

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

*На правах рукописи*



**Джауари Сталик Станиславович**

ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ СЕКРЕТОМА  
МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ  
ИНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ ГЕМАТОМЫ  
(ГЕМОРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА)

Специальности - 1.5.5. – Физиология человека и животных

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Научные руководители**

к.б.н., Карагяур Максим Николаевич

д.фарм.н., доцент, Балабаньян Вадим Юрьевич

Москва – 2024

# Оглавление

Список сокращений .....	4
Глава 1. Введение .....	9
Глава 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
2.1 Геморрагический инсульт .....	15
2.2 Патогенез геморрагического инсульта .....	20
Первичное повреждение .....	20
Вторичное повреждение.....	20
2.3 Мезенхимные стромальные клетки.....	38
2.3.1 Общая характеристика МСК .....	38
2.3.2 Исследование МСК при инсульте .....	44
2.3.3 Ограничения клеточной терапии МСК .....	53
2.3.4 Бесклеточная терапия на основе МСК .....	54
Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	58
3.1 Животные.....	58
3.2 Выделение мезенхимных стромальных клеток из ЖТ .....	58
3.3 Получение и стандартизация секрета мезенхимных стромальных клеток .....	59
3.4 Моделирование геморрагического инсульта и определение неврологического статуса экспериментальных животных.....	60
3.5 Определение объема очага повреждения методом магнитно- резонансной томографии.....	63
3.6 Исследование зоны повреждения ткани мозга методами гистохимии и иммуногистохимии .....	64
3.7 Исследование прямой нейропротекторной активности секрета МСК <i>in vitro</i> .....	65
3.8 Исследование поляризации моноцитов и макрофагов периферической крови человека под действием секрета МСК <i>in vitro</i> .....	67
3.9 Статистическая обработка данных.....	69
Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	70
4.1 Исследование белково-пептидного состава секрета МСК.....	70
4.2 Оценка нейропротекторного эффекта секрета МСК на модели геморрагического инсульта крыс .....	71

4.3 Исследование механизмов, вовлеченных в реализацию нейропротекторных свойств секрета МСК при ГИ .....	77
4.3.1 Влияние секрета МСК на выживаемость клеток in-vitro на модели глутамат-опосредованной токсичности.....	77
4.3.2 Влияние секрета МСК на рост нейритов клеток in-vitro.....	79
4.3.3 Влияние секрета МСК на поляризацию моноцитов и макрофагов из периферической крови.....	80
4.3.4 Влияние секрета МСК на активацию процессов фагоцитоза в очаге повреждения и вокруг него.....	83
4.3.5 Установка вовлеченности мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA) в реализацию нейропротекторного эффекта секрета МСК.....	86
4.4 Определение основных параметров введения бесклеточного препарата секрета МСК в модели ГИ.....	89
4.4.1 Определение эффективности секрета МСК при различных путях введения .....	89
4.4.2 Определение оптимального временного интервала от индукции ГИ до введения секрета МСК.....	93
4.4.3 Определение оптимального показателя концентрирования секрета МСК.....	97
Глава 5. Обсуждение результатов .....	102
Выводы .....	111
Глава 6. Список цитируемой литературы.....	113

