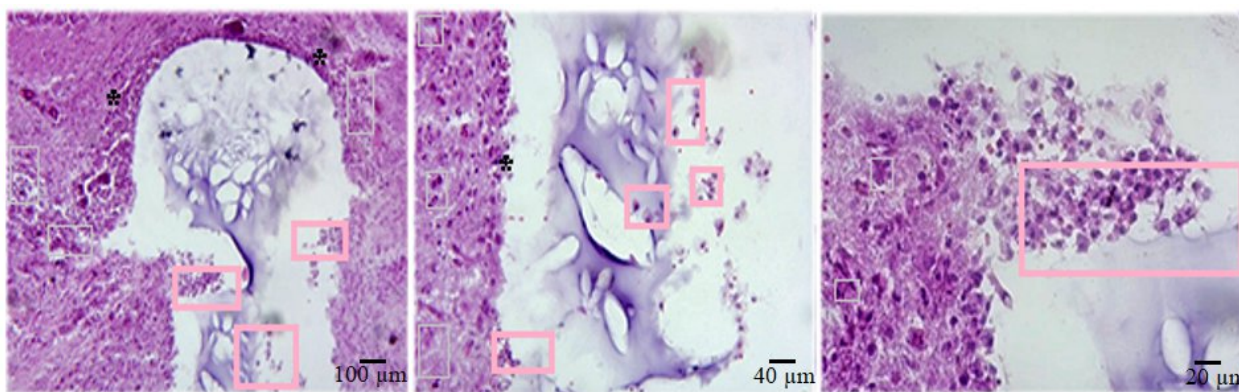


Рисунок 12. Репрезентативные гистологические образцы коры головного мозга мышей после черепно-мозговой травмы и трансплантации скаффолдов.

Окраска гематоксилин-эозином, ув. x10 x20 x40 соответственно. *- глиальный рубец, серый прямоугольник – скопление некротических клеток, розовый прямоугольник – скопление клеток на поверхности СК

Таблица 1: Морфометрические показатели ткани головного мозга после трансплантации СК ($M \pm SEM$)

Тип измерения /Группа	d кл., μm	ПЦО, μm	ПВО, μm	Кол-во видоизм. кл.
Интактная	$8,8 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,3$
ЧМТ	$11,5 \pm 0,1^*$	$3,2 \pm 0,3^*$	$3,7 \pm 0,1^*$	$10,5 \pm 0,4^*$
СК 1	$10,5 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,1^*$	$3,1 \pm 0,2^*$	$7,6 \pm 0,6$
СК 2	$10,9 \pm 0,2^*$	$2,8 \pm 0,2^*$	$3,4 \pm 0,1^*$	$10,2 \pm 1,2^*$
СК 3	$9,2 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,1^*$	$3,1 \pm 0,4^*$	$8,1 \pm 1$

d кл. – среднее значение диаметра клетки, ПЦО – среднее значение перицеллюлярного отека, ПВО – среднее значение периваскулярного отека, кол-во видоизм.кл. - среднее количество видоизмененных клеток. * - относительно группы интактная, критерий Манна-Уитни($p < 0,05$)

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что скаффолд СК3 обладает оптимальными биофизическими и биологическими свойствами: умеренная скорость деструкции сочетается с выраженной адаптивностью нервной ткани к скаффолду, минимальной воспалительной реакцией и отсутствием деструктивного воздействия на интактные ткани. Благодаря способности сохранять структурную

целостность зоны повреждения и восполнять дефицит объема, имплантируемый скаффолд создает благоприятные условия для поддержания и нормализации функционального статуса нервных клеток. Перечисленные характеристики обусловили целесообразность применения СКЗ на последующих этапах экспериментального моделирования.

3.2. Оценка эффективности скаффолда с нейротрофическими факторами BDNF и GDNF при моделировании ЧМТ

На следующем этапе работы была проведена оценка регенерационного потенциала нейротрофических факторов BDNF и GDNF при моделировании черепно-мозговой травмы. Использование скаффолдов снижало риск развития тяжёлых неврологических нарушений (рис. 13). К 21-м суткам посттравматического периода значения неврологического дефицита у мышей в группе с ЧМТ достигал $6,7 \pm 0,5$, что соответствует умеренному поражению центральной нервной системы. Наблюдались выраженные нарушения при выполнении двигательных задач, асимметрия движений, нарушение проприоцепции тела и снижение реакции на прикосновение к вибриссам.

Применение скаффолдов снижало риск развития тяжёлых неврологических нарушений. На 21-е сутки после имплантации значения неврологического дефицита у мышей в группах ЧМТ+СК, ЧМТ+СК+BDNF и ЧМТ+СК+GDNF составили $5,4 \pm 0,3$; $5,2 \pm 0,4$ и $5,6 \pm 0,2$ соответственно, что было достоверно ниже значений в контрольной группе (с ЧМТ) ($p < 0,05$). Тем не менее отмечалось незначительное повреждение ЦНС, связанное преимущественно с проприоцептивными нарушениями. Мыши из группы с черепно-мозговой травмой и СК также демонстрировали нарушение рефлексов при попытке схватиться за перекладину и край любой поверхности, что указывает на низкий мышечный тонус.

При оценке отдалённых последствий эксперимента по внесению скаффолда (спустя 6 месяцев) неврологический дефицит у мышей всех групп снизился до значений, соответствующих лёгкому поражению ЦНС (ЧМТ —

$4,4 \pm 0,5$; ЧМТ+СК — $3,8 \pm 0,5$; ЧМТ+СК+BDNF — $3,7 \pm 0,3$; ЧМТ+СК+GDNF — $3,3 \pm 0,4$). Однако он оставался выше значений интактной группы ($2,75 \pm 0,3$) ($p < 0,05$).

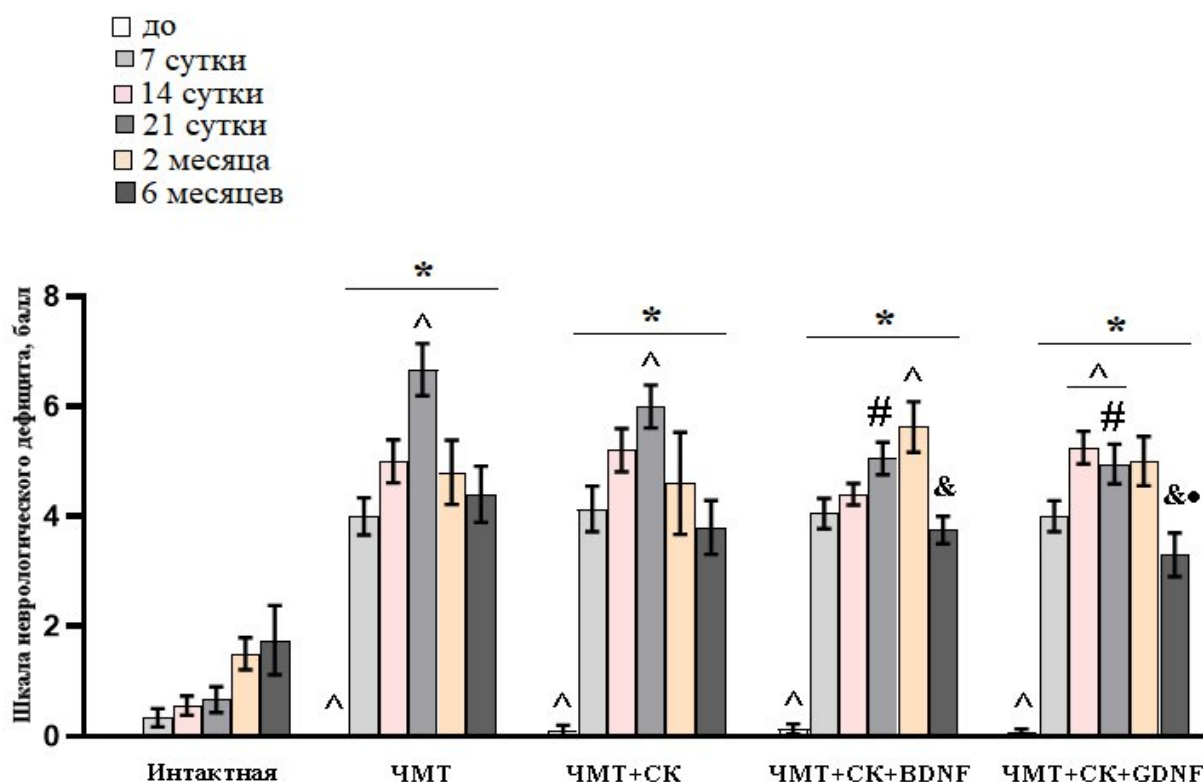


Рисунок 13. Оценка неврологического статуса у мышей после черепно-мозговой травмы с последующей пересадкой скаффолда. * - относительно группы интактная, # - относительно группы ЧМТ, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни, ^ - относительно 7 суток, · - относительно 21 суток, & - относительно 2 месяца, $p < 0,05$, критерий Вилкоксона

Анализ поведенческих реакций мышей в тесте «Открытое поле» на 21-е сутки после трансплантации каркасов не выявил выраженных изменений ориентировочно-исследовательской деятельности и эмоционального статуса животных по сравнению с интактной группой (табл. 2). Вместе с тем у мышей группы ЧМТ прослеживалась тенденция к снижению двигательной активности в центре арены и вертикальной активности, что могло быть сопряжено с параллельным развитием неврологического дефицита вследствие травмы. В группах ЧМТ+СК+BDNF и ЧМТ+СК+GDNF отмечалось снижение

вертикальной активности, однако двигательная активность в центре арены превышала показатели контрольной группы ($p \leq 0,05$), что позволяет предположить возможность развития эмоционального стресса. В группах с черепно-мозговой травмой и в группах с нейротрофическими факторами, как правило, реже регистрировалось проявление вертикальной активности, что указывает на возможность развития эмоционального стресса и снижение исследовательской активности.

Таблица 2: Параметры поведенческих реакций мышей в тесте «Открытое поле» на 21-й день после трансплантации скаффолда ($M \pm SEM$).

Экспериментальные группы	Горизонтальная активность		Время, проведенное в центре арены (с)	Количество вертикальных позиций	Время груминга (с)	Акты заглядывания
	Периферия	Центр				
Интактная	94,9 $\pm$ 6,6	22,7 $\pm$ 3,1	37,0 $\pm$ 5,7	10,7 $\pm$ 6,6	3,4 $\pm$ 1,0	41,4 $\pm$ 3,6
ЧМТ	84,5 $\pm$ 5,9	15,4 $\pm$ 2,4	29,6 $\pm$ 4,5	7,9 $\pm$ 6,6	1,9 $\pm$ 0,9	94,9 $\pm$ 4,0
ЧМТ+СК	96,6 $\pm$ 7,7	24,1 $\pm$ 4,4 [#]	35,0 $\pm$ 6,9	6,2 $\pm$ 6,6	3,9 $\pm$ 1,6	94,9 $\pm$ 4,3
ЧМТ+СК+BDNF	97,6 $\pm$ 14,8	26,7 $\pm$ 3,6 [#]	38,3 $\pm$ 5,5	6,6 $\pm$ 6,6	2,4 $\pm$ 0,8	94,9 $\pm$ 2,4
ЧМТ+СК+GDNF	95,3 $\pm$ 7,4	25,3 $\pm$ 2,6 [#]	42,8 $\pm$ 4,7 [#]	9,8 $\pm$ 6,6	2,9 $\pm$ 0,9	94,9 $\pm$ 1,7

- относительно группы ЧМТ, $p < 0,05$, тест Манна-Уитни

Помимо развития неврологического дефицита, черепно-мозговая травма сопровождается нарушениями мнестических и когнитивных функций. В связи с этим был проведён анализ пространственного обучения и памяти мышей в позднем посттравматическом периоде с использованием теста «Водный лабиринт Морриса».

Отсроченное тестирование в водном лабиринте Морриса (без платформы) показало, что последствия нейродегенеративного повреждения после ЧМТ к 21-м суткам и к 6-му месяцу снижают воспроизведение долговременной памяти (рис. 14, 15).

