

# Разработка подходов для исследования биораспределения бицистронной терапевтической плазмидной конструкции в организме мыши

Джауари С. С.<sup>1</sup>, Карагяур М. Н.<sup>1,2</sup>, Балабаньян В. Ю.<sup>1,2</sup>, Скрябина М. Н.<sup>1</sup>, Примак А. Л.<sup>1</sup>, Стамбольский Д. В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – Факультет фундаментальной медицины, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

<sup>2</sup> – Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

<sup>3</sup> – Медицинский научно-образовательный центр, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

**Аннотация.** *Актуальность.* Применение генотерапевтических препаратов для лечения генетических заболеваний и стимуляции процессов регенерации является длительным и подразумевает осуществление повторных инъекций, что может привести к усилению диссеминации генотерапевтических конструкций из области введения и нежелательной эктопической экспрессии закодированных в них ростовых факторов. Существующие подходы по изучению фармакокинетики лекарственного препарата для оценки диссеминации генотерапевтического препарата из очага введения неприменимы. *Цель:* оценить пригодность метода ПЦР в реальном времени для изучения биораспределения перспективного генотерапевтического препарата в организме мыши при курсовом применении. *Методы.* Самцам мышей F1 CBA×C57/Black делали инъекции исследуемой плазмиды в денервированную большеберцовую мышцу после травмы нерва, а также через 4, 9 и 13 дней в дозировке 60 и 120 мкг/мышь. Через 7, 14 и 28 дней после окончания курса инъекций образцы органов и тканей изымали, тотальную ДНК выделяли, и содержание плазмидной ДНК оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. *Результаты.* Было показано, что изученная генетическая конструкция способна диссеминировать из области введения. Было установлено, что пик диссеминации для данной конструкции в органах и тканях мыши достигается через 14–28 суток после окончания курсового применения, при этом эктопической экспрессии факторов роста в них не наблюдается. *Заключение.* Предложенный метод является специфичным, высокочувствительным и линеен в широком диапазоне концентраций. Таким образом, он может быть рекомендован для изучения биораспределения потенциальных генотерапевтических препаратов в организме экспериментальных животных в рамках комплекса доклинических исследований.

**Ключевые слова:** генная терапия; плаزمид; диссеминация; ПЦР в реальном времени; мыши

## Для цитирования:

Джауари С. С., Карагяур М. Н., Балабаньян В. Ю., Скрябина М. Н., Примак А. Л., Стамбольский Д. В., Разработка подходов для исследования биораспределения бицистронной терапевтической плазмидной конструкции в организме мыши. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(2):46–57. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-46-57>

**Поступила:** 10 июня 2022 г. **Принята:** 12 июня 2022 г. **Опубликована:** 30 июня 2022 г.

## Development of approaches for studying the biodistribution of a bicistronic therapeutic plasmid construct in the mouse body

Dzhauari SS<sup>1</sup>, Karagyaur MN<sup>1,2</sup>, Balabanyan VYu<sup>1,2</sup>, Skryabina MN<sup>1</sup>, Primak AL<sup>1</sup>, Stambolsky DV<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> – Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> – Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**Abstract.** *Relevance.* The use of gene therapy drugs for the treatment of genetic diseases and stimulation of regeneration processes is lengthy and involves repeated injections, which may lead to increased dissemination of gene therapy constructs from the injection site and undesirable ectopic expression of growth factors encoded in them. Existing approaches to study the pharmacokinetics of a drug to assess the dissemination of a gene therapy drug from the site of administration are not applicable. *Objective:* to evaluate the suitability of the real-time PCR method for studying the biodistribution of a promising gene therapy drug in mice during a course of use. *Methods.* Male F1 CBA×C57/Black mice after nerve injury were injected with the test plasmid into the denervated tibial muscle after nerve injury, as well as after 4, 9 and 13 days at a dosage of 60 and 120 µg/mouse. After 7, 14, and 28 days, organ and tissue samples were removed, total DNA was isolated, and plasmid DNA content was assessed by real-time PCR. *Results.* We have shown that the studied genetic construct is able to disseminate from the injection site. We have found that the peak of dissemination for this construct in the organs and tissues of the mouse is reached 14–28 days after the end of the course application, while ectopic expression of growth factors is not observed in them. *Conclusion.* The proposed method is specific, highly sensitive, and linear over a wide range of concentrations. Thus, it can be recommended for studying the biodistribution of potential gene therapy drugs in the body of experimental animals as part of a preclinical studies complex.

**Keywords:** gene therapy; plasmid; dissemination; RealTime PCR; mice

## For citations:

Dzhauari SS, Karagyaur MN, Balabanyan VYu, Skryabina MN, Primak AL, Stambolsky DV. Development of approaches for studying the biodistribution of a bicistronic therapeutic plasmid construct in the mouse body. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(2): 46–57. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-46-57>

**Received:** June 10, 2022. **Accepted:** June 12, 2022. **Published:** June 30, 2022

## Введение / Introduction

Травматические повреждения периферических нервов являются одной из наиболее частых причин стойкой утраты трудоспособности [1, 2]. Для стимуляции регенерации повреждённых нервных волокон ранее нами была создана бицистронная плазмидная конструкция, содержащая кДНК нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) [3], которая получила название pNCure (plasmid for Nerve Cure). В связи с тем, что процесс прорастания нервных волокон от места повреждения к своим мишеням занимает от нескольких месяцев до года, и что время эффективной экспрессии векторных конструкций на основе плазмид ограничено несколькими неделями [4, 5], для стимуляции посттравматической реиннервации нами был выбран многократный режим введения. При дизайне исследования нами было учтено, что регенерация нерва у мыши происходит намного быстрее, чем у человека. В связи с этим мы выбрали четырёхкратный режим введения в двух экспериментальных дозах (сразу после повреждения, а также через 4, 9 и 13 дней после повреждения нерва по 60 или 120 мкг/мышь).

Разработка терапевтической векторной конструкции, кодирующей факторы стимулирующие регенерацию, подразумевает изучение её биобезопасности, в связи с рисками, ассоциированными с длительной и возможно эктопической экспрессией белков, стимулирующих нежелательную клеточную пролиферацию и миграцию [6, 7].

В рамках доклинического изучения биологической безопасности мы исследовали распределение генотерапевтического лекарственного кандидата при повторном внутримышечном введении.