## Список сокращений

АГ – артериальная гипертензия

АТ – антитела

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВВ – внеклеточные везикулы

ВЖК – внутрижелудочковое кровоизлияние

ВМГ – внутримозговая гематома

ВМК – внутримозговое кровоизлияние

ВЧД – внутричерепное давление

ГИ – геморрагический инсульт

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ЖТ – жировая ткань

ИПГ – интрацеребральная посттравматическая гематома

ИФА – иммуноферментный анализ

КИ – клинические испытания

КМ – костный мозг

кМСК – мезенхимные стволовые клетки крысы

КОЕ – колониобразующая единица

ЛЖ – левый (боковой) желудочек мозга

ММП – матриксные металлопротеиназы

мМСК – мезенхимные стволовые клетки мышцы

МРТ – магнитно-резонансная томография

МСК – мезенхимные стволовые клетки

МСК-ЖТ – мезенхимные стволовые клетки жировой ткани

МСК-КМ - мезенхимные стволовые клетки костного мозга

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

НСК – нейральные стволовые клетки

ОНМК – острые нарушения мозгового кровообращения

ОС – окислительный стресс

ПНС – периферическая нервная система

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СА – сонная артерия

САК – субарахноидальное кровоизлияние

СМА – средняя мозговая артерия

СОД – супероксиддисмутаза

ЦНС – центральная нервная система

ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2

чМСК – мезенхимные стволовые клетки человека

ШВ – шейная вена

ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

AGE – advanced glycation end-products, конечные продукты гликирования

BDNF – brain-derived neurotrophic factor, мозговой фактор роста нервов

CCL-1 – chemokine ligand 1, хемокиновый лиганд -1

CD – cluster of differentiation, кластер дифференцировки

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium, среда Игла, модифицированная Дульбекко

DMEM-LG – Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose, среда Игла, модифицированная Дульбекко с низкой концентрацией глюкозы

EGF – epidermal growth factor, эпидермальный фактор роста

FGF, FGFR – fibroblast growth factor, Fibroblast growth factor Receptor, фактор роста фибробластов, рецептор фактора роста фибробластов

GDNF – glial cell line-derived neurotrophic factor, глиальный фактор роста нервов

GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок

HGF, HGFR – Hepatocyte growth factor, Hepatocyte growth factor Receptor, фактор роста гепатоцитов, рецептор фактора роста гепатоцитов

HO-1 – heme oxygenase-1, гемоксигеназа-1

IGF-I – insulin-like growth factor-I, фактор роста, подобный инсулину

ISCT – International Society for Cellular Therapy, международное общество клеточной терапии

MAPK – mitogen-activated protein kinase, киназа, активируемая митогенами

MCU – mitochondrial calcium uniporter, митохондриальный кальциевый унипортер

NGF – nerve growth factor, фактор роста нервов

NIHSS – National Institutes of Health Stroke Scale, шкала тяжести инсульта национального института здоровья США

NMDA – рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспарат

nNOS – neuronal nitric oxide synthase, нейрональная NO-синтаза

NT-3, -4, -5 – neurotrophine-3, -4, -5, нейротрофин-3, -4, -5

PAI-1 – plasminogen activators inhibitor-1, ингибитор активаторов плазминогена

PAR-1 – protease-activated receptor, рецептор, активируемый протеазами

PARs – protease-activated receptors, рецепторы активируемые протеазами

PDGF, PDGFR – platelet-derived growth factor, Platelet-derived growth factor ресептор, фактор роста, выделенный из тромбоцитов, рецептор фактора роста, выделенного из тромбоцитов

PGE2-1 – prostaglandin E2, простогландин E2

PPAR $\gamma$  – peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ , рецептор, активируемы пероксисомным пролифератором  $\gamma$

PTP – mitochondrial permeability transition pore, митохондриальная пора повышенной проницаемости

SDF-1 – stromal cell-derived factor-1, хемокин подсемейства CXС или стромальный клеточный фактор

SMAD2 – similar to Mothers Against Decapentaplegic, семейство белков подобных белковым продуктам гена Mad плодовой мушки *Drosophila melanogaster* и гена SMA нематоды *C. elegans*.

TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  – transforming growth factor- $\alpha$ , - $\beta$ , трансформирующий фактор роста - $\alpha$ , - $\beta$

TLR4 – toll-like receptor 4, толл-подобный рецептор 4

TNF- $\alpha$  – tumor necrosis factor- $\alpha$ , фактор некроза опухоли-  $\alpha$

tPA – tissue plasminogen activator, тканевой активатор плазминогена

TrkA, B, C – tropomyosin-receptor-kinase A, B, C

uPA – urokinase plasminogen activator, урокиназный активатор плазминогена

VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

# Глава 1. Введение

## *1.1 Актуальность*

Одной из актуальных биологических и медицинских задач является изучение регенерации тканей человека. На сегодняшний день существует множество литературных данных, указывающих на ключевую роль стволовых клеток в процессах регенерации поврежденных тканей (Clevers et al., 2014; Dunn et al., 2019; Nosrati et al., 2021; Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2022). Помимо тканеспецифичных стволовых клеток, важную роль в процессах регенерации после повреждения играют и мезенхимные стромальные клетки (МСК), которые широко представлены в сосудисто-стромальном компоненте большинства органов и тканей (Ding et al., 2011; Pittenger et al., 2019). Противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства делают мультипотентные мезенхимные стромальные клетки весьма привлекательными для клинического применения при огромном спектре заболеваний, включающих как острые, так и хронические воспалительные поражения тканей у человека и животных.