После моделирования черепно-мозговой травмы мыши сохранили способность к обучению. К пятому тренировочному занятию время, затрачиваемое на достижение платформы, сократилось в 5 раз, а тактика поиска цели стала более целенаправленной и характеризовалась круговыми и

радиальными движениями. Мыши, которым имплантировали контрольный скаффолд, продемонстрировали сниженную способность к обучению. Время, затраченное на достижение платформы на пятом тренировочном занятии в группе ЧМТ+СК, сократилось в 1,5 раза относительно исходных значений. Мыши из групп ЧМТ+СК+BDNF и ЧМТ+СК+GDNF также продолжительное время исследовали область поля в поисках цели. Однако к пятому тренировочному занятию время поиска сократилось в среднем в 4 раза. Животные из группы ЧМТ+СК+GDNF выбирали наиболее оптимальную траекторию движения, позволявшую достичь цели за минимальное время.

Отсроченное тестирование в водном лабиринте Морриса (без платформы) показало, что животные интактной группы в 90 % случаев выбирали прямую траекторию поиска платформы; негативный поиск при этом полностью отсутствовал.

Нейродегенеративные процессы после ЧМТ к 21-м суткам и к 6-му месяцу снижают воспроизведение долговременной памяти (рис. 14, 15). Мыши из группы с черепно-мозговой травмой направлялись к платформе сразу после начала теста, однако впоследствии изменяли траекторию и проводили больше времени в других секторах бассейна. Анализ стратегии поиска платформы показал, что в 50 % случаев мыши не находили платформу (рис. 15).

У животных в группе ЧМТ+СК наблюдалось выраженное нарушение долговременной памяти и снижение способности к обучению: в 90 % случаев попытка обнаружить цель оказывалась неудачной. Мыши проводили наименьшее время в той части бассейна, где ранее располагалась платформа.

Анализ стратегии поиска платформы показал, что в 50 % случаев отрицательный поиск платформы наблюдался у животных в группах ЧМТ и ЧМТ+СК+BDNF. Животные последней группы в 40 % случаев совершали хаотические движения в бассейне. Использование скаффолдов с GDNF снижало выраженность нарушений мнестических функций после моделирования ЧМТ — животные демонстрировали активный поиск

платформы. Показано, что в группе СК+GDNF воспроизведение следов сопоставимо с интактными значениями: негативный поиск платформы в этой группе отсутствовал как на 21-е сутки, так и на 6-й месяц исследования. Это может быть связано со стимулирующим действием глиального нейротрофического фактора на процессы синаптической пластичности.

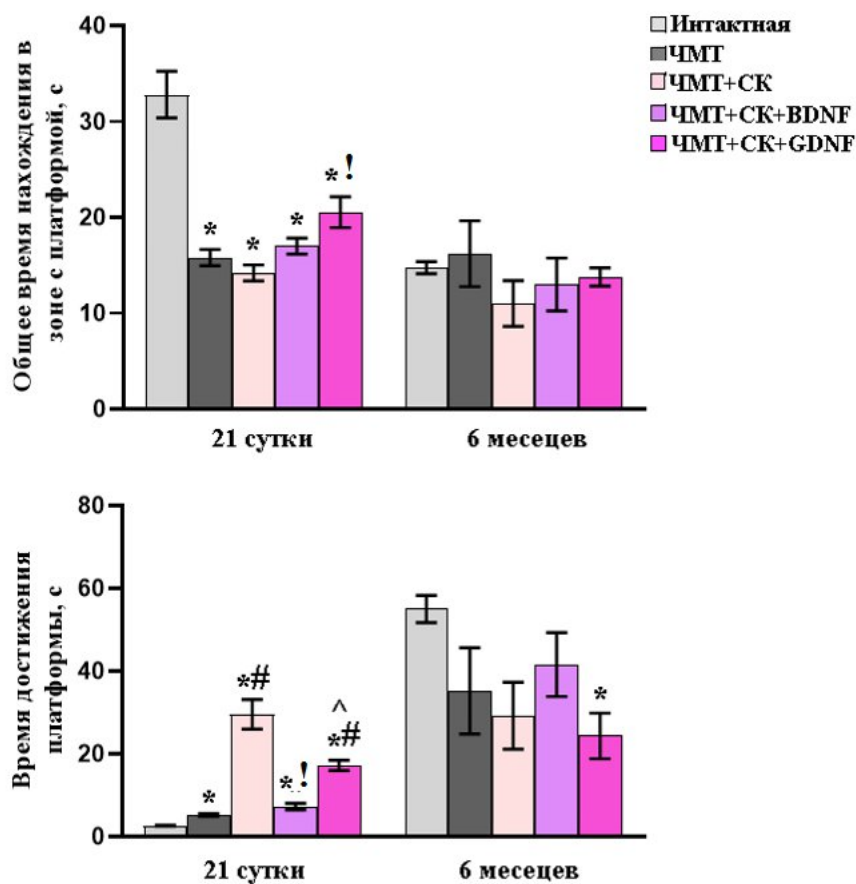


Рисунок 14. Основные стратегии поиска цели у мышей в тесте на сохранение долговременной памяти в водном лабиринте Морриса. * - относительно группы интактная, # - относительно группы ЧМТ, ! - относительно группы ЧМТ+СК, ^ - относительно группы ЧМТ+СК+BDNF, $p < 0,05$, тест Манна-Уитни

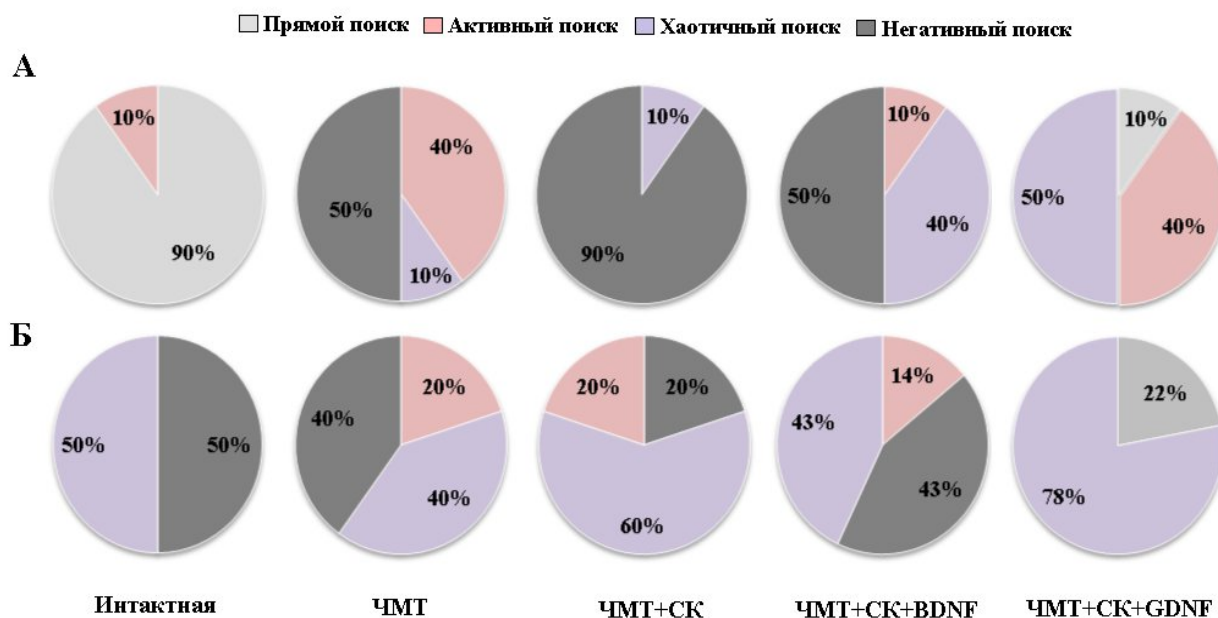


Рисунок 15. Основные стратегии поиска цели у мышей в тесте на сохранение долговременной памяти в водном лабиринте Морриса. А. 21 сутки, Б. 6 месяцев.

Гистологический анализ выявил существенные изменения морфологии коры головного мозга в посттравматическом периоде после ЧМТ на 7-е сутки (рис. 16, табл. 3). На 14-е сутки после ЧМТ наблюдалась полная утрата структуры нервной ткани в зоне повреждения, массивный отёк клеток и сосудов, а также обширные очаги некроза. Через три недели после ЧМТ структура ткани головного мозга была полностью нарушена, преобладал лизис ткани; в 10 полях зрения были обнаружены единичные нейроны с нормальными морфометрическими показателями. Через шесть месяцев после черепно-мозговой травмы обширный отёк и лизис тканей привели к образованию бесструктурного вещества в месте повреждения.

Слабая положительная динамика наблюдалась в группе СК. При использовании скаффолда через 14 суток после имплантации отмечались разрастание нервной ткани и небольшое кровоизлияние. Через три недели преобладал лизис более глубоких слоёв ткани. Кроме того, наблюдались множественное рубцевание тканей и нарушение плотного расположения клеточных структур. Через шесть месяцев после имплантации структура

тканей вокруг импланта характеризовалась выраженной клеточной адгезией; в 10 полях зрения отмечалось множественное скопление микроглии и клеток крови. Скаффолд претерпел структурные изменения и утратил свои механические свойства; остаточные фрагменты конструкции располагались отдельно от нервной ткани.

На 7-е сутки в месте повреждения в группе ЧМТ+СК+BDNF клеточная реакция ткани в области повреждения была менее выражена, чем в группе с черепно-мозговой травмой. Однако отёк и очаги разрастания тканей сохранялись на протяжении всего эксперимента. На 14-е сутки рядом с имплантатом образовался незначительный глиальный рубец. Развитие отёка тканей привело к увеличению числа некротических тел к 21-м суткам после имплантации скаффолда. К 6-му месяцу структура ткани становилась неоднородной; периваскулярный отек регрессировал, при этом стенки мелких сосудов значительно утолщались, что расценено как признак активизации репаративных процессов.

Аналогичная тенденция зарегистрирована в группе СК+GDNF. К 21-м суткам отмечено более активное формирование нейрональных связей, интенсивное ветвление отростков с образованием межклеточных спаек, а также редукция клеточного отека. Через 6 месяцев после трансплантации периваскулярный отек носил умеренный характер.

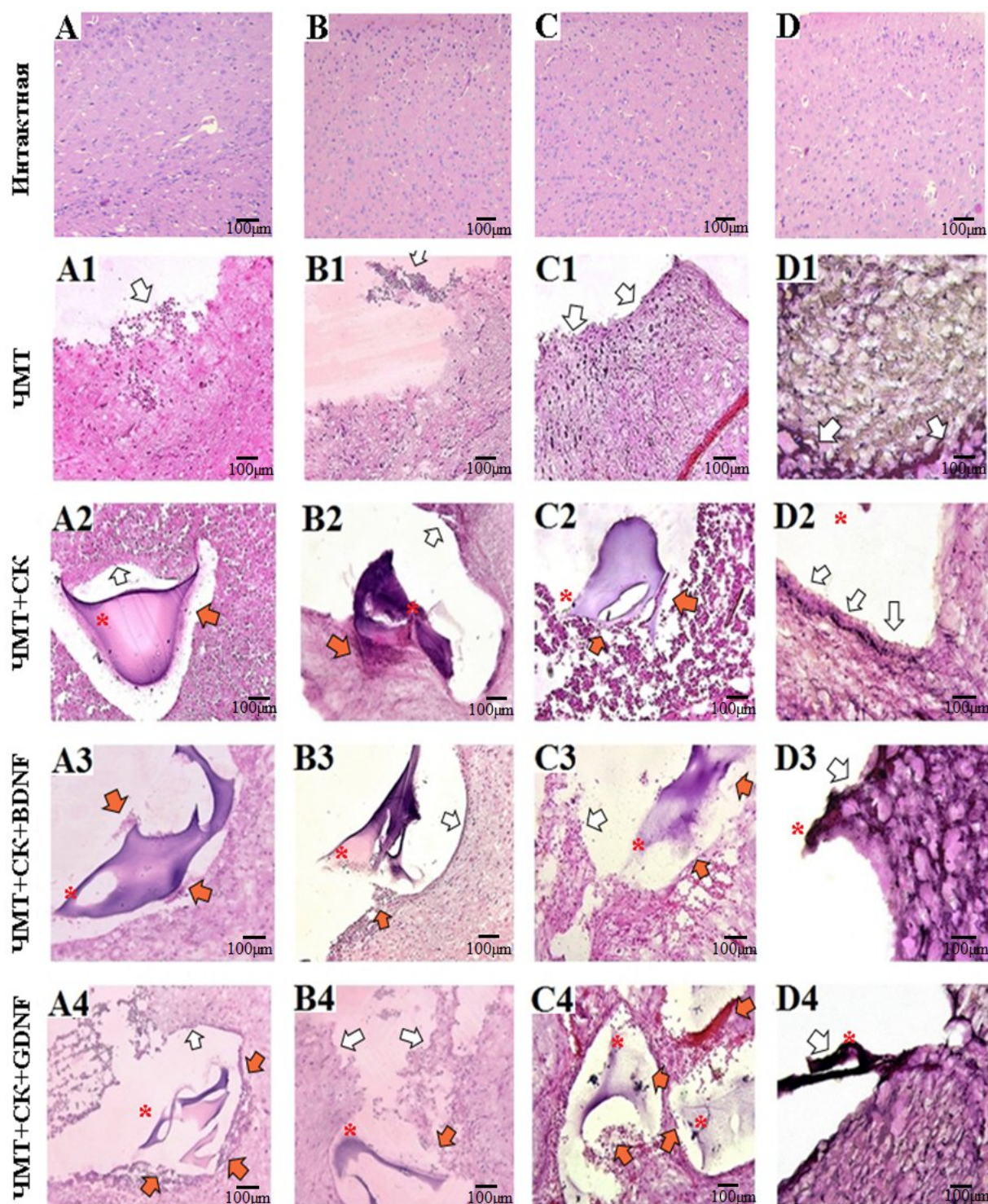


Рисунок 16. Репрезентативные гистологические образцы коры головного мозга мышей после черепно-мозговой травмы и трансплантации скаффолдов.