## Материалы и методы / Materials and methods

Объектом исследования являлась субстанция, представляющая собой бесцветный прозрачный раствор плазмидной конструкции pNCure в изотоническом растворе натрия хлорида с концентрацией 2 мг/мл.

### *Животные*

Самцы мышей F1 CBA×C57/Black, 23–25 г, 26 голов: 24 для изучения биораспределения, 2 – для получения контрольных образцов органов и тканей. Животных содержали и использовали для экспериментальных процедур в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС и рекомендациями Комитета по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова.

### *Введение препарата*

При выборе доз для изучения способности генетической конструкции диссеминировать из места введения мы ориентировались на дозы, использованные и показавшие себя как терапевтически эффективные

при изучении специфической активности данной конструкции [3]. После повреждения общего малоберцового нерва (n. peroneus communis), а также через 4, 9 и 13 дней животным делали инъекции pNCure в денервированную большеберцовую мышцу в дозировке 60 или 120 мкг/животное.

### *Отбор и процессинг образцов органов и тканей*

Через 1, 2 и 4 недели после окончания курса внутримышечных инъекций мышцей подвергали эвтаназии по методу цервикальной дислокации. У животных забирали образцы крови (300–400 мкл), лёгких, печени, почек, селезёнки, сердца, головного мозга, и мышечной ткани как из места введения (передняя большеберцовая мышца на левой задней конечности) так и из контралатеральной конечности (передняя большеберцовая мышца на правой задней конечности).

Образцы органов и тканей лизировали при 56 °С в течение 18–24 часов (до полного растворения) в 200 мкл раствора, содержащего 50 мМ Tris (pH 8,0), 100 мМ ЭДТА, 0,5 % SDS и 0,7 мг протеиназы К на 1 мл раствора. Полученные лизаты разводили деионизованной водой в 10 раз и использовали в качестве матрицы для ПЦР в режиме реального времени из расчёта 1 мкл на 25 мкл реакционной смеси.

Образцам крови давали свернуться, позволяя сыворотке крови отделиться от тромба. Затем пробирки со свернувшейся кровью центрифугировали при 10000 g в течение 15 минут. Из отделившейся сыворотки крови ДНК выделяли фенол-хлороформным методом с последующим переосаждением изопропанолом и восстановлением деионизованной водой до исходного объёма сыворотки крови.

### *Оценка диссеминации плазмидной ДНК – принцип метода*

Оценку диссеминации плазмидной ДНК из места введения в органы и ткани оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. Для этого использовали приведённые в табл. 1 пары праймеров, специфичные к последовательности плазмидной конструкции и к геномной ДНК мыши. Амплификацию проводили с помощью набора qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген), согласно инструкции производителя (объём смеси 25 мкл), в CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

### *Валидация методики анализа содержания плазмидной и геномной ДНК в образцах сыворотки крови, образцов органов и тканей*

Валидация методики количественного определения бицистронной генетической конструкции в органах и тканях экспериментальных животных была выполнена по аналогии с опубликованными методиками определения остаточных количеств лекарственных веществ и их метаболитов в органах и тканях животных [8–13]. В рамках валидации была оценена линейность и специфичность предложенной методики, а также степень извлечения, пределы количественного и качественного определения бицистронной генетической конструкции.

Таблица 1

Праймеры использованные для амплификации плазмидной и геномной ДНК мыши в реакциях ПЦР в реальном времени

Table 1

Primers used for pNCure plasmid and murine genomic DNA amplification in Real Time-PCR

Пара праймеров / Pair of primers	Название праймера / Primer name	Последовательность праймера / Primer sequence	Расчётная температура плавления / Annealing temperature	Длина ампликона / Amplicon length
Детекция плазмидной ДНК / Plasmid DNA detection	pNCure-f	CATCACC AACTGGGACGACA	59 °C	180 п.о.
	pNCure-r	TAGCCACATACATGGCAGGC	59 °C	
Детекция геномной ДНК / Genomic DNA detection	Acta1-f	CAGTGCCGA ACTACCCAGT	60 °C	180 п.о.
	Acta1-r	CAGGGGAGTGATCTATGGTGG	60 °C	

Для построения калибровочных кривых проводили ПЦР в реальном времени с использованием в качестве матрицы растворов плазмиды pNCure в предварительно полученных экстрактах сыворотки крови и лизатов анализируемых органов и тканей с концентрациями 0,5 нг/мкл, 5 пг/мкл, 50 фг/мкл или 0,5 фг/мкл. 1 мкл полученного раствора добавляли в реакционную смесь для проведения ПЦР в реальном времени. Каждую серию анализов проводили в 3 независимых повторах. Для получения калибровочных графиков использовали логарифмическую интерполяцию  $-y = k \cdot \ln(x) + A$  зависимости порогового цикла ( $\Delta Ct$ ) от количества внесённой плазмидной ДНК. Полученные данные нормировали на уровень сигнала, полученного для геномной ДНК мыши (праймеры Acta1-f и Acta1-r) в соответствующих образцах.

Для оценки эффективности экстракции плазмидной ДНК из сыворотки крови мы вносили изучаемую плазмиду pNCure в количестве 0,5 нг/мкл, 5 пг/мкл, 50 фг/мкл, 0,5 фг/мкл в образцы сыворотки крови объёмом 200 мкл. После этого проводили экстракцию, согласно описанному выше протоколу, с восстановлением объёма деионизованной водой до 200 мкл. Полученные экстракты анализировали с помощью ПЦР в реальном времени, нормировали полученные данные на уровень сигнала для геномной ДНК мыши и сравнивали с результатами калибровки плазмидной ДНК в сыворотке крови. Поскольку экстракции ДНК из образцов органов и тканей мышей не проводилось (лишь лизис и разбавление лизатов в 10 раз), то и эффективность экстракции плазмидной ДНК из образцов органов и тканей не оценивали.

*Определение количества плазмидной ДНК в образцах органов и тканей*

На основании полученных калибровочных графиков плазмидной ДНК в образцах крови, органов и тканей мышей определяли количество плазмидной ДНК в экспериментальных образцах органов и тканей с помощью уравнения:

$$P = e^{((\Delta Ct - A)/k)},$$

где: P – искомое количество плазмидной ДНК в экспериментальном образце;

$\Delta Ct$  – значение порогового цикла для соответствующего образца;

A и k – коэффициенты из уравнения  $-y = k \cdot \ln(x) + A$ , описывающего калибровочную кривую.