Наибольший интерес для клеточной терапии представляют МСК жировой ткани (МСК-ЖТ) (Gutierrez-Fernandez et al., 2013; Ong et al., 2021; Satilmis et al., 2022). Их широкое применение в регенеративной медицине связано с доступностью ЖТ и высоким содержанием в ней МСК. Считается, что МСК вносят решающий вклад в восстановление и регенерацию поврежденных тканей (Caplan et al., 2011; Kalinina et al., 2011; Zachar et al., 2016). Показано, что прорегенеративные эффекты МСК в основном опосредованы компонентами их секретома. Таким образом, МСК, благодаря широкому спектру нейротрофических, ангиогенных и иммуномодулирующих компонентов в составе своего секретома способны опосредовать процессы регенерации в различных типах тканей. Располагаясь в составе естественной тканевой ниши органа, МСК способны взаимодействовать с другими стволовыми клетками, элементами межклеточного матрикса, а также, в случае необходимости,

рекрутироваться из ниши в очаг повреждения, дабы определять дальнейшие процессы регенерации и репарации в поврежденной ткани путем секреции паракринных факторов как в свободном виде, так и в составе внеклеточных везикул или экзосом. Подобная физиологическая роль МСК была использована для разработки клеточной терапии ряда заболеваний, в том числе был продемонстрирован существенный регенеративный потенциал в отношении неврологических патологий как в периферической части нервной системы, так и в ЦНС (Lopatina et al., 2011; Zheng et al., 2018). В то же время, с точки зрения терапевтического применения, у бесклеточного препарата на основе кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК есть ряд преимуществ перед клеточной терапией МСК. Такой терапевтический подход позволяет преодолеть классические ограничения клеточной терапии стволовыми клетками (а именно вопросы: безопасности клеточной терапии и распределения трансплантируемых клеток в организме человека; жизнеспособности клеток после трансплантации; фенотипической variability образцов клеток, полученных от разных доноров; а в случае аллогенной трансплантации – проблема гетерогенности популяции клеток, полученных из различных тканевых источников; а также сложные и дорогие технологии культивирования клеток, их хранения и контроля качества). Важно понимать, что многокомпонентность секрета не освобождает исследователя от стандартизации данного бесклеточного препарата, которую стоит проводить по основным факторам, опосредующим целевую активность секрета (в случае каждой отдельной патологии, основным действующим фактором или их совокупность могут различаться). Наиболее перспективно применение бесклеточного препарата на основе секрета клеток МСК в отношении процессов со сложным многоуровневым патогенезом, для которых монокомпонентная терапия не является эффективной. Одной из таких нерешенных медицинских проблем является геморрагический инсульт, который приводит к высокой смертности и инвалидизации пациентов, страдающих от данной патологии. Важно понимать, что ишемическая форма

инсульта более распространена, и для нее существуют доказанные эффективные терапевтические подходы. В то время как для геморрагической формы инсульта (ассоциированной с внутримозговым кровоизлиянием), менее распространенной, но клинически более тяжелой формой, эффективной специфической терапии, способной снизить клинические проявления, не существует. Данный факт указывает на необходимость изучения механизмов повреждения нервной ткани при геморрагическом инсульте и поиска новых терапевтических подходов, воздействующих на различные звенья патогенеза в данной патологии.