Окраска гематоксилин-эозином, увеличение x10. А-А4: 7 дней после трансплантации, В-В4: 21 день после трансплантации; С-С4: 2 месяца после трансплантации; D-D4: 6 месяцев после трансплантации. * - скаффолд, белые стрелки – некроз и признаки воспаления, оранжевые стрелки - указывают места разрастания нервной ткани по направлению к каркасу.

Таблица 3: Морфометрические показатели ткани головного мозга после трансплантации СК ($M \pm SEM$)

Тип измерения	d кл., μm		ПЦО, μm		ПВО, μm		Кол-во видоизм. кл.	
Временной интервал/ Группа	7 сутки	6 месяцев	7 сутки	6 месяцев	7 сутки	6 месяцев	7 сутки	6 месяцев
ЧМТ	11,5 $\pm$ 0,1	10,7 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,2	10,5 $\pm$ 0,4	9,4 $\pm$ 0,3
ЧМТ+СК	10,1 $\pm$ 0,3	9,9 $\pm$ 0,7	2,8 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,5	11,2 $\pm$ 1,1	8,2 $\pm$ 0,3
ЧМТ+СК+BDNF	10,4 $\pm$ 0,2	9,8 $\pm$ 0,2	3 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 0,3*	11,4 $\pm$ 0,8	6,4 $\pm$ 0,5
ЧМТ+СК+GDNF	10,5 $\pm$ 1,1	9,6 $\pm$ 0,6	3,2 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,2*	10,7 $\pm$ 0,3	4,7 $\pm$ 0,4*

d кл. – среднее значение диаметра клетки, ПЦО – среднее значения перичеселлюлярного отека, ПВО – среднее значение периваскулярного отека, кол-во видоизм.кл. - среднее количество некротических клеток. * - относительно группы интактная, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$)

Для отслеживания динамики морфологических изменений головного мозга мыши после черепно-мозговой травмы с последующей трансплантацией скаффолда в область повреждения на следующем этапе применяли магнитно-резонансную томографию (МРТ).

Исследование динамики выявило выраженные морфологические нарушения в тканях головного мозга мышей после ЧМТ (рис. 17). К 21-м суткам смещение тканей и интенсивная диффузия указывали на наличие некротических масс и выраженный отёк в очаге поражения. К шестому месяцу наблюдения на месте повреждения сформировался глиальный рубец; объём очага повреждения ткани составил в среднем 62,5 мм³.

На 21-е сутки после имплантации скаффолда МРТ-снимки показали активный контакт между конструкцией и нервной тканью. В дальнейшем скаффолд сместился вглубь нервной ткани; через 2 месяца после имплантации снимки с диффузией выявили слабый приток жидкости к месту имплантации. Через 6 месяцев положение каркаса не изменилось, однако поверхностные участки разрастания ткани образовали между собой соединительнотканый

мостик. Объём отёка тканей не отличался от показателей при черепно-мозговой травме и составил в среднем 67 мм³.

Положительная динамика наблюдалась у животных с скаффолдами, нагруженными нейротрофическими факторами.

Через 7 суток после имплантации в группе ЧМТ+СК+BDNF отмечались наименее выраженные признаки срастания ткани по сравнению с другими экспериментальными группами. На 21-е сутки после имплантации МРТ-снимки показали значительное уменьшение количества жидкости в области повреждения, а области мозга в очаге травмы сблизились в зоне имплантации. Через два месяца после имплантации скаффолд соединил всю нервную ткань и заполнил оставшуюся повреждённую область. Через 6 месяцев проявления травматического и постимплантационного повреждения были минимальны: на поверхности сенсомоторной коры определялись лишь локальные неровности контура, тогда как в глубоких слоях фрагменты каркаса визуализировались неотчетливо, без признаков воспалительной инфильтрации. Объём повреждённых тканей имел тенденцию к уменьшению относительно группы с черепно-мозговой травмой и составил в среднем 45,5 мм³ ($p < 0,05$, критерий Манна — Уитни).

На 21-е сутки после имплантации скаффолда, нагруженного GDNF, МРТ-снимки показали разрушение тканей и развитие диффузного притока крови в месте повреждения, что свидетельствовало о наличии воспалительных реакций. Однако через 2 месяца после моделирования черепно-мозговой травмы в группе ЧМТ+СК+GDNF было отмечено разрастание ткани и заполнение пустот в месте повреждения. Через 6 месяцев после имплантации скаффолда наблюдалось сращение тканей в повреждённой области. Отмечались слабая диффузия и разрастание на поверхности правого полушария, что указывало на активность репарационных процессов. Объём повреждения был значительно снижен по сравнению со значениями в группе ЧМТ и составил в среднем 40 мм³ ($p < 0,05$, критерий Манна — Уитни).

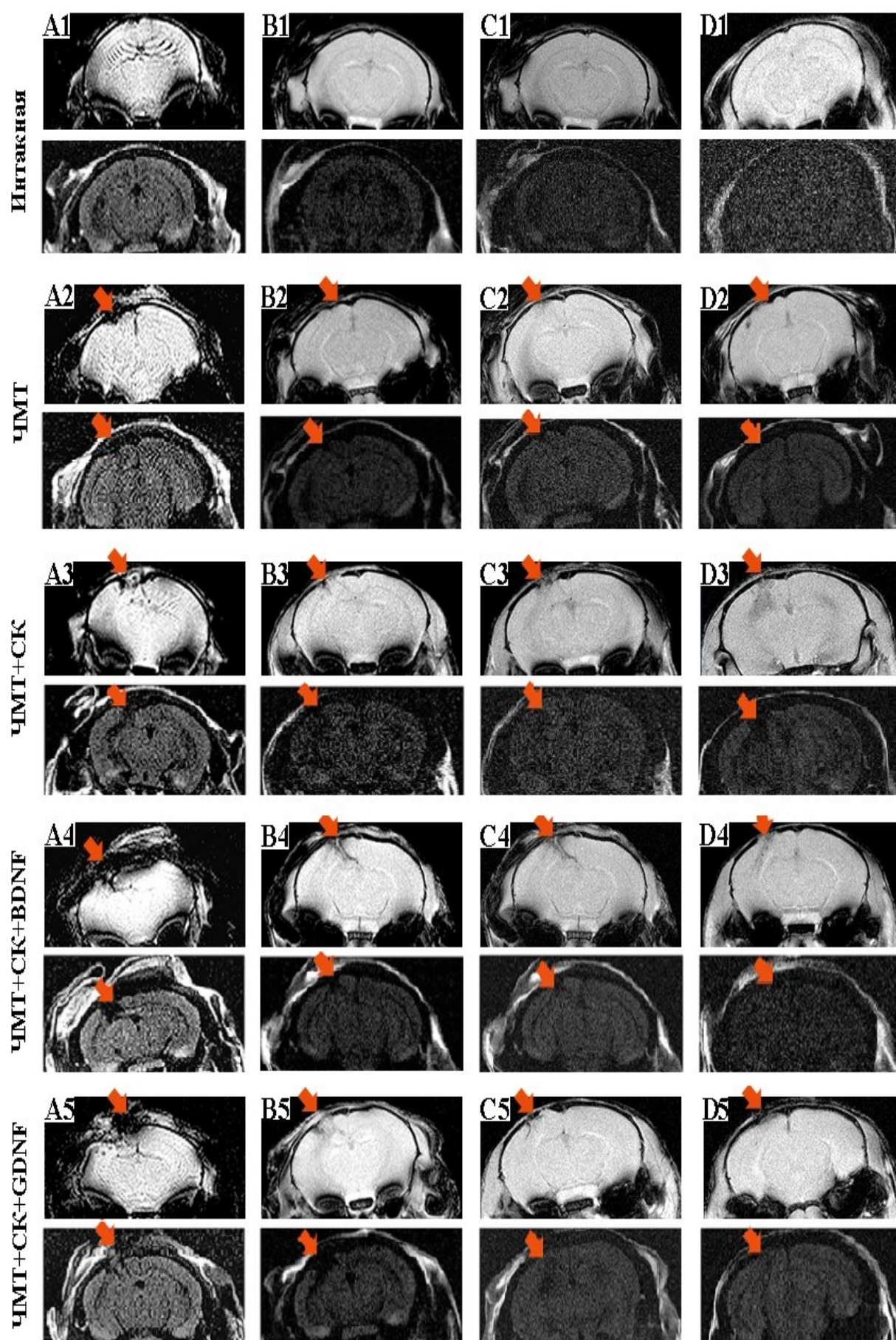


Рисунок 17. Репрезентативные МРТ-изображения: верхние снимки (MGEMS) и нижние симки (SEMS + diffusion) мозга мышей после моделирования

черепно-мозговой травмы и трансплантации каркасов. A1-A5: 7 дней после трансплантации, B1-B5: 21 день после трансплантации; C1-C5: 2 месяца после трансплантации; D1-D5: 6 месяцев после трансплантации. Оранжевая стрелка – место формирования ЧМТ и трансплантации СК

Таким образом, в экспериментальном исследовании была подтверждена биосовместимость скаффолдов на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты. Невысокие показатели неврологического дефицита, формирование спаек нервной ткани, низкие показатели некротических элементов и устойчивое формирование долговременной памяти показывают наибольшую эффективность скаффолдов с GDNF. В дальнейшем данные 3D каркасы, на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты могут применяться для морфологического и функционального восстановления нервной ткани после травмы и служить платформой для локальной транспортировки различных терапевтических агентов.

3.3. Оценка биосовместимости скаффолда с темозоломидом

На следующем этапе работы было необходимо изучить воздействие скаффолда с цитостатическим препаратом темозоломидом на нормальную нервную ткань головного мозга.

В состав скаффолдов был внесён цитостатический препарат темозоломид (ТМЗ) для оценки возможности применения данного подхода в терапии. Учитывая последние данные о токсичности ТМЗ для нормальных нервных клеток, в работе использовалась концентрация 1–2 мМ.

Неврологические и поведенческие тесты показали снижение активности животных после трансплантации каркаса с ТМЗ, что указывает на токсическое воздействие используемой концентрации препарата на нормальные нервные клетки (рис. 18).

На 7-е сутки после трансплантации параметры неврологического дефицита в группе с ТМЗ составили $6,3 \pm 0,57$. При оценке неврологического

статуса по шкале Гарсия использование скаффолдов снижает ноцицептивные проявления последствий хирургического вмешательства (1-е сутки после операции: СКЗ+ТМЗ — $14,6 \pm 0,33$; 7-е сутки после операции: СКЗ+ТМЗ — $13,0 \pm 0,57$).