*Определение пределов чувствительности (LOD) и количественного определения (LOQ) ПЦР-метода детекции плазмидной ДНК*

Для определения пределов детектирования (Limit of Detection, LOD) и пределов количественного определения (Limit of Quantification, LOQ) плазмидной ДНК использовали данные измерений, полученные в ходе валидации методики при анализе «холостых» проб лизатов и экстрактов, не содержащих плазмидную ДНК. LOD оценивается как количество плазмидной ДНК в реакционной смеси, соответствующее утроенному среднему значению  $\Delta Ct$  (в трёх повторах), полученному при анализе «холостых» проб лизатов или экстрактов, а LOQ – количество плазмидной ДНК, соответствующее десяти средним значениям  $\Delta Ct$ , полученных при анализе «холостых» проб (в трёх повторах). Формулы для вычисления LOD и LOQ приведены ниже:

$$LOD = 3 \cdot e^{((\Delta Ct - A)/k)}$$

$$LOQ = 10 \cdot e^{((\Delta Ct - A)/k)},$$

где: LOD – предел детектирования;

LOQ – предел количественного определения;

$\Delta Ct$  – значение порогового цикла для соответствующего образца;

A и k – коэффициенты из уравнения  $-y = k \cdot \ln(x) + A$ , описывающего калибровочную кривую.

*Имуноферментный анализ гомогенатов органов и тканей мыши на содержание BDNF*

Возможную эктопическую экспрессию факторов роста оценивали по уровню основного белка, закодированного в плазмиде pNCure – BDNF. Для этого использовали набор для иммуноферментного анализа Human Free BDNF Immunoassay (R&D, #DBD00). Анализ проводили в гомогенатах отдельных образцов органов и тканей с наибольшим содержанием плазмидной ДНК, согласно инструкции производителя.

**Результаты / Results**

*Валидация методики ПЦР-детекции плазмидной ДНК в органах и тканях мыши*

Результаты калибровки плазмиды pNCure в экстрактах сыворотки крови и лизатах лёгких приведены в табл. 2, 3 и на рис. 1, 2. Результаты калибровки в лизатах других органов и тканей приведены в разделе Дополнительные материалы (табл. Д1–Д6, рис. Д1–Д6) и в табл. 5. В эксперименте также анализировали образцы, содержащие плазмидную ДНК в количестве 5 аттограмм/мкл, однако полученные для них параметры ΔCt оказались ниже предела чувствительности метода и потому не отражены в таблицах и на рисунках.

Таблица 2

**Калибровка плазмиды pNCure в экстракте сыворотки крови**

Table 2

**Calibration of pNCure plasmid in serum extract**

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,73	11,03	11,49	11,08 ± 0,38
5.0E-03	17,33	17,25	18,46	17,68 ± 0,68
5.0E-05	25,12	24,62	24,85	24,86 ± 0,25
5.0E-07	29,24	30,1	29,09	29,48 ± 0,55

Таблица 3

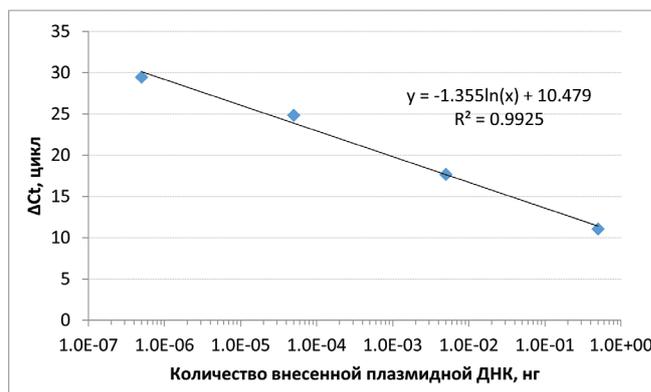
**Калибровка плазмиды pNCure в лизатах лёгких**

Table 3

**Calibration of pNCure plasmid in lung lysat**

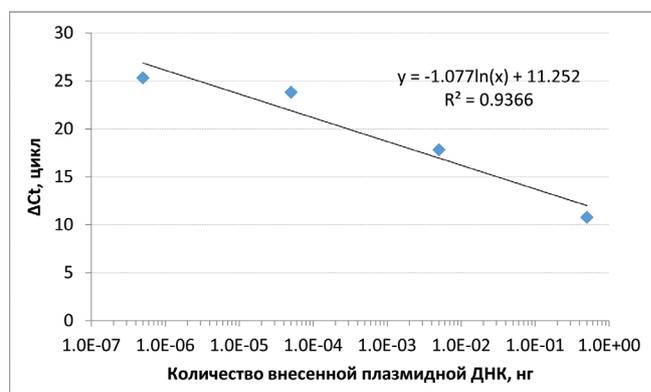
Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,79	10,75	10,81	10,78 ± 0,03
5.0E-03	17,89	17,97	17,62	17,83 ± 0,18
5.0E-05	24,24	23,39	23,82	23,82 ± 0,43
5.0E-07	25,15	25,38	25,41	25,31 ± 0,14

Полученные результаты подтверждают линейность методики определения бицистронной генетической конструкции в широком спектре органов и тканей (биологических матриц) экспериментальных животных в диапазоне концентраций 0,5 фг/мкл – 0,5 нг/мкл. Эффективность экстракции плазмиды pNCure из об-



**Рис. 1.** Калибровка плазмиды pNCure в экстракте сыворотки крови

**Fig. 1.** Calibration curve for pNCure plasmid in serum extract



**Рис. 2.** Калибровка плазмиды pNCure в лизатах лёгких

разцов сыворотки крови составляет более 75 %, что подтверждает пригодность данного метода анализа для обнаружения плазмидной ДНК в образцах сыворотки крови мыши (табл. 4 и рис. 3).

Уравнения, калибровочные коэффициенты и показатели линейности, полученные в ходе валидации ПЦР-метода детекции плазмидной ДНК, отражены в табл. 5. Показатели пределов чувствительности (LOD) и количественного определения (LOQ) метода приведены в табл. 6.