## ***1.2 Степень разработанности темы***

Как было упомянуто ранее, МСК являются перспективным инструментом клеточной терапии. Ранее, в широком спектре доклинических и клинических испытаний было продемонстрировано нейропротекторное влияние трансплантированных МСК при геморрагическом инсульте (ГИ), ассоциированном с внутримозговым кровоизлиянием (ВМК) (Al Fauzi et al., 2016; Chen et al., 2015; Feng et al., 2011; Liao et al., 2009; Otero et al., 2010; Seyfried et al., 2006; Tsang et al., 2017; Wang et al., 2012; Williams et al., 2019; Zhang et al., 2006; Zhang, 2016; Zhou et al., 2016). В связи с тем, что клеточная терапия имеет ряд существенных ограничений, а основную регуляторную и прорегенераторную роль МСК осуществляют за счет секретируемых ими факторов, то важным вопросом стало выяснение возможного нейропротекторного потенциала секретома МСК. По данным литературы в последнее время широко освещалась возможность применения экзосом МСК, в том числе и при ВМК (Cai et al., 2020; Duan et al., 2020). В большинстве случаев исследователями были использованы генно-инженерные методы модификации экзосом МСК, направленные на изменение содержания отдельных микроРНК в составе данных экзосом. В то же время важно упомянуть, что в составе секретома МСК помимо везикулярной фракции имеется широкий спектр

растворимых факторов, способных оказывать нейропротекторный, проангиогенный и противовоспалительный эффекты.

Таким образом, **целью** данной работы являлось выявление нейропротекторного и нейротрофического эффекта секретомы МСК при моделировании интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) и выяснение возможных механизмов, опосредующих обозначенные эффекты.

Для достижения этой цели были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) Отработать технологию получения секретомы МСК и предложить подходы к его стандартизации;
- 2) Исследовать влияние секретомы МСК на выживаемость, неврологический статус, а также оценить размеры очага повреждения в модели интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) у крыс;
- 3) Провести сравнительное изучение эффективности аллогенного и ксеногенного секретомы МСК при моделировании интрацеребральной посттравматической гематомы у крыс;
- 4) Выявить молекулярные и клеточные механизмы, опосредующие нейропротекторные свойства секретомы МСК, а также способность подавлять нейровоспаление;
- 5) Исследовать эффективность секретомы МСК при различных путях и режимах введения на модели интрацеребральной посттравматической гематомы у крыс;

### ***1.3 Научная новизна***

Исследован белково-пептидный профиль секрета МСК и предложены подходы к его стандартизации. Выявлена способность секрета МСК осуществлять нейропротекцию на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) крыс. Предложены механизмы, объясняющие нейропротекторный эффект секрета МСК. Показано влияние секрета МСК на подавление процессов нейровоспаления в очаге повреждения. Установлено, что секретом МСК проявляет нейропротекторные свойства при интрацеребральном, интраназальном и внутривенном путях введения. Кроме того, продемонстрирована зависимость нейропротекторной активности от видоспецифичности секрета МСК на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) у крыс.

Новизна полученных результатов подтверждается патентом на изобретение РФ (Композиция для нейропротекции и стимуляции нейрорегенерации головного мозга после повреждения, средство на ее основе, способ его получения и применения; патент РФ №2803286 от 12 сентября 2023 г.).

### ***1.4 Теоретическая и практическая значимость работы***

Результаты исследования позволяют оценить значимость роли МСК в регуляции нейровоспаления после внутримозговых кровоизлияний. Данные, полученные в результате исследования нейропротекторного потенциала секрета МСК при моделировании интрацеребральной посттравматической гематомы у крыс, могут способствовать поиску новых терапевтических подходов, уменьшающих повреждение нервной ткани при кровоизлияниях в паренхиму мозга, а также быть использованы в качестве пилотных при проведении доклинических испытаний оригинального нейропротекторного лекарственного препарата.

### ***1.5 Апробация работы***

Основные результаты работы были представлены на IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине, Москва, 2019 г., Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020», Москва, 2020 г., Международной конференции «Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – Asia Pacific Meeting» (TERMIS-AP 2022), Чеджу, Южная Корея, 2022 г., V Национальном конгрессе по регенеративной медицине, Москва, 2022 г., III зимней школе-конференции молодых ученых «Редактирование генома», Томск, 2022 г.