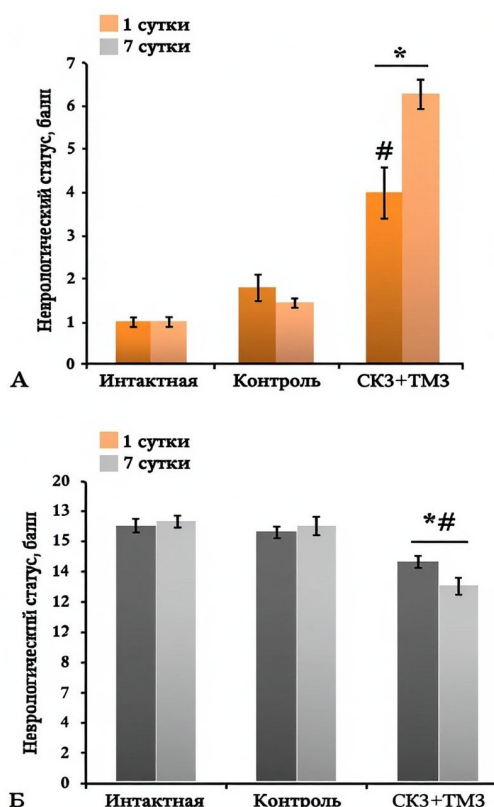


Рисунок 18. (А) Оценка неврологического дефицита и (Б) тест Гарсия, *-относительно группы интактной группы, #-относительно контроля, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни

При гистологическом анализе образцов ткани, прилежащей к имплантированному скаффолду с темозоломидом, выявлены выраженные структурные изменения (рис. 19). В перифокальной зоне регистрируется значительная доля клеток с морфологическими признаками дегенерации: у 10–12 % от общей клеточной популяции наблюдается высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение в сочетании с эксцентричным (периферическим) расположением ядра. Контурсы нервной ткани в области контакта с матриксом характеризуются неровными, фрагментированными

краями, а также визуализируются очаги некротических изменений, что в совокупности указывает на снижение клеточной жизнеспособности. На поверхности самого скаффолда адгезированы единичные клетки и малочисленные клеточные конгломераты. Присутствуют участки кровоизлияния. В ряде полей зрения отмечается периваскулярный отек ($3,4 \pm 0,2$ мкм).

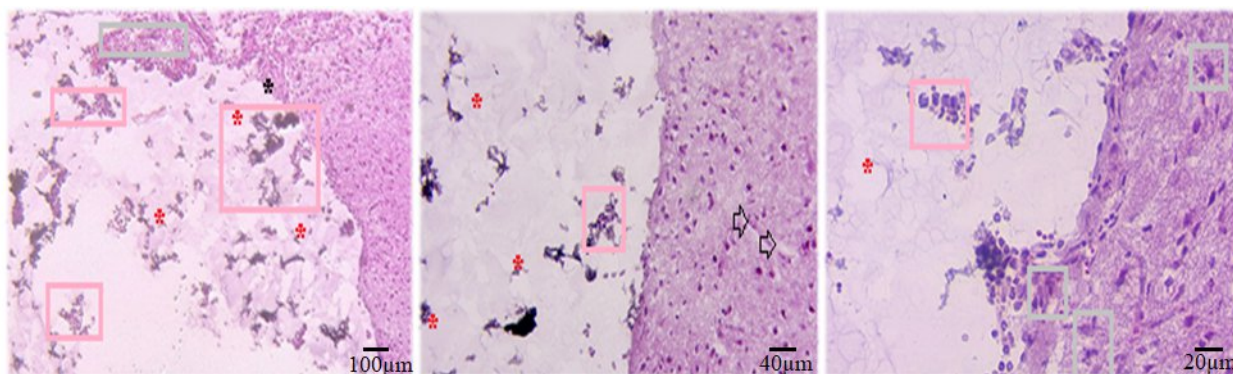


Рисунок 19. Репрезентативные гистологические образцы коры головного мозга мышей после трансплантации скаффолдов с темозоломидом. Окраска гематоксилин-эозином, ув. x10 x20 x40 соответственно. *- глиальный рубец, * - скаффолд, серый прямоугольник – скопление некротических клеток, розовый прямоугольник – скопление клеток на поверхности СК, стрелочка – периваскулярный отек

Патоморфологическая картина, характеризующаяся некротическими изменениями, снижением числа жизнеспособных клеток и активацией глиального ответа, свидетельствует о токсическом эффекте тестируемой концентрации ТМЗ в отношении нервной ткани. На основании результатов оценки тканевой совместимости на последующих этапах работы была проведена коррекция экспериментального протокола, а именно снижение содержания цитостатика в образцах скаффолда, с целью минимизации токсического воздействия на здоровые клетки микроокружения.

3.4. Оценка эффективности скаффолда с темозоломидом в модели ГЛИОМЫ

На следующем этапе исследования оценивали регенерационный и нейропротективный потенциал скаффолда, модифицированного темозоломидом, на фоне интракраниальной имплантации клеток линии глиомы GL261.

Динамическое наблюдение за неврологическим статусом (рис. 20) выявило прогрессирующее нарастание неврологической симптоматики во всех экспериментальных группах с опухолевым ростом. В группе изолированного введения клеток глиомы к 7-м суткам средний балл по шкале неврологического дефицита составил $8,4 \pm 1$, с последующим увеличением до 12 ± 1 к 14-м суткам, что соответствует тяжелой степени поражения и клинически проявлялось выраженным птозом, снижением проприоцептивной чувствительности и двигательной асимметрией.

К 14-м суткам в группах с применением скаффолда (СК) и скаффолда в комбинации с темозоломидом (СК+ТМЗ) также зафиксированы высокие показатели неврологического дефицита — $10,6 \pm 1,7$ и $11,3 \pm 2,4$ балла соответственно. Данные значения достоверно превышали показатели интактных животных ($p < 0,05$), что указывает на сохранение выраженных нарушений. В указанных группах отмечались снижение спонтанной двигательной активности и угнетение рефлексов задних конечностей, однако динамика нарастания симптомов была менее стремительной по сравнению с группой без терапии.

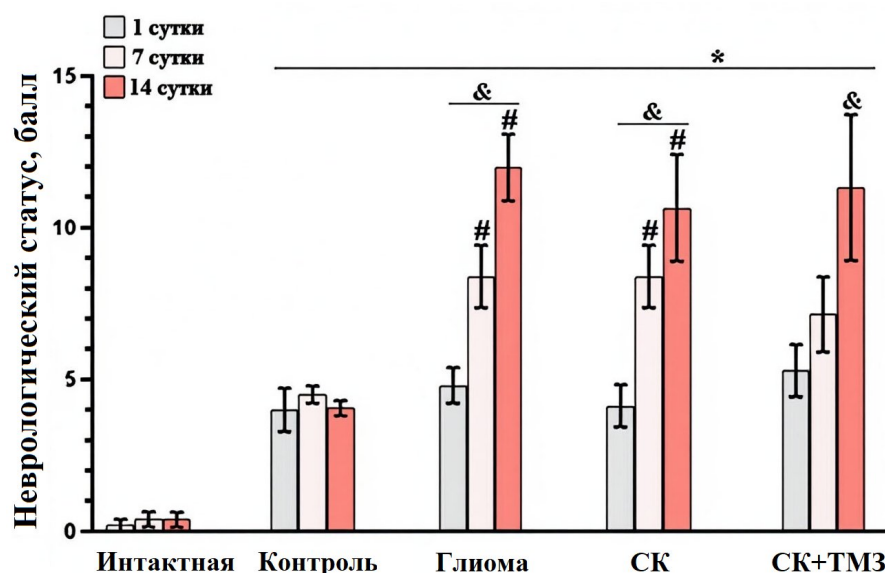


Рисунок 20. Оценка неврологического статуса у мышей после инокуляции клеток глиомы GL261 и имплантации скаффолдов. * – относительно группы интактная, # – относительно группы контроль, ^ – относительно группы глиома, $p < 0,05$, тест Манна-Уитни, и & - относительно первых суток после инокуляции, $p < 0,05$, t-тест Вилкоксона

На 14-е сутки после имплантации скаффолдов и инокуляции клеток глиомы GL261 проведено исследование двигательной и исследовательской активности мышей в тесте «Открытое поле» (табл. 4). В контрольной группе (интактные животные) регистрировалась преимущественно циркулярная локомоция без смены вектора движения, при этом значительную часть времени животные проводили в центральной зоне арены. Аналогичный паттерн поведения наблюдался в группе с изолированным введением скаффолда (СК).

Мыши в группе глиома проводили больше времени в центре арены и демонстрировали снижение ориентированно-исследовательской активности, характеризующееся значительным уменьшением количества вертикальных поз и заглядываний в отверстия арены; отсутствие актов груминга также указывало на эмоциональное напряжение у животных. Эти выраженные

изменения в поведенческих реакциях мышей коррелировали с развитием неврологического дефицита.

Низкая ориентировочно-исследовательская активность и эмоциональное напряжение наблюдались у мышей всех экспериментальных групп. Предпочтительная поведенческая стратегия мышей с имплантацией скаффолда заключалась в длительном нахождении в центре арены.

В группе с применением скаффолда, модифицированного темозоломидом (СК+ТМЗ), выявлено статистически значимое снижение двигательной активности относительно контрольных значений ($p < 0,05$), что подтверждалось меньшим числом пересеченных квадратов. Кроме того, у животных данной группы отмечалось достоверное угнетение эмоционально-ориентировочного поведения: частота актов заглядывания и обнюхивания отверстий была значимо ниже, чем в интактной группе ($p < 0,05$). В остальных группах достоверных изменений исследовательской активности не зафиксировано.

Экспериментальная группа	Горизонтальная активность		Время проведенное в центре арены (с)	Количество вертикальных глумингов	Время глуминга	Акты «Открытое поле» на 14-е сутки после имплантации скаффолда и глиомы (M±SEM)
	Периферия	Имплант				
Интактная	96,2±5,5	21±3,7	29,8±6,3	11,2±3	1±0,6	41,4±3,6
Контроль	109,6±8,9	16±2,6	26,6±5,9	11±3,5	2,3±2	24,6±3,5
Глиома	68,7±8,3	29±3,8	127,3±57,9*	2±0,9*^	0±0	10,7±4,2*
СК	72,3±5,2	17,3±4	80±35,2	2,3±1,8*^	4,6±3,7*	10,3±2,6*
СК+ТМЗ	51±5,7^	8±2,6#	142,3±79,3*	2,3±1,4*^	0,7±0,6	12±5,3*

* - относительно группы интактная, ^- относительно группы контроль, # - относительно группы глиома, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни

Влияние имплантации скаффолдов после инокуляции клеток глиомы на когнитивные функции и способность к обучению анализировали с помощью теста пассивного избегания (рис. 21). Во время тренировочной сессии мыши из интактной группы заходили в тёмную камеру и стремились покинуть ярко освещённое пространство, следуя рефлексу норки. Во время повторного тестирования латентное время движения к тёмной секции было значительно

увеличено, что свидетельствует о формировании следа памяти у мышей. Наиболее низкими показателями реконсолидации памяти обладала группа «глиома», что демонстрирует быстрый рост опухоли, сопровождающийся выраженными нарушениями когнитивных способностей. В группе с внесением клеток глиомы латентное время движения к тёмной секции во время тренировочной сессии не отличалось от латентного времени при повторном тестировании. Аналогичная картина изменений наблюдалась у мышей, имплантированных скаффолдами, содержащими ТМЗ. В группах «контроль» и СК+ТМЗ показано отсутствие статистически достоверного подтверждения прохождения теста условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) по длительности латентного периода во время повторного тестирования. При этом в группе со скаффолдом (СК) показатели обучения были схожи с интактными значениями. Внесение скаффолдов способствовало сохранению памяти животных: длительность латентного периода во время повторного тестирования с имплантацией скаффолда значительно увеличилась (в 5,7 раза) по сравнению с тренировочной сессией. Однако эти значения не отличались от значений интактной группы. Задержка моторной реакции и выбор безопасного участка камеры характеризуют нормальный процесс формирования памяти и обучения у мышей.