*Изучение диссеминации плазмидной ДНК из места введения*

Результаты валидации позволили установить закономерности между содержанием плазмидной ДНК в образцах органов и тканей и показателями ПЦР в реальном времени, а также установить параметры чувствительности метода ПЦР-детекции плазмидной ДНК. Валидированная методика позволила оценить содержание искомой плазмидной ДНК в сыворотке крови, а также образцах органов и тканей экспериментальных животных. Результаты диссеминации плазмидной ДНК из области инъекции спустя 7, 14

Таблица 4

Оценка эффективности экстракции плазмиды pNCure из образца сыворотки крови

Table 4

Estimating the efficacy of pNCure plasmid extraction from serum blood sample

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	Параметр / Parameter	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	ΔCt, цикл	11,83	11,5	11,39	11,57 ± 0,23
	Ст.экстр., %	62,5	79	84,5	75,33 ± 11,45
5.0E-03	ΔCt, цикл	17,77	18,25	18,41	18,14 ± 0,33
	Ст.экстр., %	95,5	71,5	63,5	76,83 ± 16,65
5.0E-05	ΔCt, цикл	25,06	24,85	25,42	25,11 ± 0,29
	Ст.экстр., %	90	100,5	72	87,5 ± 14,41
5.0E-07	ΔCt, цикл	30,2	30,04	29,64	29,96 ± 0,29
	Ст.экстр., %	64	72	92	76 ± 14,42

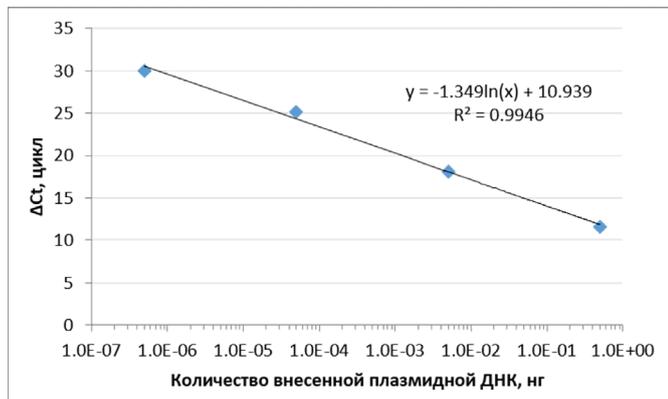


Рис. 3. Калибровка плазмиды pNCure в сыворотке крови (с последующей экстракцией)

Fig. 3. Calibration curve for pNCure plasmid in serum after extraction

и 28 дней после окончания курсового введения биотронной конструкции pNCure приведены в табл. 7 и 8.

Из полученных результатов видно, что в большинстве образцов плазмидная ДНК отсутствует или находится ниже предела количественного определения. В некоторых образцах были обнаружены следовые количества плазмидной ДНК. Поскольку генетиче-

Таблица 5

Уравнения, калибровочные коэффициенты и показатели линейности (R<sup>2</sup>), полученные в результате валидации ПЦР-метода детекции плазмидной ДНК в органах и тканях мыши

Table 5

Equations, calibration coefficients and linearity indices (R<sup>2</sup>) obtained as a result of the validation of the PCR method for the detection of plasmid DNA in organs and tissues of mice

Орган / ткань / organ/tissue	Уравнение калибровки / Equation	k	A	R <sup>2</sup>
Лёгкие / lungs	y=-1,08ln(x)+11,25	-1,08	11,25	0,9366
Почки / kidneys	y=-1,33ln(x)+10,24	-1,33	10,24	0,9923
Мозг / brain	y=-1,34ln(x)+10,2	-1,34	10,20	0,9944
Печень / liver	y=-1,30ln(x)+10,33	-1,30	10,33	0,975
Сердце / heart	y=-1,19ln(x)+10,79	-1,19	10,79	0,9697
Селезёнка / spleen	y=-1,13ln(x)+10,94	-1,13	10,94	0,9453
Мышцы / muscle	y=-1,20ln(x)+ 11,40	-1,20	11,40	0,9479
Сыворотка крови / serum	y=-1,35ln(x)+10,94	-1,35	10,94	0,9946

ская конструкция кодирует факторы роста BDNF и uPA, необходимо было выяснить способны ли обнаруженные количества плазмидной ДНК приводить к эктопической экспрессии данных белков. Для этого в гомогенатах отдельных образцов органов и тканей с наибольшим содержанием плазмидной ДНК исследовали содержание основного рекомбинантного белка, закодированного в данной генетической конструкции – мозгового нейротрофического фактора человека BDNF.

Результаты исследования содержания рекомбинантного BDNF в органах и тканях мышей с наибольшим содержанием плазмидной ДНК не показали повышения уровня его экспрессии. Содержание BDNF выше предела чувствительности метода было установлено лишь в образце большеберцовой мышцы, в которую непосредственно делали инъекции генетической конструкции pNCure (табл. 9).

## Обсуждение / Discussion

Процессы восстановления повреждённой ткани требуют продолжительной экспрессии факторов, стимулирующих процессы регенерации. Поскольку продукция эндогенных прорегенераторных белков в области повреждения зачастую недостаточна и кратковременна, это ограничивает врождённый регенераторный потенциал органов и тканей человека. Одним из перспективных подходов для поддержания уровня таких факторов является генная терапия конструкциями, несущими гены таких факторов. Причём,

Таблица 6

Пределы чувствительности (LOD) и количественного определения (LOQ) ПЦР-метода детекции плазмидной ДНК

Table 6

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the PCR method for the detection of plasmid DNA

Показатель	Лёгкие / lungs	Почка / kidneys	Мозг / brain	Печень / liver	Сердце / heart	Селезёнка / spleen	Интактная мышца / intact muscle	Мышца / muscle	Сыворотка крови / serum
Средняя ΔCt, цикл / Mean ΔCt, cycle	24,67	26,06	24,19	26,18	24,82	24,84	25,66	24,17	30,28
LOD, нг	1,1E-03	2,1E-04	8,1E-04	1,4E-04	2,1E-04	1,4E-04	2,1E-04	7,2E-04	1,3E-05
LOQ, нг	3,7E-03	6,8E-04	2,7E-03	4,6E-04	6,9E-04	4,6E-04	6,9E-04	2,4E-03	4,2E-05