### ***1.6 Положения, выносимые на защиту***

- 1) Введение секрета МСК способствует улучшению выживаемости и неврологического статуса, а также приводит к ограничению очага повреждения при моделировании интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) у крыс.
- 2) Существует зависимость нейропротекторной активности от видоспецифичности секрета МСК
- 3) Нейропротекторный эффект секрета МСК реализуется как за счет прямой нейропротекции (увеличение выживаемости нейральных клеток в условиях глутамат-опосредованной токсичности), так и за счет подавления процессов нейровоспаления.
- 4) BDNF и uPA являются важными компонентами секрета МСК и вовлечены в реализацию нейропротекторного эффекта.
- 5) Секретом МСК обладает нейропротекторными свойствами при интрацеребральном, внутривенном и интраназальном введении.

## Глава 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Геморрагический инсульт

Геморрагический инсульт представляет собой подтип инсульта, включающий все формы нетравматического внутримозгового кровоизлияния. Данная полиэтиологическая патология характеризуется высоким показателем смертности (~ 40% в течение первого месяца); те пациенты, которым удается выжить, чаще всего страдают от серьезных неврологических нарушений (Van Asch et al., 2010). Геморрагический инсульт составляет примерно 10–15% всех инсультов в США, Европе и Австралии и порядка 20–30% инсультов в азиатском регионе (Adeoye et al., 2010). Только в Российской Федерации каждый год диагностируют ГИ у примерно 43 000 человек. Артериальная гипертензия является наиболее частой (более 65%) причиной спонтанных внутримозговых кровоизлияний, также другими причинами развития геморрагического инсульта могут быть: церебральная амилоидная ангиопатия, опухоли головного мозга, аневризмы, артериовенозные мальформации головного мозга, церебрально-кавернозные мальформации и артериовенозные фистулы (Aguilar et al., 2010; Xi et al., 2006). Существенную долю среди внутримозговых кровоизлияний занимают кровоизлияния, связанные с применением антикоагулянтов (Flaherty, 2010). Описаны случаи мозговых кровоизлияний, являющихся осложнениями инфекционных заболеваний ЦНС и эклампсии (Deliran et al., 2022; Ghaly et al., 2012). Кроме того, существуют и бессимптомные микрокровоизлияния в паренхиму мозга. По данным ряда исследований подобные бессимптомные внутримозговые кровоизлияния встречаются примерно у 5% населения, а в случае пожилых людей частота таких кровоизлияний составляла примерно 11,1–23,5% (Cordonnier et al., 2007; Greenberg et al., 2009). Долгосрочное влияние бессимптомных микрокровоизлияний на ткань мозга все еще остается неопределенным. Они часто являются маркером сосудистых патологий

организма и фактором риска дальнейшего развития цереброваскулярных заболеваний (так, например, наличие микрокровоизлияний увеличивает риск геморрагического инсульта, связанного с приемом варфарина, более чем в 80 раз) (Lee et al., 2009). Существуют предположения о том, что микрокровоизлияния в головном мозге могут способствовать развитию деменции и болезни Альцгеймера (Cordonnier et al., 2011; Werring et al., 2010).

Существуют два основных механизма развития внутримозгового кровоизлияния: по типу гематомы и по типу диапедезного пропитывания. Кровоизлияния по типу диапедезного пропитывания встречаются редко, и чаще всего являются следствием системных изменений сосудистой стенки и повышения ее проницаемости. Такие кровоизлияния обычно имеют небольшие объемы и локализуются преимущественно в таламусе или варолиевом мосту. Кровоизлияния по типу гематомы наиболее частые (по материалам аутопсий примерно 85% случаев), имеют большой объем и локализованы типично (преимущественно в полушариях мозга подкорковых ядрах, и мозжечке) (Skidmore et al., 2002).