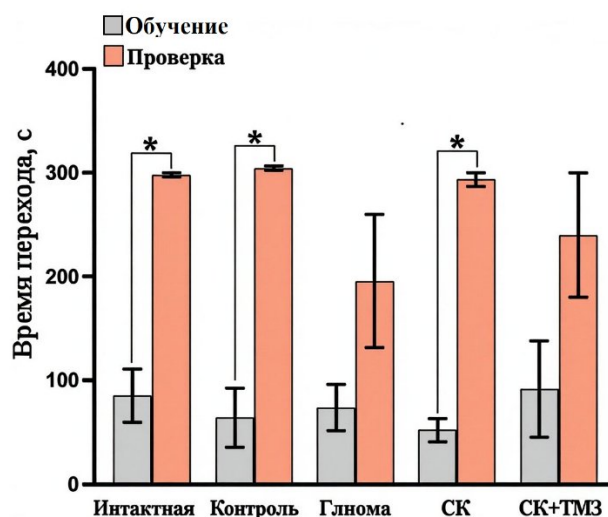


Рисунок 21. Оценка памятного следа у мышей после имплантации скаффолда и клеток глиомы в тесте УРПИ на 14-е сутки. Данные представлены как $M \pm SEM$. * - относительно проверки тестирования, $p < 0.05$, ANOVA

Гистологическое исследование выявило типичную морфологию коры головного мозга интактных животных (рис. 22. А). Были визуализированы нейроны правильной круглой или овальной формы с многочисленными отростками; ядра клеток имели вытянуто-овальную форму с четкими границами, занимая около половины общего объема клетки; цитоплазма клеток была однородной, без атипичных включений, структура сосудистой системы была без патологий. В группе контроль наблюдалось смещение ядерно-цитоплазматического соотношения в сторону увеличения объема ядра и разрывы ткани небольшого объема (3–4 случая в 10 полях зрения) вблизи места инъекции PBS. Имелись единичные очаги некроза, как правило, точечного характера (рис. 22. В).

Гистологический анализ на 14 сутки подтвердил значительные изменения морфологии коры головного мозга в группе контроль с инокуляцией клеток глиомы GL261 (рис. 22, табл. 5). Отмечается полная утрата структуры ткани головного мозга. Большой объем правого полушария (с частичным повреждением левого), занимает очаг неправильной формы с многочисленными разрывами и крупными сосудистыми переплетениями. Объем опухоли в среднем составлял $2,9-3,1 \text{ мм}^3$. Опухолевые клетки обладали крупными ядрами, зачастую вытянутые с небольшими изгибами. В глубоких слоях ткани головного мозга, а также в области инъекции опухолевых клеток визуализируются выраженные очаги некротических масс.

Аналогичная динамика изменений наблюдалась в группах, где были имплантированы скаффолды. Опухолевый очаг в группах со скаффолдом был смещен им в нижние слои головного мозга. Примечательно, что значительная часть (70%) исследованных образцов потеряла свою структуру. На поверхности коры головного мозга наблюдаются участки кровоизлияния.

Преобладает лизис клеток на границе с опухолевой тканью, который привел к образованию в месте повреждения неоплазмы. Этот процесс стимулировал образование очагов разрастания бластомы и ее преднекротических изменений. Объем опухоли в среднем составлял 2,4-2,5 мм^3 .

В группе с внесением темозоломида наблюдается слабая положительная динамика. На поверхности коры головного мозга можно отметить участки разрывов ткани. Инвазивный рост глиомы снижен. Обнаружены участки ангиогенеза, а также участки кровоизлияния. При этом, в группе наблюдается более четкий переход между опухолевыми клетками и паренхимой нервной ткани. Объем опухоли в среднем составлял 1,6-2 мм^3 ($p < 0.05$). Вблизи ложа опухоли наблюдались два-три слабо выраженных некротических участка. Сформировавшийся очаг после трансплантации меньше по объему и плотный по структуре, чем в предыдущих группах, что свидетельствует о преимуществе внесения скаффолдов с темозоломидом при моделировании глиомы *in vivo*.

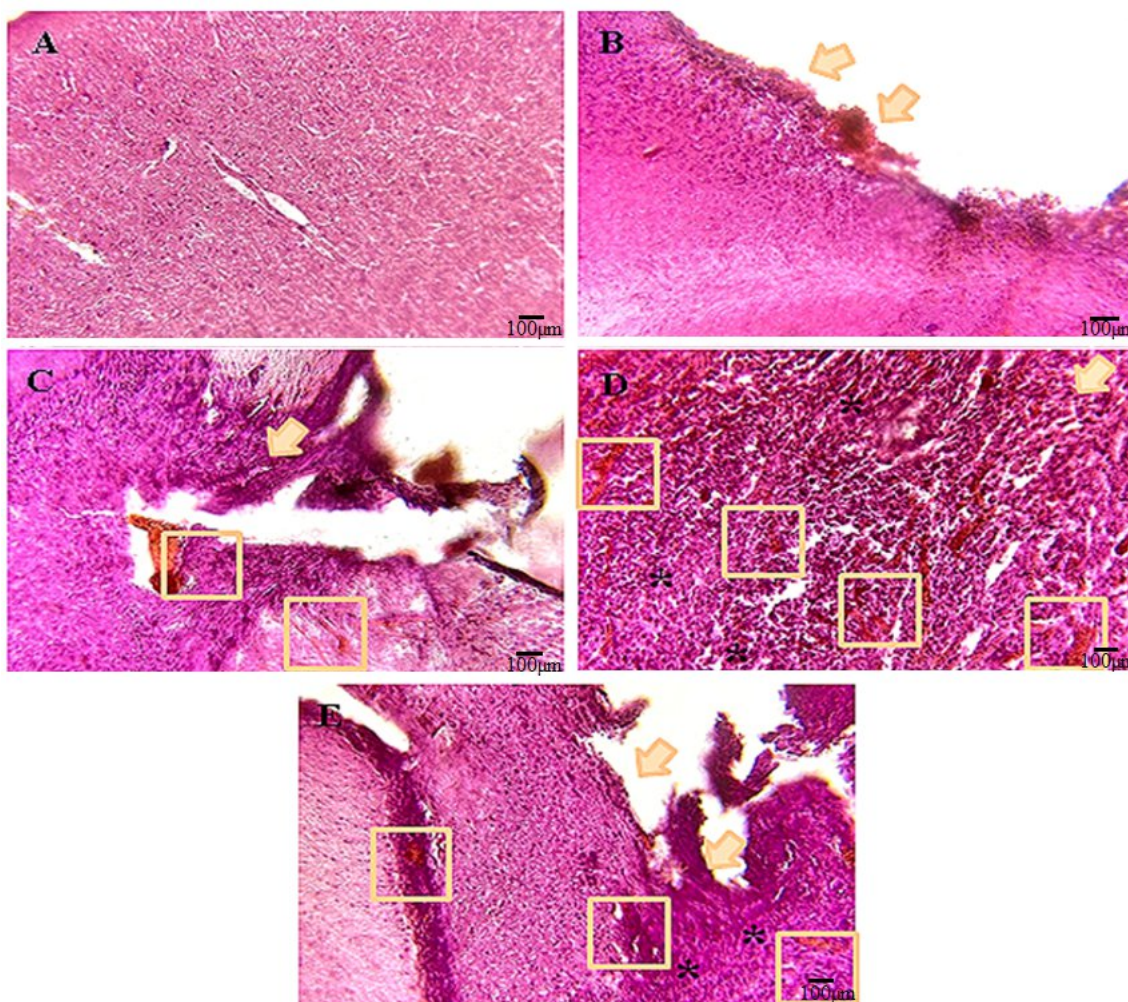


Рисунок 22. Репрезентативные гистологические образцы коры головного мозга мышей на 14-е сутки после инокуляции клеток глиомы GL261 и имплантации скаффолдов. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.х10 А- Интактная, В- Контроль, С-Глиома, D-СК, E-СК+ТМЗ. * - очаг опухоли, оранжевые стрелочки – глиальный рубец и некроз, оранжевые квадраты – участки кровоизлияния и разрастание кровеносных сосудов

Таблица 5: Морфометрические показатели ткани головного мозга после трансплантации СК (M±SEM)

Тип измерения /Группа	d кл., μm	ПЦО, μm	ПВО, μm	Кол-во видоизм. кл.
Интактная	9,1±0,3	1,2±0,4	1,3±0,2	4,1±0,3
Контроль	8,6±0,5	1,4±0,3	1,5±0,4	3,4±1
Глиома	10,2±0,4	3,4±0,1*	3,5±0,2*	11,2±2,1*#
СК	10,8±0,5	3,1±0,3	2,4±0,3	13,1±0,8*#
СК+ТМЗ	9,2±0,4	1,9±0,3	2,5±0,4	7,7±1,1*#

d кл. – среднее значение диаметра клетки, ПЦО – среднее значения перичеселлюлярного отека, ПВО – среднее значение периваскулярного отека, кол-во н.кл. - среднее количество видоизмененных клеток. * -относительно группы интактная, # - относительно группы контроль, критерий Манна-Уитни($p<0,05$)

Матрикс на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты продемонстрировали свою эффективность в качестве системы доставки терапевтического препарата при лечении глиомы. На примере агрессивной клеточной линии глиомы GL261 было установлено, что эти матриксы на основе гиалуроновой кислоты способны облегчать неврологические расстройства. После трансплантации скаффолды распадаются на отдельные сегменты, что способствует высвобождению препарата в окружающую ткань и одновременно позволяют снижать послеоперационное повреждение тканей головного мозга и снижать токсичность на организм. Кроме того, исследование показало, что применение темозоломида может замедлить развитие глиомы на экспериментальной модели GL261. Инвазивный рост опухоли в группах с применением скаффолда и цитотоксического препарата темозоломида был менее интенсивным по сравнению с другими экспериментальными группами. Эти результаты открывают многообещающие перспективы применения фотополимеризуемых биосовместимых каркасов в области нейроонкологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы методы тканевой инженерии значительно продвинулись. Выбор биоматериала крайне важен для восстановления функциональной активности ткани. Однако проблемы, такие как биосовместимость, иммуногенность, скорость биоразложения и токсичность, являются актуальными, несмотря на изготовление скаффолдов сопоставимых по своим материалам и структурам с поврежденной тканью.

В некоторых случаях для имплантатов предпочтительна медленная биodeградация, в то время как активная и быстрая биodeградация важна для стимуляции ремоделирования и замены поврежденного участка при восстановлении ткани (Liao et al., 2014).

Анализ различных полимерных конструкций показал, что сополимеризованные композитные каркасы на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты более эффективны, чем каркасы из одного полимера, поскольку они позволяют сополимерам компенсировать недостатки, которые может иметь один полимер (Edgar et al., 2016, Zhang, Yu, 2025).

В проведенном комплексном исследовании, чтобы исключить развитие цитотоксических эффектов и максимально приблизиться к естественному составу тканей мозга, за основу конструкции скаффолдов была взята гиалуроновая кислота. Гиалуроновая кислота, природный полимер, является основным компонентом внеклеточного матрикса головного мозга и выполняет широкий спектр функций и способствует поддержанию и гомеостазу ЦНС (Jensen et al., 2020).

Была показана высокая биосовместимость скаффолдов на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты. Подобный тип скаффолда предназначен для имплантации после повреждения головного мозга различного происхождения. Полученные результаты позволили показать регенеративный и терапевтический потенциал исследования нейротрансплантатов.

В исследовании сравнительный анализ влияния различных типов скаффолдов на морфофункциональные характеристики головного мозга при моделируемой черепно-мозговой травме показал, что скаффолды 1 типа продемонстрировали устойчивость к быстрой деградации и высокую биосовместимость с нервной тканью (наличие репаративных процессов, слабые воспалительные реакции и лизис тканей), при сохранении активности животных (снижен неврологический дефицит уже к 7 суткам после трансплантации).

Модифицированные трехмерные скаффолды – скаффолды 3 типа – были затем взяты за основу для разработки платформы для доставки биологически активных веществ в поврежденную область головного мозга.

Поведенческие и морфологические исследования показали, что разработанные скаффолды 3 типа могут быть нагружены терапевтическими агентами и биологически активными веществами, при этом высвобождение веществ регулируется путем модуляции морфологии и пористости самого скаффолда.

Имплантация скаффолдов, нагруженных нейротрофическими факторами, способствует усилению нейропротекторного и репаративного потенциала нервной ткани в условиях черепно-мозговой травмы (ЧМТ). Животные сохраняли способность к обучению и формированию долговременной памяти. Способность GDNF стимулировать функциональную активность клеток и репаративные процессы положительно сказалась на физиологическом состоянии мышей. Показано отсутствие выраженного неврологического дефицита и значительных изменений в двигательной и ориентировочно-исследовательской активности. Через 6 месяцев после трансплантации в группе с GDNF животные демонстрировали высокие показатели реконсолидации памяти в тесте водный лабиринт Морриса. BDNF способствует снижению неврологического дефицита у мышей в посттравматический период. Кроме того, применение скаффолдов, содержащих как GDNF, так и BDNF,

ассоциировано с редукцией отека, уменьшением формирования грубого рубцового дефекта, а также с сохранением гистологической архитектоники нервных клеток вблизи травматического очага.