Таблица 7

Количество плазмидной ДНК pNCure в исходных образцах сыворотки крови, образцах органов и тканей, млн. копий на 1 г (мл) органа и ткани

Table 7

The amount of pNCure plasmid DNA in serum samples, organ and tissue samples in millions of copies per 1g(ml) of organ or tissue

Дни после окончания инъекции / Days after the injection course	Мышь № / Mouse ID	Количество плазмидной ДНК pNCure в исходных образцах сыворотки крови, образцах органов и тканей, млн. копий на 1 г (мл) органа и ткани / The amount of pNCure plasmid DNA in serum samples, organ and tissue samples in mln of copies per 1g (ml) of organ or tissue								
		Лёгкие / Lungs	Почки / Kidneys	Мозг / Brain	Печень / Liver	Сердце / Heart	Селезёнка / Spleen	Интактная мышца / Intact muscle	Иъекционная мышца / Muscle	Плазма крови / Serum
	–К	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7-й	pNCure_1 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3177,9	<LOQ
	pNCure_1 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2164,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_1 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1342,6	<LOQ	<LOQ	12457,3	<LOQ
	pNCure_1 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	20574,5	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	8111,4	<LOQ
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	32827,9	<LOQ
	pNCure_2 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	25118,8	<LOQ
14-й	pNCure_1 #1	7612,6	7047,1	<LOQ	1785,5	<LOQ	<LOQ	2811,9	5275,0	9,5
	pNCure_1 #2	<LOQ	2991,6	<LOQ	835,3	3063,3	<LOQ	2186,5	4417,9	9,4
	pNCure_1 #3	<LOQ	1705,6	<LOQ	2599,1	1311,5	<LOQ	<LOQ	9381,2	3,2
	pNCure_1 #4	<LOQ	2545,1	<LOQ	5715,2	1575,9	932,8	<LOQ	15152,8	1,4
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	4885,2	1,7
	pNCure_2 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	8482,1	1,1
28-й	pNCure_1 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,8
	pNCure_1 #2	<LOQ	1775,6	4540,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,3
	pNCure_1 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,4
	pNCure_1 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	13593,8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	14612,7	0,8
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1827,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #4	<LOQ	2279,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	948,4	<LOQ	<LOQ	0,8

Таблица 8

Количество плазмидной ДНК pNCure в исходных образцах сыворотки крови (нг/мл), а также образцах органов и тканей (нг/г)

Table 8

The amount of pNCure plasmid DNA in serum samples (ng/ml), organ and tissue samples (ng/g)

Дни после окончания инъекции / Days after the injection course	Мышь № / Mouse id	Количество плазмидной ДНК pNCure в исходных образцах сыворотки крови (нг/мл), образцах органов и тканей (нг/г) / The amount of pNCure plasmid DNA in serum samples (ng/ml), organ and tissue samples (ng/g)								
		Лёгкие / Lungs	Почки / Kidneys	Мозг / Brain	Печень / Liver	Сердце / Heart	Селезёнка / Spleen	Интakтная мышца / Intact muscle	Инъекционная мышца / Muscle	Плазма крови / Serum
		–К	–	–	–	–	–	–	–	–
7-й	pNCure_1 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	19,7	<LOQ
	pNCure_1 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	13,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_1 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	8,3	<LOQ	<LOQ	77,2	<LOQ
	pNCure_1 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	127,6	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	50,3	<LOQ
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	203,5	<LOQ
	pNCure_2 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	155,7	<LOQ
14-й	pNCure_1 #1	47,2	43,7	<LOQ	11,1	<LOQ	<LOQ	17,4	32,7	0,058631
	pNCure_1 #2	<LOQ	18,5	<LOQ	5,2	19,0	<LOQ	13,6	27,4	0,058413
	pNCure_1 #3	<LOQ	10,6	<LOQ	16,1	8,1	<LOQ	<LOQ	58,2	0,019976
	pNCure_1 #4	<LOQ	15,8	<LOQ	35,4	9,8	5,8	<LOQ	94,0	0,008879
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	30,3	0,010445
	pNCure_2 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	52,6	0,006862
28-й	pNCure_1 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,010855
	pNCure_1 #2	<LOQ	11,0	28,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,007994
	pNCure_1 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,008608
	pNCure_1 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	84,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	90,6	0,004953
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #4	<LOQ	14,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,9	<LOQ	<LOQ	0,005156

согласно современным представлениям о регенеративных процессах, для их эффективной стимуляции нужна длительная экспрессия таких факторов, что подразумевает повторные инъекции локально экспрессирующихся генетических конструкций. Поскольку такие генетические конструкции несут гены факторов роста и могут потенциально вызывать нежелательные побочные действия, необходимо тщательно изучить

возможность их диссеминации из места введения и возможность их эктопической экспрессии.

В данной работе нами был предложен подход для определения способности бицистронной плазмидной генетической конструкции диссеминировать из места введения после четырёх внутримышечных инъекций. Для этого был использован метод определения плазмидной ДНК в органах и тканях экспериментальных

Таблица 9

Результаты иммуноферментного анализа образцов органов и тканей мышей, характеризующихся содержанием детектируемых количеств плазмиды pNCure, на содержание рекомбинантного мозгового нейротрофического фактора человека

Table 9

The results of enzyme immunoassay of samples of mice organs and tissues characterized by the content of detectable amounts of the pNCure plasmid for the content of recombinant human Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Орган / ткань / Organ/Tissue	Содержание BDNF, нг/г / BDNF Content, ng/g
Лёгкие_pNCure_1#1 (14 дней) / Lungs_pNCure_1#1 (14th day)	<LOD*
Почки_pNCure_1#1 (14 дней) / Kidneys_pNCure_1#1 (14th day)	<LOD*
Печень_pNCure_2#3 (28 дней) / Liver_pNCure_2#3 (28th day)	<LOD*
Печень_pNCure_1#4 (14 дней) / Liver_pNCure_1#4 (14th day)	<LOD*
Сердце_pNCure_1#2 (14 дней) / Heart_pNCure_1#2 (14th day)	<LOD*
Область инъекции_pNCure_1#3 (7 дней) / Injection locus_pNCure_1#3 (7th day)	14,6 ± 3,5

Примечание: \* – ниже предела чувствительности метода.  
Note: \* – below the limit of detection.