Локализация кровоизлияния в мозговой ткани играет важную роль и способна определять течение и исход инсульта. Внутримозговые кровоизлияния ствола мозга представляются наиболее летальным подтипом, тогда как кровоизлияния в мозжечок имеют лучший прогноз. В больших статистических группах лобарные ВМК и глубокие церебральные формы ВМК имели сходные показатели летальности. Другие исследования показали, что лобарные кровоизлияния имеют больший средний объем, чем глубокие мозговые кровоизлияния, но с меньшей вероятностью распространяются на желудочковую систему, что является двумя уравновешивающими факторами, влияющими на прогноз. Крупнейшее популяционное исследование исходов ВМК было проведено в городе Идзумо, Япония (Inagawa et al., 2003). Авторы исследования описали 350 пациентов, обследованных с 1991 по 1998 г. (в группы не входили пациенты с сосудистыми мальформациями или

коагулопатиями). Клинические исходы в когорте пациентов были следующие: 7- и 30-дневная смертность составила 11 и 13% соответственно. Выживаемость была лучшей в случаях ВМК мозжечка и худшей после ВМК ствола мозга. Тридцатидневная летальность в их популяции составила 0% для ВМК мозжечка, 11% для долевых локализаций ВМК, от 9 до 14% для ВМК в различных глубоких отделах головного мозга и 53% для ВМК ствола мозга.

Важным показателем для оценки состояния пациента с ВМК является не только локализация гематомы, но и ее объем. Ряд исследований указывают на зависимость между выживаемостью, тяжестью неврологических дефицитов у пациентов, перенесших геморрагический инсульт, и объемом кровоизлияния. Так, например, было показано, что большой объем кровоизлияния (> 60 мл) коррелирует с более высокой смертностью в течение первых 30 дней после ГИ. В то же время пациенты с гематомами, объем которых не превышал 30 мл, чаще выживали и проходили успешную реабилитацию в 90-дневный период (Kim, 2009). Объем гематомы может увеличиться с течением времени. Подобное увеличение очага кровоизлияния (часто происходящее в первые часы после ГИ) приводило к ухудшению состояния пациента (Delcourt et al., 2012). Хотя физиологические механизмы, приводящие к увеличению объема гематомы, остаются не до конца изучены, но большинство данных подтверждают гипотезу о вторичном кровоизлиянии, происходящем вследствие повреждения соседних сосудов, окружающих изначальное место кровотечения (Brouwers et al., 2013). Таким образом предупреждение роста гематомы или малоинвазивные хирургические методы эвакуации гематомы являются на сегодняшний день основными стратегиями при лечении пациентов с ВМК.

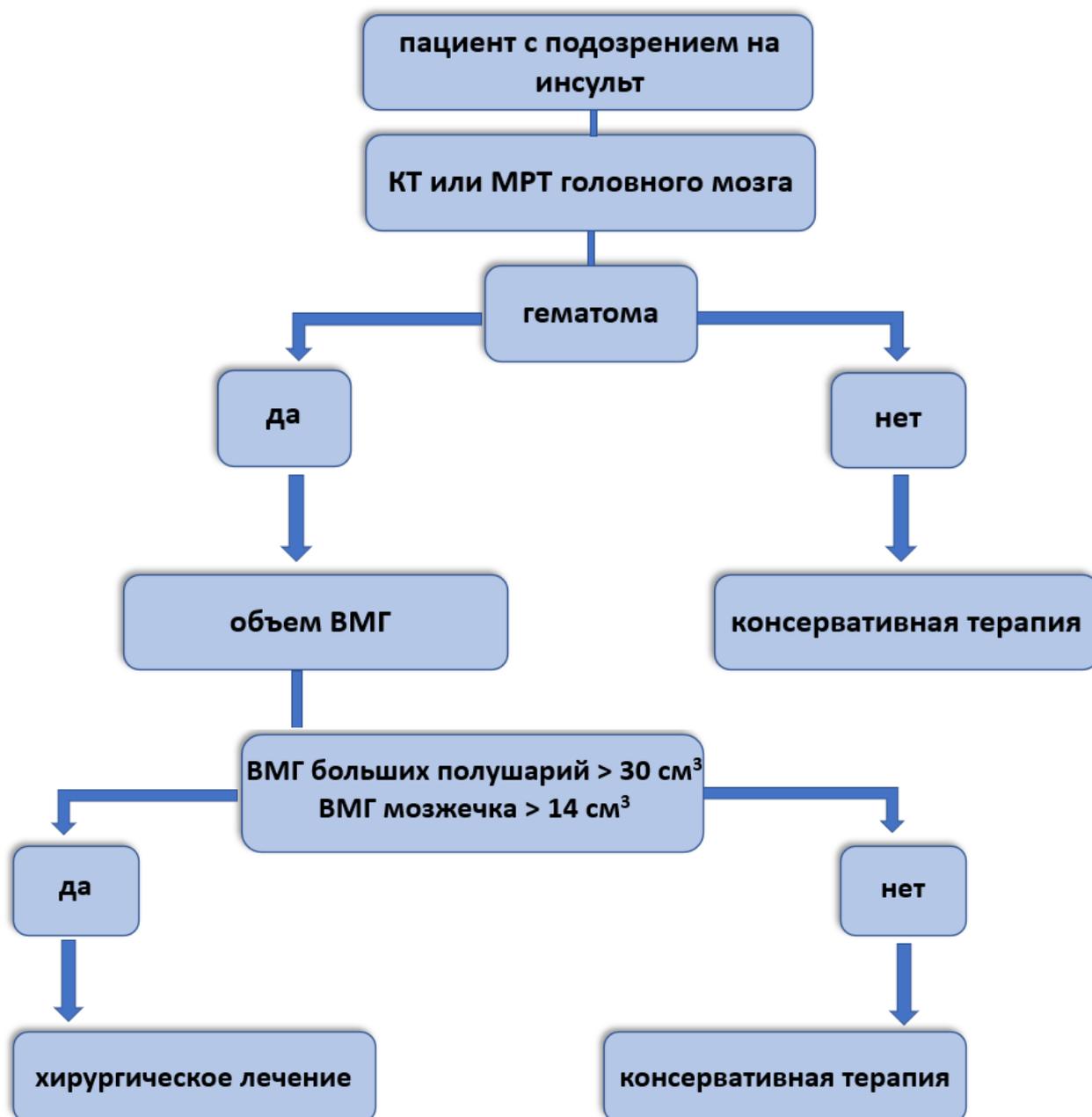
Ключевая информация, которую необходимо получить о пациенте с ВМК как можно скорее после поступления в больницу, включает следующее:

- 1) Повышенное (>150 мм рт.ст.) ли у пациента систолическое артериальное давление?

- 2) Принимает ли пациент антикоагулянты?
- 3) Имеет ли место прорыв крови в желудочковую систему (внутрижелудочковое кровоизлияние) и развитие вследствие этого острой окклюзионной гидроцефалии?
- 4) Есть ли у пациента высокий риск увеличения объема гематомы?
- 5) Имеются ли у пациента признаки сосудистого источника кровотечения (например, артериовенозная мальформация, дуральная артериовенозная фистула, аневризма, тромбоз церебрального венозного синуса)?

Дальнейшие терапевтические мероприятия проводятся по алгоритму (Клин. Рекомендации, Геморрагический инсульт, 2021) (рис. 1)

На сегодняшний день вопросы лечения геморрагического инсульта являются сложными и не до конца решенными. Опубликованные результаты КИ не позволяют сложить однозначное мнение о преимуществе нейрохирургического или консервативного лечения в отношении пациентов с ВМК. Но очевидно, что поиск новых подходов в консервативной терапии ГИ является важной и актуальной научной задачей.



1. Эндоскопическое удаление ВМГ
2. Микрохирургическое удаление ВМГ

**Рис. 1** Алгоритм терапевтических мероприятий при геморрагическом инсульте.

## **2.2 Патогенез геморрагического инсульта**

### ***Первичное повреждение***

В первую очередь при ВМК объемная гематома способна привести к повышению внутричерепного давления (ВЧД), сдавливая прилежащую мозговую ткань, и, тем самым, нарушая ее перфузию, а также вызывая отек головного мозга (Keer et al., 2012). Однако, обычное лечение отека головного мозга (маннитол, глицерин и гипервентиляция) не может эффективно снизить внутричерепное давление или предотвратить вторичное повреждение головного мозга (Cordonnier et al., 2018). С развитием патологического состояния в патогенезе ГИ появляются факторы, вызывающие вторичное повреждение мозговой ткани.