Имплантация скаффолдов с темозоломидом, при модели опухоли головного мозга с применением клеток GL261, позволяет вводить низкие концентрации цитостатического препарата длительное время. Темозоломид является химиотерапевтическим препаратом первой линии для лечения высокозлокачественных глиом всех возрастных групп. Использование каркаса на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты для адресной доставки низких доз препарата позволяет смягчить неблагоприятное системное воздействие ТМЗ. Однако выбор оптимальной концентрации терапевтического агента в составе каркаса является перспективным направлением будущих исследований.

Имплантация скаффолдов, насыщенных темозоломидом, в условиях экспериментальной модели прогрессивного роста глиомы GL261 позволяет осуществлять пролонгированную локальную доставку цитостатического агента. Установлено, что применение данных конструкций сопровождается достоверным снижением перифокального повреждения нервной ткани в области, прилежащей к опухолевому очагу. При этом объем новообразования в группе с цитостатиком был в 1,5–2 раза ниже по сравнению с контрольными значениями, что свидетельствует о выраженном противоопухолевом эффекте. Полученные результаты позволяют рассматривать использование биосовместимых скаффолд-носителей в нейроонкологии как перспективную стратегию локальной химиотерапии злокачественных новообразований центральной нервной системы.

Контролируемое фотоиндуцированное сшивание гиалуроновой кислоты в будущем может позволить создавать скаффолды с программируемой скоростью биорезорбции и высвобождению биологически активных веществ. Подобные технологии позволяют создавать персонализированные скаффолды непосредственно в момент

удаления первичного очага опухоли. Применение таких биосовместимых скаффолдов в области нейроонкологии перспективно для лечения как хронических, так и острых форм онкологических образований.

В ходе экспериментального исследования *in vivo* показано, что изготовленные с помощью 3D-экструзионной печати скаффолды на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты биосовместимы с нервной тканью. Использование данных скаффолдов позволяет рассмотреть новый механизм морфологического и функционального восстановления нервной ткани после повреждения головного мозга различного происхождения. А также подобные скаффолды показали свою эффективность в качестве локальной системы доставки терапевтических агентов.

ВЫВОДЫ

1. Использование скаффолдов на основе метакрилизованной гиалуроновой кислоты с высоким содержанием рибофлавина обеспечивает длительное сохранение в перифокальной зоне очага повреждения пространственно-структурной организации ткани головного мозга в условиях экспериментальной модели открытой черепно-мозговой травмы - на 7-е сутки посттравматического периода зарегистрирована активная клеточная инвазия в структуру скаффолда, которая сопровождалась регрессом некротических и отежных явлений по сравнению с группой ЧМТ;

2. Скаффолды на основе метакрилизованной гиалуроновой кислоты с высоким содержанием рибофлавина, насыщенные нейротрофическими факторами BDNF и GDNF, способны инициировать и поддерживать репаративные процессы в поврежденном травмой мозге. Скаффолды, обогащенные GDNF, улучшают обучение и пространственную память в тесте лабиринт Морисса - животные данной группы демонстрировали активный целенаправленный поиск платформы, отрицательный поиск не регистрировался к 6 месяцу, а обогащенные BDNF снижают выраженность неврологического дефицита на 21 сутки посттрансплантационного периода – у животных отмечается чувствительность конечностей, повышение проприоцепции. У животных с скаффолдами насыщенными как BDNF, так и GDNF, зафиксировано достоверное повышение двигательной активности относительно группе ЧМТ ($p \leq 0,05$), что может свидетельствовать о повышенной эмоциональной реактивности на фоне применения факторов роста;

3. Использование биodeградируемого скаффолда в качестве платформы для локальной доставки темозоломида в условиях активного опухолевого роста экспериментальной модели глиомы GL261 обеспечивает замедление темпов опухолевой прогрессии - объем новообразования в группе с цитостатиком был в 1,5–2 раза ниже по сравнению с контрольными значениями и сохранение структурной целостности нервной ткани (лизис

ткани слабовыражен, наблюдаются участки ангиогенеза, зафиксирован четкий переход между паренхимой нервной ткани и новообразованием).

Список сокращений

ЧМТ – черепно-мозговая травма

ТГМ – травма головного мозга

ЦНС – центральная нервная система

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ПГА – полигликолевая кислота

ПБТ – полибутилентерефталат

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ОЧМТ – открытая черепно-мозговая травма

СК – скаффолд

ТР – трансплантация

ВЛМ – водный лабиринт Морриса

Окр – окрашивание

НФ – нейротрофические факторы

BDNF – (brain-derived) головного мозга

GDNF – (glial cell line-derived neurotrophic factor) нейротрофический фактор
глиальных клеток

AMPA – рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой
кислоты

УФ – ультрафиолет

LTP – долговременная потенция

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГК – гиалуроновая кислота

ТМЗ – темозоломид

ВИ – взвешенные изображения

MPT – магнитно-резонансная томография

MGEMS – разноградиентное многослойное эхо

SEMS+diffusion – многослойное спиновое эхо с диффузией

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Балябин А.В., Тихобразова О.П., Муравьёва М.С. и др. Применение биodeградируемого скаффолда на основе хитозана при терапии открытой травмы мозга в эксперименте // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 6
2. Белошицкий В.В. Принципы моделирования черепно-мозговой травмы в эксперименте // Украинский нейрохирургический журнал. 2008. № 4. с. 9 – 15
3. Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Митрошина Е.В., Астраханова Т.А., Шишкина Т.В., Мухина И.В., Антигипоксические и нейропротективные свойства нейротрофических факторов BDNF и GDNF при гипоксии *in vitro* и *in vivo*. 2014. Т.6, с. 36 – 47
4. Гайдар Б., Верховский А., Парфёнов В., Боевые повреждения позвоночника и спинного мозга // Вопросы нейрохирургии. 1997. № 2. с.44 – 46
5. Караваев А.С., Копысов С.П. Математическое моделирование ударного воздействия на голову при черепно – мозговых травмах // Российский журнал биомеханики. 2018. Т. 22, №2, с. 178 – 195
6. Капуле О., Галеева А., Сельская Б., Камилов Ф. Гиалуронан: свойства и биологическая роль // ЗАО «Косметологическая лечебница», Уфа. 2015
7. Лихтерман Л.Б. Черепно-мозговая травма // Диагностика и лечение. Москва: ГЭОТАР-Медиа. 2014. с. 488
8. Попова Н.К., Ильчибаева Т.В., Науменко В.С. Нейротрофические факторы (BDNF, GDNF) и серотонинергическая система мозга // Биохимия. 2017. Т. 82, с. 449 – 459
9. Радьков И.В., Лаптев В.В., Плехова Н.Г. Технологии моделирования диффузной черепно-мозговой травмы // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 4
10. Хабаров В.Н., Бойков П.Я., Селянин М.А. Гиалуроно́вая кислота. 2012; с. 132

11. Цымбалюк В.И., Кочин О.В., Экспериментальное моделирование черепно-мозговой травмы // Украинский нейрохирургический журнал. 2008. № 2. с. 10 – 12
12. Abatangelo G., Vindigni V., Avruscio G., Pandis L., Brun P. Hyaluronic acid: Redefining its role // Cells. 2020
13. Aerts H., Fias W., Caeyenberghs K., et al. Brain networks under attack: robustness properties and the impact of lesions // Journal Brain. 2016. с. 3063 – 3083
14. Adugna DG, Aragie H, Kibret AA, Belay DG. Therapeutic Application of Stem Cells in the Repair of Traumatic Brain Injury // Stem Cells Cloning. 2022. C. 15:53-61
15. Arora A, Somasundaram K. Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won? // Cancer Biol Ther. 2019. C. 1083-1090
16. Azouvi P., Arnould A., Dromer E., Vallat-Azouvi C. Neuropsychology of traumatic brain injury: an expert overview // Journal of Neurology in Paris. 2017. с. 461 - 472
17. Balyabin A.V., Tikhobrazova O.P., Muravyeva M.S. et al. Long-Term Neurological and Behavioral Results of Biodegradable Scaffold Implantation in Mice Brain // Neuroscience research. 2016. V. 8, №.4. с. 198 – 209.
18. Baethmann A., Eriskat J., Stoffel M., Chapuis D., Wirth A., Plesnila N. Special aspects of severe head injury: recent developments // *Current Opinion in Anaesthesiology*. 1998. с. 193 – 200
19. Bartolo P., Chua C., Almeida H., Chou S., Lim A. Biomanufacturing for tissue engineering: Present and future trends // Journal for *Virtual Phys Prototyp*. 2009. № 4. P. 203-216
20. Beni-Adani L., Gozes I., Cohen Y., Assaf Y., Steingart R., Brenneman D., Eizenberg O., Trembolver V., Shohami E. (2001) A peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) ameliorates injury response in closedhead injury in mice // The journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2001. с. 57 – 63

21. Berlin J., Leonard A., Pham T., Sano D., Marcano D., Yan S., Fiorentino S., Milas Z., Kosynkin D., Price B., et al. Effective drug delivery, *in vitro* and *in vivo*, by carbon-based nanovectors noncovalently loaded with unmodified Paclitaxel // *ACS Applied Nano Materials*. 2010. № 4. c. 621 – 636
22. Böttcher-Haberzeth S., Biedermann T., Reichmann E. Tissue Engineering of Skin // *Journal Burns*. 2010. № 36. c. 450 – 460
23. Caballero Aguilar LM, Silva SM, Moulton SE. Growth factor delivery: defining the next generation platforms for tissue engineering // *J Control Release*. 2019. C. 40–58
24. Cacialli P. Neurotrophins time point intervention after traumatic brain injury: From zebrafish to human // *Int. J. Mol. ScC*. 2021. 22 (4), 1585.
25. Carlson S., Saatman K. Central infusion of insulin-like growth factor-1 increases hippocampal neurogenesis and improves neurobehavioral function after traumatic brain injury // *Journal of Neurotrauma*. 2018. c. 1467 – 1480
26. Cintrón-Colón AF, Almeida-Alves G, Boynton AM, Spitsbergen JM. GDNF synthesis, signaling, and retrograde transport in motor neurons // *Cell Tissue Res*. 2020. C.47-56
27. Creeley C., Wozniak D., Philip V. et al. Multiple episodes of mild traumatic brain injury result in impaired cognitive performance in mice // *Academic Emergency Medicine*. 2004. V. 11. N 8. P. 809 – 819
28. Cook D. J., Nguyen C., Chun H. N., IL. L., Chiu A. S., Machnicki M. Hydrogel-delivered brain-derived neurotrophic factor promotes tissue repair and recovery after stroke // *J. Cereb. Blood Flow. Metab*. 2017. C. 37 (3), 1030–1045.
29. Cook A.M, Michas M, Robbins B. Update on Neuroprotection after Traumatic Brain Injury // *CNS Drugs*. 2025. C. 473-484
30. Corps K., Roth T., McGavern D. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury // *JAMA Neurology journal* .2015. c. 355 – 62
31. Chen J., Jin H., Zhang Y. MRS and diffusion tensor image in mild traumatic brain injuries // *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012. № 5. c. 67-70

32. Curran M.P. Hyaluronic acid: a review of its use in osteoarthritis of the knee // *Journal Drugs and Aging*. 2010. № 27. c. 925 – 941
33. Delgado Almandoz J., Kelly H., Schaefer P., et al. Prevalence of traumatic dural venous sinus thrombosis in high-risk acute blunt head trauma patients evaluated with multidetector CT venography // *Radiology*. 2010. c. 570 – 577
34. Dityatev A. E. Brain circuitry outside the synaptic cleft // *Phil. Trans. R. Soc.* 2014
35. Dewan M., Rattani A., Gupta S., Baticulon R., Hung Y., Punchak M., Agrawal A., Adeleye A., Shrimme M., Rubiano A., et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury // *Journal of Neurosurgery*. 2018. c. 1–18
36. Dey M., Ozbolat I.T. 3D Bioprinting of Cells, Tissues and Organs // *Nature Publishing Group; London, UK: 2020. C. 1–3*
37. Dixon K. Pathophysiology of traumatic brain injury // *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics*. 2017. c. 215-225
38. Edgar L., McNamara K., Wong T., Tamburrini R., Katari R., Orlando G., Tanase C. Heterogeneity of scaffold biomaterials in tissue engineering // *Journal of materials*. 2016. c. 332
39. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function // *Cell*. 2003. C. 257-69
40. Edgar L., Pu T., Porter B., Aziz J., La Pointe C., Asthana A., Orlando G. Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation // *J. Br. Surg.* 2020. C. 793–800
41. Fear N., Jones E., Groom M., et al. Symptoms of post-concussional syndrome are non-specifically related to mild traumatic brain injury in UK armed forces personnel on return from deployment in Iraq: an analysis of self-reported data // *Journal Psychological Medicine*. 2009. № 39. c. 1379-138
42. Finnie J. Animal models of traumatic brain injury: a review // *Australian Veterinary Journal*. 2001. V. 79. N 9. P. 628 – 633