животных (мышей) с помощью ПЦР в реальном времени. Данное исследование показало, что данный подход позволяет определить плазмидную ДНК в широком спектре органов и тканей (биологических матриц) мыши в диапазоне концентраций 0,5 фг/мкл – 0,5 нг/мкл. В указанном диапазоне наблюдается высокая степень линейности зависимости концентрации плазмидной ДНК в матрице и показателей ПЦР в реальном времени, а предел чувствительности (количественного определения) данного метода находится в диапазоне 0,042–3,7 фг плазмидной ДНК на 1 мкл лизата или экстракта ткани, в зависимости от типа биологической матрицы.

С помощью данного метода было установлено, что наибольшая концентрация плазмидной ДНК наблюдается в мышце в области инъекции через 7 суток после окончания курса инъекций с постепенным снижением концентрации к 14- и 28-м суткам. Плазмидная ДНК способна диссеминировать в другие органы и ткани мыши, причём пик обнаружения в них плазмидной ДНК наблюдается через 14 суток при дозе 60 мкг/мышь и через 28 суток при дозе 120 мкг/мышь. Предположительно, что такая динамика её диссеминации может быть обусловлена диссеминацией по организму клеток моноцитарно-макрофагального ряда, поглотивших плазмидную ДНК, её фрагменты или фрагменты повреждённых мышечных клеток из области инъекции. Однако проверка данного предположения требует дополнительного исследования. Через 28 суток после окончания инъекций плазмидная ДНК перестаёт определяться в абсолютном большинстве образцов органов и тканей животных, которым делали инъекцию 60 мкг плазмиды.

Эктопическая экспрессия генов рекомбинантных факторов роста может приводить к негативным послед-

ствиям, поэтому нами была изучена их экспрессия в тканях с наибольшим содержанием плазмидной ДНК. Иммуноферментный анализ гомогенатов таких органов и тканей показал, что эктопическая экспрессия основного белка BDNF человека отсутствует или находится на уровне ниже предела чувствительности метода.

Таким образом, метод ПЦР в реальном времени продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность для определения количеств плазмидной ДНК или динамики её распределения в организме мыши после инъекции. Поскольку свойства экспрессии, стабильности, токсичности и диссеминации генетической конструкции во многом определяются её нуклеотидной последовательностью, мы считаем необходимым изучать данные параметры для каждого потенциального генотерапевтического препарата в моделях *in vivo*, и предложенный подход может оказаться для этого полезным.

### Заключение / Conclusion

1. Метод ПЦР в реальном времени подходит для определения генетических конструкций в тканях животных, что можно использовать для оценки диссеминации генотерапевтических препаратов из места введения.

2. Бицистронная плазмидная конструкция, кодирующая мозговой нейротрофический фактор и урокиназный активатор плазминогена, диссеминирует из места введения после курсового введения, но это не приводит к эктопической экспрессии факторов роста, в ней закодированных.

3. Содержание бицистронной конструкции в области инъекции, в органах и тканях экспериментальных животных снижается с течением времени.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ  
ADDITIONAL MATERIALS**

Таблица Д1

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах почек

Table D1

Calibration of pNCure plasmid in kidneys lysate

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,61	10,65	10,52	10,59 ± 0,07
5.0E-03	17,31	18,51	17,63	17,82 ± 0,62
5.0E-05	24,04	23,86	24,4	24,1 ± 0,27
5.0E-07	28,58	28,91	29,27	28,92 ± 0,35

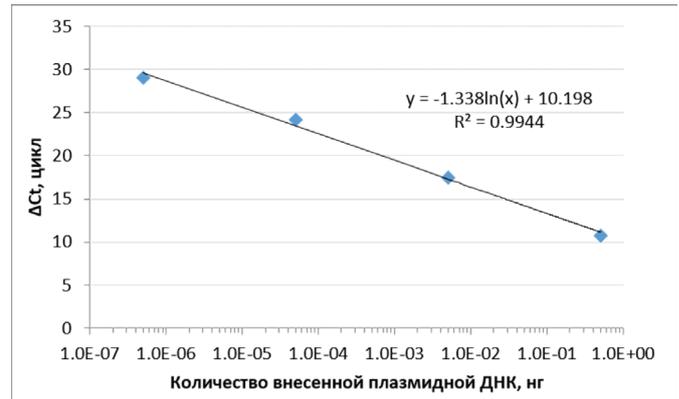


Рис. Д2. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах мозга  
Fig. Д2. Calibration curve for pNCure plasmid in brain lysate

Таблица Д3

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах печени

Table D3

Calibration of pNCure plasmid in liver lysate

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,3	10,43	10,38	10,37 ± 0,07
5.0E-03	17,34	17,99	18,01	17,78 ± 0,38
5.0E-05	24,27	24,62	25,12	24,67 ± 0,43
5.0E-07	27,94	28,19	27,92	28,02 ± 0,15

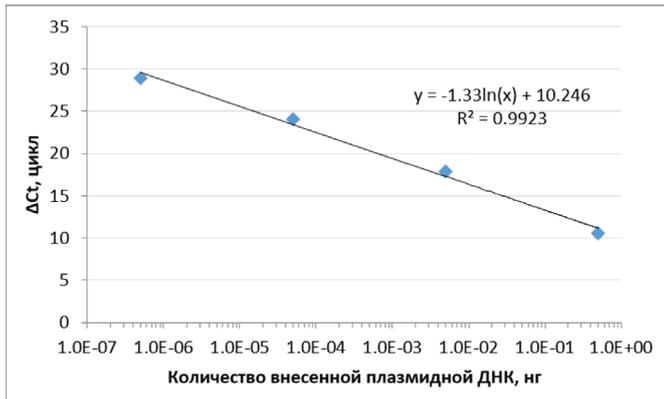


Рис. Д1. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах почек  
Fig. Д1. Calibration curve for pNCure plasmid in kidneys lysate

Таблица Д2

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах мозга

Table D2

Calibration of pNCure plasmid in brain lysate

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,66	10,83	10,76	10,75 ± 0,09
5.0E-03	17,62	17,44	17,37	17,48 ± 0,13
5.0E-05	24,18	24,06	24,38	24,21 ± 0,16
5.0E-07	31,09	28,08	27,99	29,05 ± 1,76

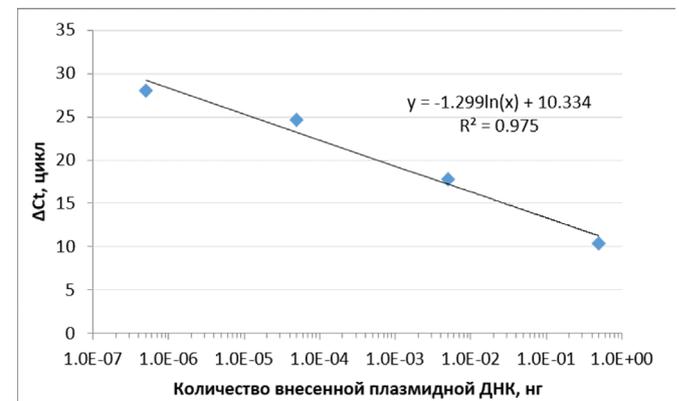


Рис. Д3. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах печени  
Fig. Д3. Calibration curve for pNCure plasmid in liver lysate

Таблица Д4

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах сердца

Table D4

Calibration of pNCure plasmid in heart lysate

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,6	11,03	10,79	10,81 ± 0,22
5.0E-03	17,39	17,43	17,69	17,5 ± 0,16
5.0E-05	24,12	24,01	24,13	24,09 ± 0,07
5.0E-07	26,82	26,65	26,95	26,81 ± 0,15

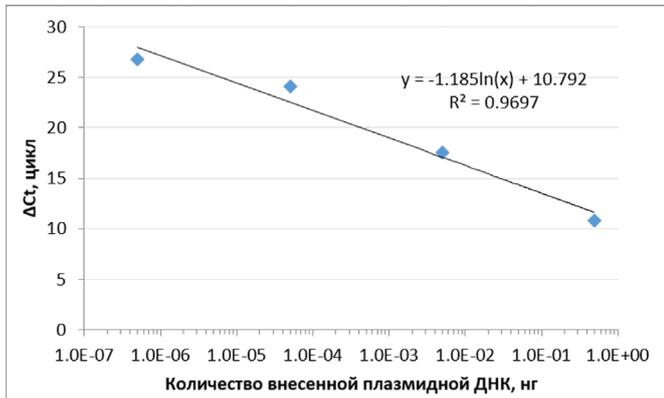


Рис. Д4. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах сердца  
Fig. Д4. Calibration curve for pNCure plasmid in heart lysate

Таблица Д5

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах селезёнки

Table D5

Calibration of pNCure plasmid in spleen lysate

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,57	10,54	10,56	10,56 ± 0,02
5.0E-03	17,47	18,28	17,49	17,75 ± 0,46
5.0E-05	24,01	24,19	23,92	24,04 ± 0,14
5.0E-07	24,75	26,31	26,49	25,85 ± 0,96

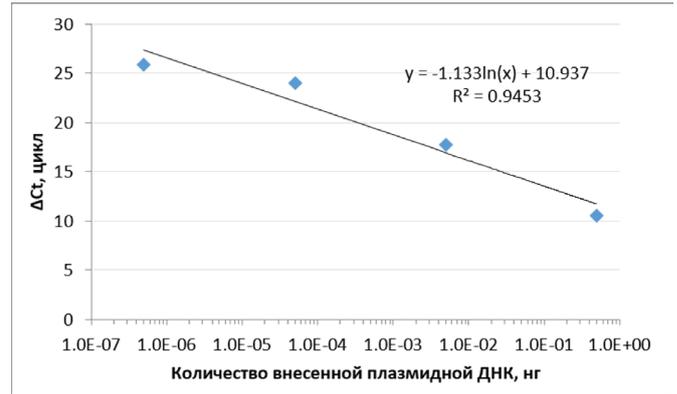


Рис. Д5. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах селезёнки  
Fig. Д5. Calibration curve for pNCure plasmid in spleen lysate

Таблица Д6

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах мышцы (интактной)

Table D6

Calibration of pNCure plasmid in muscle lysate (intact)

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	11,43	10,85	10,84	11,04 ± 0,34
5.0E-03	18,79	18,54	18,49	18,61 ± 0,16
5.0E-05	25,29	25,43	25,16	25,29 ± 0,14
5.0E-07	27,31	26,94	27,65	27,3 ± 0,36

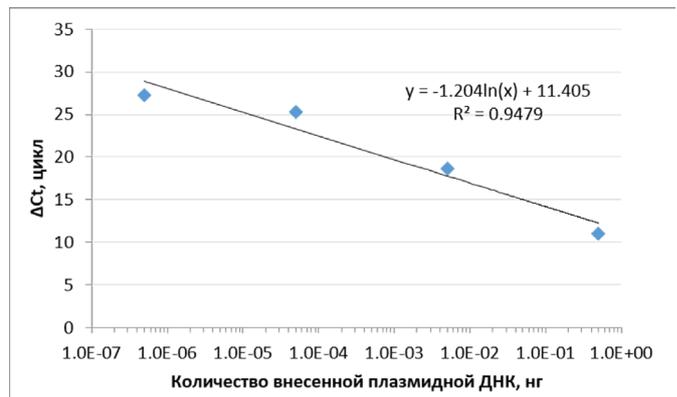


Рис. Д6. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах мышцы (интактной)  
Fig. Д6. Calibration curve for pNCure plasmid in muscle lysate (intact)

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ  
ADDITIONAL INFORMATION**

**Конфликт интересов.** Отсутствует.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

**Участие авторов.** Джауари С.С. – проведение эксперимента, анализ и обсчёт результатов; Карагяур М.Н. – дизайн эксперимента, анализ и обсчёт результатов, написание текста статьи; Балабаньян В.Ю. – дизайн эксперимента, написание и редактирование текста статьи; Скрябина М.Н. – проведение эксперимента, анализ и обсчёт результатов; Примаков А.Л. – проведение эксперимента, анализ и обсчёт результатов; Стамбольский Д.В. – дизайн эксперимента, редактирование текста статьи, получение финансирования для проведения работ.