43. Feldheim J, Kessler AF, Monoranu CM, Ernestus RI, Löhr M, Hagemann C. Changes of O⁶-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation in Glioblastoma Relapse-A Meta-Analysis Type Literature Review // *Cancers (Basel)*. 2019. C. 1837
44. Francisca SY Wong, Amy CY Lo. Collagen-Based Scaffolds for Cell Therapies in the Injured Brain // *Stem Cell Research & Therapy*. 2015. V. 5
45. Galgano M., Toshkezy G., Qiu X., Russell T., Chin L., Zhao L. Traumatic brain injury: current treatment strategies and future endeavors // *Journal SAGE*. 2017
46. Galler K., D'Souza R., Hartgerink J., Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering // *Advances in Dental Research*. 2011. № 23. c. 333 – 339
47. Garcia J.H. Early reperfusion as a rationale form of therapy in ischemic stroke // *Revista de Neurologia*. 1995. V. 23. № 123. P. 1067 – 1073
48. GustafssonD., KlangA., ThamsS., RostamiE. The role of BDNF in experimental and clinical traumatic brain injury // *Int. J. Mol. Sci*. 2021 C. 22 (7), 3582
49. Guo H, Zheng L, Xu H, Pang Q, Ren Z, Gao Y, Wang T. Neurobiological Links between Stress, Brain Injury, and Disease // *Oxid Med Cell Longev*. 2022
50. Griesbach G., Hovda D., Gomez-Pinilla F. Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation // *Journal Brain Research*. 2009. c. 105 – 15
51. Hackenberg K., Unterberg A. Traumatic brain injury // *Journal Nervenarzt in German*. 2016. c. 203-215
52. Hagg, T. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view // *Trends in Neurosciences*. 2005. № 28. c. 589 – 595
53. Hall E., Sullivan P., Gibson T., Pavel K., Thompson B., Scheff S. Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury // *Journal of Neurotrauma*. 2005. № 22. c. 252 – 265

54. Hannay H., Howieson D., Loring D., Fischer J., Lezak M. Neuropathology for neuropsychologists // Neuropsychological Assessment. Oxford University Press. 2004. c. 62-158
55. Hart T., Sherer M., Whyte J., Polansky M., Novack T. Awareness of behavioral, cognitive, and physical deficits in acute traumatic brain injury // Physical Medicine *and* Rehabilitation. 2004. c. 1450 – 1456
56. Hayani H., Song I., Dityatev A. Increased excitability and reduced excitatory synaptic input into fast-spiking CA2 interneurons after enzymatic attenuation of extracellular matrix // Front. Cell. Neurosci. 2018. C. 149
57. Herring S., Cantu R., Guskiewicz K., et al. Concussion (mild traumatic brain injury) and the team physician: a consensus statement // Medicine and Science in Sports and Exercise. 2011. c. 2412 – 2422
58. Holzapfel B., Rudert M., Hutmacher D. Scaffold-based bone tissue engineering // National Center for Biotechnology Information. 2017. № 46. c. 1 – 10
59. Iturrioz-Rodríguez N, Sampron N, Matheu A. Current advances in temozolomide encapsulation for the enhancement of glioblastoma treatment. Theranostics. 2023
60. Jacobs I., Redden R., Goldberg R., Hast M., Salowe R., Mauck R., Doolin E. Pediatric laryngotracheal reconstruction with tissue-engineered cartilage in a rabbit model // The *laryngoscope* journal. 2016
61. Jayaram MA, Phillips JJ. Role of the Microenvironment in Glioma Pathogenesis. Annu Rev Pathol // 2024 C.181-201
62. Jiasong G., Ka Kit G. L., Huanxing S., Qiuju Y., et al. Self-assembling peptide nanofiber scaffold promotes the reconstruction of acutely injured brain // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 5. 2009. c. 345 – 351
63. Jensen G., HollowayJ. L., StabenfeldtS. E. Hyaluronic acid biomaterials for central nervous system regenerative medicine // Cells. 2020. C.9, 2113
64. Kang H., Lee S., Ko I., Kengla C., Yoo J., Atala A. A 3D biprintings to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. Nature Biotechnology. 2016. № 34. c. 312 – 319

65. Kaplan GB, Vasterling JJ, Vedak PC. Brain-derived neurotrophic factor in traumatic brain injury, post-traumatic stress disorder, and their comorbid conditions: role in pathogenesis and treatment // *Behav Pharmacol*. 2010
66. Kaur P., Sharma S. Recent advances in pathophysiology of traumatic brain injury // *Current Neuropharmacology*. 2018. c. 1224-1238
67. Kilbourne M., Kuehn R., Tosun C., Caridi J., Keledjian K., Bochicchio G., Scalea T., Gerzanich V., Simard J. Novel model of frontal impact closed head injury in the rat // *Journal of neurotrauma*. 2009. № 26. c. 2233 – 2243
68. Kochanek P., Jackson T., Ferguson N., et al. Emerging therapies in traumatic brain injury // *Journal Seminars in Neurology*. 2015. c. 83 – 100
69. Krishna S, Choudhury A, Keough MB, Seo K, Ni L, Kakaizada S, Lee A, Aabedi A, Popova G, Lipkin B, Cao C, Nava Gonzales C, Sudharshan R, Egladyous A, Almeida N, Zhang Y, Molinaro AM, Venkatesh HS, Daniel AGS, Shamardani K, Hyer J, Chang EF, Findlay A, Phillips JJ, Nagarajan S, Raleigh DR, Brang D, Monje M, Hervey-Jumper SL. Glioblastoma remodelling of human neural circuits decreases survival // *Nature*. 2023 C.599-607
70. Langlois J., Rutland-Brown W., Wald M. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview // *Journal Head Trauma Rehabilitation*. 2006. № 21. c. 375–378
71. Lannsjö M., af Geijerstam J., Johansson U., et al. Prevalence and structure of symptoms at 3 months after mild traumatic brain injury in a national cohort // *Journal Brain Injury*. 2009. V. 23. c. 213 – 219
72. Lau T., Wang D. Bioresponsive hydrogel scaffolding systems for 3D constructions in tissue engineering and regenerative medicine // *Journal Nanomedicine*. 2013. V.8
73. Laurer H., Lenzlinger P., McIntosh T. Models of traumatic brain injury // *European Journal of Trauma*. 2000. № 3. P. 95 – 110

74. Laird NZ, Acri TM, Chakka JL, Quarterman JC, Malkawi WI, Elangovan S, Salem AK. Applications of nanotechnology in 3D printed tissue engineering scaffolds // *Eur J Pharm Biopharm.* 2021
75. Laird NZ, Acri TM, Chakka JL, Quarterman JC, Malkawi WI, Elangovan S, Salem AK. Applications of nanotechnology in 3D printed tissue engineering scaffolds // *Eur J Pharm Biopharm.* 2021
76. Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme // *Genes Dis.* 2016. C.198-210
77. Lee C., Singla A., Lee Y. Biomedical applications of collagen // *The International Journal of Pharmaceutics.* 2001. № 221. c. 1 – 22
78. Lee J., Spicer P. Hyaluronan: a multifunctional megaDalton, stealth molecule // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2000. C. 582–6.
79. Liao J., Shi K., Ding Q., Qu Y., Luo F., Qian Z. Recent developments in scaffold-guided cartilage tissue regeneration // *Journal of Biomedical Nanotechnology.* 2014. № 10. c. 85 – 104
80. Ling Y., Ramalingam M., Lv X., Zeng Y., Qiu Y., Si Y., Pedraz J.L., Kim H.-W., Hu J. Recent Advances in Nanomedicine Development for Traumatic Brain Injury // *Tissue Cell.* 2023. C. 82
81. Li H, Wu Y, Chen Y, Lv J, Qu C, Mei T, Zheng Y, Ye C, Li F, Ge S, Yao A, Jia L. Overcoming temozolomide resistance in glioma: recent advances and mechanistic insights // *Acta Neuropathol Commun.* 2025. C. 126
82. Lu D., Mahmood A., Qu C., Hong X., Kaplan D., Chopp M. Collagen Scaffolds Populated with Human Marrow Stromal Cells Reduce Lesion Volume and Improve Functional Outcome after Traumatic Brain Injury // *Journal Neurosurgery.* 2007. c. 596 – 603
83. Lutolf M.P. Materials science: cell environments programmed with light // *A Nature Research Journal.* 2012. P. 477 - 478
84. Maas A., Murray G., Henney H III. Efficacy and safety of dexamethasone in severe traumatic brain injury: results of a phase III randomised, placebo-controlled, clinical trial // *The Lancet Neurology.* 2006. c. 38 – 45

85. Mahmood T., Shastri V., van Blitterswijk C., Langer R., Riesle J. Evaluation of chondrogenesis within PEGT: PBT scaffolds with high PEG content. *Journal of biomedical materials research part A*. 2006. № 79. c. 216 – 222
86. Marcano D., Bitner B., Berlin J., Jarjour J., Lee J., Jacob A., Fabian R., Kent T., Tour J. Design of poly(ethylene glycol)-functionalized hydrophilic carbon clusters for targeted therapy of cerebrovascular dysfunction in mild traumatic brain injury // *Journal of Neurotrauma*. 2013. № 30. c. 789 – 796
87. Marklund N., Hillered L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? *The British Journal of Pharmacology*. 2011. c. 1207 – 1229
88. Marmarou A., Signoretti S., Fatouros P.P., Portella G., Aygok G.A., Bullock M.R. Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries // *Journal of Neurosurgery*. 2006. c. 720 – 730
89. Marshall L. Head injury: recent past, present, and future // *Journal of Neurosurgery*. 2000. № 47 c. 546 – 561
90. McGarry L., Thompson D., Millham F. Outcomes and costs of acute treatment of traumatic brain injury // *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2002. c. 1152 – 1159
91. Melchels F., Domingos M., Klein T., Malda J., Bartolo P., Huttmacher D. Additive manufacturing of tissues and organs // *Journal Progress in Polymer Science*. 2012. P. 1079 - 1104
92. Menon D., Schwab K., Wright D., Maas A. Position statement: definition of traumatic brain injury // *Physical Medicine and Rehabilitation*. 2010. c. 1637 – 1640
93. Miras-Portugal T., Gomez-Villafuertes R., Gualix J., Diaz-Hernandez J., Artalejo A., Ortega F., Delicado E., Perez-Sen R. Nucleotides in neuroregeneration and neuroprotection // *Journal Neuropharmacology*. 2002. V. 104. P. 243 – 254

94. Morris R. Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat // *Journal of neuroscience methods*. 1984. V. 11. P. 47 – 60
95. Mustafa A., Alshboul O. Pathophysiology of traumatic brain injury // *Journal Neurosciences*. 2013. c. 222 – 234
96. Mu X., Sahoo J.K., Cebe P., Kaplan D.L. Photo-crosslinked silk fibroin for 3D printing // *Polymers*. 2020. c. 2936
97. Nguyen K., West J. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications // *Journal of Biomaterials*. 2002. № 23. P. 4307 - 4314
98. Nguyen M., Alsberg E. Bioactive factor delivery strategies from engineered polymer hydrogels for therapeutic medicine // *Progress in Polymer Science*. 2014. № 39. P. 1235 - 1265
99. Nolan S. Traumatic brain injury // *Journal Critical care nursing quarterly*. 2005. №28. c. 188 – 194
100. Nortje J., Menon D. Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome // *Current Opinion in Neurology*. 2004. c. 711–718.
101. O'Brien F. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering // *Journal of Materials Today*. 2011. № 14. c. 88 – 95
102. O'Connor W., Smyth A., Gilchrist M. Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation // *Pharmacology and Therapeutics*. 2011. № 130. c. 106 – 113
103. Ostrom Q. T., Price M., Neff C., Cioffi G., Waite K. A., Kruchko C. , statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2015-2019 // *Neuro Oncol*. 2022. C. 24
104. Pandor A., Goodacre S., Harnan S., et al. Diagnostic management strategies for adults and children with minor head injury: a systematic review and an economic evaluation // *Journal Health Technology Assessment*. 2011. V.15. c.
105. Patterson J., Siew R., Herring S., Lin A., Guldberg R., Stayton P. Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration // *Journal of Biomaterials*. 2010. № 31. c. 772 – 781