**Participation of authors.** Jauari SS – experiments conduction and data processing; Karagyaur MN –

experiment design, data processing and article writing; Balabanyan VY – experiment design, article writing and editing; Scriabina MN – experiments conduction and data processing; Primakov AL – experiments conduction and data processing; Stambolsky DV – experiment design, article editing and funding acquisition.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке МинПромТорга РФ в рамках реализации Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

**Acknowledgements.** The study was financially supported by the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation as part of the implementation of the Federal target program “Development of the pharmaceutical and medical industries of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond”.

**СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS**

**Джауари Сталик Станиславович**

e-mail: stalik.djauari@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5480-2322>

SPIN-код: 6990-3656

аспирант кафедры биохимии и молекулярной медицины, ФФМ МГУ, Москва, Россия

**Dzhauari Stalik S.**

e-mail: stalik.djauari@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5480-2322>

SPIN code: 6990-3656

PhD student of the Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, MSU, Moscow, Russia

**Карагяур Максим Николаевич**

*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: m.karagyaur@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4289-3428>

SPIN-код: 9504-4257

к. б. н., доцент кафедры биохимии и молекулярной медицины, ФФМ МГУ, Москва, Россия;  
с. н. с. ИРМ МНОЦ МГУ, Москва, Россия

**Karagyaur Maxim N.**

*Corresponding author*

e-mail: m.karagyaur@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4289-3428>

SPIN code: 9504-4257

PhD Biological Sci., Associate Professor, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, MSU, Moscow, Russia; senior researcher Institute for Regenerative Medicine, Medical research and education center, MSU, Moscow, Russia

**Балабаньян Вадим Юрьевич**

e-mail: bal.pharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>

д. фарм. н., в. н. с., межфакультетская научно-исследовательская лаборатория трансляционной медицины ФФМ МГУ, Москва, Россия;  
в. н. с. ИРМ МНОЦ МГУ, Москва, Россия

**Balabanyan Vadim Yu.**

e-mail: bal.pharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>

Doctor of Pharmacy, Leading Researcher, Interfaculty Research Laboratory of Translational Medicine, Faculty of Medicine, MSU, Moscow, Russia; Leading Researcher, Institute for Regenerative Medicine, Medical research and education center, MSU, Moscow, Russia

**Скрябина Мария Никитична**

e-mail: skrebbka@gmail.com  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3128-2699>  
 студент, лаборант кафедры биохимии и молекулярной медицины, ФФМ МГУ, Москва, Россия

**Skryabina Mariya N.**

e-mail: skrebbka@gmail.com  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3128-2699>  
 Student, laboratory assistant of the Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, MSU, Moscow, Russia

**Примак Александра Леонидовна**

e-mail: primak.msu@mail.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1386-5922>  
 SPIN-код: 3882-8197  
 аспирант кафедры биохимии и молекулярной медицины ФФМ МГУ, Москва, Россия

**Primak Alexandra L.**

e-mail: primak.msu@mail.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1386-5922>  
 SPIN code: 3882-8197  
 PhD student of the Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, MSU, Moscow, Russia

**Стамбольский Дмитрий Викторович**

e-mail: dstambolsky@mc.msu.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6983-9697>  
 SPIN-код: 1776-1518  
 к. б. н., в. н. с. отдела научных программ и инновационных технологий медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Stambolsky Dmitry V.**

e-mail: dstambolsky@mc.msu.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6983-9697>  
 SPIN code: 1776-1518  
 PhD Biological Sci., Leading Researcher, Department of Scientific Programs and Innovative Technologies of the Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**Список литературы / References**

1. Одинак М.М., Живолупов С.А. Заболевания и травмы периферической нервной системы. Санкт-Петербург: Издательство «СпецЛит»; 2009. [Odinak MM, Zhivolupov SA. Zabolevaniya i travmy perifericheskoy nervnoy sistemy. Saint-Petersburg: Izdatel'stvo «SpecLit»; 2009. (In Russ).].
2. Шевелев И.Н. Травматические поражения плечевого сплетения. — М.: Издательство «Москва»; 2005. [Shevelev IN. Travmaticheskie porazheniya plechevogo spleteniya. Moscow: Izdatel'stvo «Moskva»; 2005. (In Russ).].
3. Karagyaur M, Rostovtseva A, Semina E, Klimovich P et al. A bicistronic plasmid encoding brain-derived neurotrophic factor and urokinase plasminogen activator stimulates peripheral nerve regeneration after injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2020;372(3):248–255. DOI: 10.1124/jpet.119.261594.
4. Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol.* 2003;27(3):277–324. DOI: 10.1385/MN:27:3:277.
5. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery.* 1998;18(7):397–405. DOI: 10.1002/(sici)1098-2752(1998)18:7<397::aid-micr2>3.0.co;2-f.
6. Huang Q, Wei H, Wu Z, et al. Preferentially Expressed Antigen of Melanoma Prevents Lung Cancer Metastasis. *PLoS One.* 2016;11(7):e0149640. DOI: 10.1371/journal.pone.0149640.

7. Maripuu A, Björkman A, Björkman-Burtscher IM, Mannfolk P et al. Reconstruction of sciatic nerve after traumatic injury in humans - factors influencing outcome as related to neurobiological knowledge from animal research. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj.* 2012 Oct 10;7(1):7. DOI: 10.1186/1749-7221-7-7.
8. EMEA. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.
9. US FDA. Guidance for industry: Q2B validation of analytical procedures: methodology. Rockville. MD: Nov 1996.
10. OECD. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. 2005.
11. Schechtman LM. Internationally harmonized processes for test method evaluation. Validation and regulatory acceptance: The role of OECD guidance document 34. Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments, 14, Special Issue. Pp. 475–782 (2008).
12. Хамиде З. Сеньюва, Гилберт Д. Простое руководство для пользователей по разработке и валидации методов / Перевод на русский язык под ред. А. Галкин. — М.: Издательство «ООО Торнус 77»; 2011. [Hamide Z. Senyuva, Gilbert D. Prostoe rukovodstvo dlya pol'zovatelej po razrabotke i validacii metodov / Perevod na russkij yazyk pod red. A. Galkin. Moscow: Izdatel'stvo «ООО Torius 77»; 2011. (In Russ).].
13. Ermer J, Nethercote PW. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. Wiley, 2014.