106. Park CK, Kim JE, Kim JY, Song SW, Kim JW, Choi SH, Kim TM, Lee SH, Kim IH, Park SH. The Changes in MGMT Promoter Methylation Status in Initial and Recurrent Glioblastomas // *Transl Oncol.* 2012. C. 393-7
107. Pearn M., Niesman I., Egawa J, et al. Pathophysiology associated with traumatic brain injury: current treatments and potential novel therapeutics // *Cellular and Molecular Neurobiology.* 2016
108. Pereira R., Bartolo P., 3D photo-fabrication for tissue engineering and drug delivery // *Journal Engrineering.* 2015. V.1. P. 90 – 112
109. Poluri N, Carter J, Grasso J, Miller W, Leinbach M, Durant F, Benbrook R, John A, Wang A, Hu X. New Frontiers in 3D Printing Using Biocompatible Polymers // *Int J Mol Sci.* 2025 C. 8016
110. Prickaerts, J., Fahrig T., Blokland A. Cognitive performance and biochemical markers in septum hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis // *Behavioural Brain Research.* 1999. V. 102. P. 73 – 88
111. Puppi D., Chiellini F., Piras A., Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair // *Progress in Polymer Science.* 2010. P. 403 - 440
112. Richardson R., Singh A., Sun D., Fillmore H., Dietrich D., Bullock M., Stem cell biology in traumatic brain injury: effects of injury and strategies for repair: a review // *Journal of Neurosurgery.* 2010. c. 1125 – 1138
113. Reis C., Wang Y., Akyol O., Ho W., Applegate R., Stier G., Martin R., Zhang J. What's new in traumatic brain injury: update on tracking, monitoring and treatment // *International Journal of Molecular Sciences.* 2015. № 16. c. 903 – 965
114. Subbiah R, Guldberg RE. Materials science and design principles of growth factor delivery systems in tissue engineering and regenerative medicine // *Adv Healthc Mater.* 2019
115. Savelyev A. G., Bardakova K., Khaydukov E., Generalova A., Popov V., Chichkov B. Flavin mononucleotide photoinitiated cross-linking of hydrogels:

- Polymer concentration threshold of strengthening J. Photochem. Photobiol. A Chem. 2017. C. 341, 108–114
116. Savelyev A.G., Sochilina A.V., Akasov R.A., Mironov A.V., Semchishen V.A., Generalova A.N., Khaydukov E.V., Popov V.K. Extrusion-Based 3D Printing of Photocurable Hydrogels in Presence of Flavin Mononucleotide for Tissue Engineering // Biophotonics in regenerative medicine. 2018. C. 88
117. Sale A., Berardi N., Maffei L. Enrich the environment to empower the brain // Trends in Neurosciences. 2009. № 32. c. 233 – 239
118. Sandsmark D., Elliott J., Lim M. Sleep-wake disturbances after traumatic brain injury: Synthesis of human and animal studies // Sleep Research Society. 2017. c.40
119. Seeberger P., Carell T. Biopolymers // Current Opinion in Chemical Biology. 2003. № 7. c. 715 – 716
120. Shalumon K., Chen J. Scaffold-based drug delivery for cartilage tissue regeneration // Current Pharmaceutical Design. 2015. c. 79 – 90
121. Shapira Y., Shohami E., Sidi A. et al. Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties // Critical Care Medicine. 1988. V. 16. P. 258 – 265
122. Shin H., Quinten Ruhé P., Mikos A., Jansen J. *In vivo* bone and soft tissue response to injectable, biodegradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels // Journal of Biomaterials. 2003. № 24. 3201 – 3211
123. Smith M., Wilding K., Hunt J., Bennett A., Bundy B. The Emerging Age of Cell-Free Synthetic Biology // The Federation of European Biochemical Societies. 2014. c. 2755 – 2761
124. Smith-Seemiller L., Lovell M., Smith S., Markosian N., Townsend R. Impact of skull fracture on neuropsychological functioning following closed head injury // Brain Injury. 1997. c. 191–196.
125. Sokolov R., Krut' V., Belousov V., Rozov A., Mukhina IV. Hyaluronidase-induced matrix remodeling contributes to long-term synaptic changes. Front Neural Circuits. 2025

126. Stein D., Feather C., Napolitano L. Traumatic brain injury advance // Critical Care Clinics Journal. 2017. № 33. c. 1 – 13
127. Stocchetti N., Maas A. Traumatic intracranial hypertension // The New England Journal of Medicine. 2014. c. 2121 – 30
128. Spearman B. S., Agrawa N., Rubiano A., Simmons C. S., Mobini S., Schmidt C. E. Tunable methacrylated hyaluronic acid-based hydrogels as scaffolds for soft tissue engineering applications // J. Biomed. Mat. Res. 2020. C. 279–291
129. Später, T., Mariyanats, A. O., Syachina, M. A., Mironov, A. V., Savelyev, A. G., Sochilina, A. V. In vitro and in vivo analysis of adhesive, anti-inflammatory, and proangiogenic properties of novel 3D printed hyaluronic acid glycidyl methacrylate hydrogel scaffolds for tissue engineering // ACS Biomater. Sci. 2020. Eng. 6 (10), 5744–5757.
130. Tang Y., Noda Y., Hasegawa T., Nabeshima T. A concussive-like brain injury model in mice (II): Selective neuronal loss in the cortex and hippocampus // Journal of Neurotrauma. 1997a. V. 14. P. 863 – 873
131. Tang Y., Noda Y., Hasegawa T. et al. A concussive-like brain injury model in mice (I): impairment in learning and memory // Journal of Neurotrauma. 1997b. V. 14. P. 851 – 862
132. Taylor KR, Monje M. Invasive glioma cells: The malignant pioneers that follow the current // Cell. 2022 C. 2846-2848
133. Tavianatou A.G., Caon, I., Franchi, M., Piperigkou, Z., Galesso, D., Karamanos, N. Гиалуронан: молекулярные сигнальные и биологические функции, зависящие от размера, при воспалении и раке // FEBS J. 2019. C. 2883–2908
134. Taylor C., Bell J., Breiding M., et al. Traumatic brain injury related emergency department visits, hospitalizations and deaths // Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries. 2017. c. 1–16
135. Tajiri N., Kaneko Y., Shinozuka K., Ishikawa H., Yankee E., McGrogan M., Case C., Borlongan C. Stem cell recruitment of newly formed host cells via a

- successful seduction? filling the gap between neurogenic niche and injured brain site // Journal PLOS One. 2013
136. Teasdale G., Maas A., Lecky F., Manley G., Stocchetti N., Murray G. The Glasgow Coma Scale at 40 years: standing the test of time // The Lancet Neurology. 2014. c. 844 – 854
 137. Thompson H., Lifshitz J., Marklund N., Grady M., Graham D., Hovda D., McIntosh T. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation // Journal of Neurotrauma. 2005. № 22. c. 42 – 75
 138. Thurman D., Alverson C., Browne D., Dunn K., Guerrero J., Johnson R., Johnson V., Langlois J., Pilkey D., Snieszek J., Toal S. Traumatic brain injury in the united states: a report to congress // Centers for Disease Control and Prevention. 1999
 139. Unterberg A., Stover J., Kress B., Kiening K. Edema and brain trauma. Neuroscience // Journal of Neuroscience. 2004. c. 1021 – 1029
 140. Van Beek J., Mushkudiani N., Steyerberg E., et al. Prognostic value of admission laboratory parameters in traumatic brain injury: results from the impact study. Journal of Neurosurgery. 2007;24:315–328
 141. Varn FS, Johnson KC, Martinek J, Huse JT, Nasrallah MP, Wesseling P, Cooper LAD, Malta TM, Wade TE, Sabedot TS, Brat D, Gould PV, Wöhrer A, Aldape K, Ismail A, Sivajothi SK, Barthel FP, Kim H, Kocakavuk E, Ahmed N, White K, Datta I, Moon HE, Pollock S, Goldfarb C, Lee GH, Garofano L, Anderson KJ, Nehar-Belaid D, Barnholtz-Sloan JS, Bakas S, Byrne AT, D'Angelo F, Gan HK, Khasraw M, Migliozi S, Ormond DR, Paek SH, Van Meir EG, Walenkamp AME, Watts C, Weiss T, Weller M, Palucka K, Stead LF, Poisson LM, Noushmehr H, Iavarone A, Verhaak RGW; GLASS Consortium. Glioma progression is shaped by genetic evolution and microenvironment interactions // Cell. 2022. C. 2184-2199
 142. Venkataramani, V., Tanev, D.I., Strahle, C. Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression // Nature. 2019. C. 573, 532–538

143. Venkataramani V, Yang Y, Schubert MC. Glioblastoma hijacks neuronal mechanisms for brain invasion // *Cell* 2022. C. 185
144. Venkataramani V, Winkler F. Glioblastome nutzen neuronale Eigenschaften: Schlüssel zu neuen Therapien // *Nervenarzt*. 2024. C. 96-103
145. Wang Y, Kim U., Blasioli D., Kim H., Kaplan D. In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells // *Journal Biomaterials*. 2005. c. 7082– 7094
146. Wei R, Zhou J, Bui B, Liu X. Glioma actively orchestrate a self-advantageous extracellular matrix to promote recurrence and progression // *BMC Cancer*. 2024. C. 974
147. Werner J., Stevens R. Traumatic brain injury: recent advances in plasticity and regeneration // *Journal Current Opinion in Neurology*. 2015. № 28 c. 565 – 73
148. Wilberger J., Mao G. Traumatic brain injury (TBI) // *MSD reference*. 2019
149. Wang J, Tian L, Barr T, Jin L, Chen Y, Li Z, Wang G, Liu JC, Wang LS, Zhang J, Hsu D, Feng M, Caligiuri MA, Yu J. Enhanced treatment of breast cancer brain metastases with oncolytic virus expressing anti-CD47 antibody and temozolomide // *Mol Ther Oncol*. 2024
150. Xiong Y., Mahmood A., Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Journal Nature Reviews Neuroscience*. 2013. № 14. c. 128 – 142
151. Xiong Y., Mahmood A., Meng Y., Zhang Y., Zhang Z., Morris D., Chopp M. Neuroprotective and neurorestorative effects of thymosin β 4 treatment following experimental traumatic brain injury // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012. c. 51 – 58
152. Yu G., Mueller M., Hawkins B., Mathew B., Parsley M., Vergara L., Hellmich H., Prough D., DeWitt D. Traumatic Brain Injury *in Vivo* and *in Vitro* Contributes to Cerebral Vascular Dysfunction through Impaired Gap Junction Communication between Vascular Smooth Muscle Cells // *Journal of Neurotrauma*. 2014. № 31. c. 739 – 748

153. Zhang Y., Cai J., Shields L., Liu N., Xu X.-M., Shields C. Traumatic brain injury using mouse models // *Translational Stroke Research*. 2014. № 5. c. 454 – 471
154. Zhang Y, Yu W. Recent advances in bionic scaffolds for cartilage tissue engineering // *Front Bioeng Biotechnol*. 2025. c.13
155. Zhou R., Li Y., Cavanaugh J., Zhang L. Investigate the variations of the head and brain response in a rodent head impact acceleration model by finite element modeling // *Journal frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020. V.8. c. 172
156. Zimmerling A., Yazdanpanah Z., Cooper D.M., Johnston J.D., Chen X. 3D printing PCL/nHA bone scaffolds: Exploring the influence of material synthesis techniques // *Biomater. Res*. 2021
157. Zhang B, Zhang PB, Wang ZL, Lyu ZW, Wu H. Tissue-engineered composite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite nanoparticles seeded with autologous mesenchymal stem cells for bone regeneration // *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017. C. 963-976
158. Zhang Y, Wu XY, Yang ST, Huang HY, Jin CL, He BC. Polyacrylamide-hyaluronic acid hydrogel for local delivery of nerve growth factor enhances neuronal regeneration after brain tumor surgery // *Biomed Mater*. 2015