### ***Вторичное повреждение***

#### ***2.2.1 Воспаление***

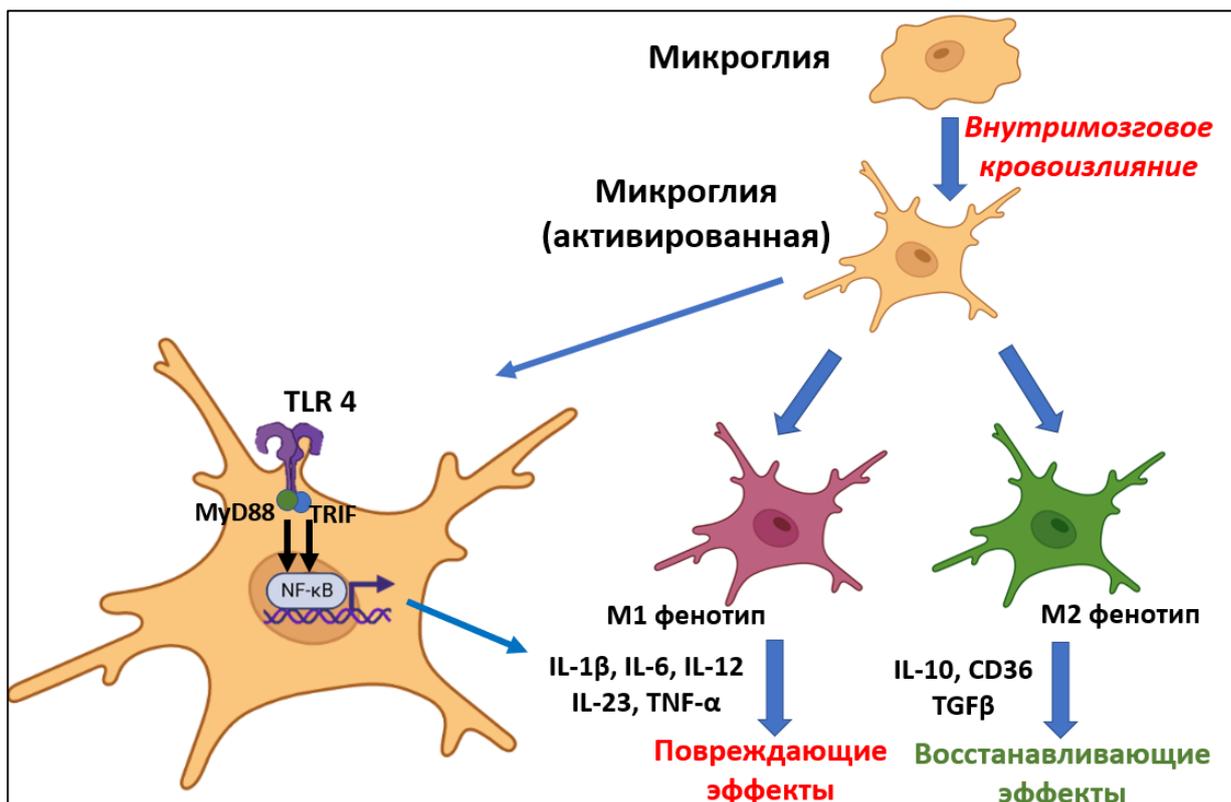
По данным литературы известно, что при ВМК происходит инфильтрация макрофагами и нейтрофилами области повреждения, а также в гематомах и перигематомной области происходит активация микроглии. Воспалительные реакции, запущенные ВМК, во многом связаны именно с активацией микроглии/макрофагов, и считается, что изменение фенотипа данных клеток играет важную патофизиологическую роль во вторичном повреждении нервной ткани при ВМК (Wan et al., 2016). В физиологических условиях клетки микроглии обладают регуляторными функциями: осуществляют поддерживающую функцию в отношении нейронов, гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и нейронального межклеточного матрикса. Когда происходит кровоизлияние в мозг данные клетки быстро активируются, высвобождая большое количество провоспалительных факторов и вызывая каскадную

воспалительную реакцию, что в итоге приводит к патологическим изменениям, таким как повреждение ГЭБ, отек, массовая гибель нейронов и т. д. (Bhatia et al., 2016). Было доказано, что подавление процесса активации микроглии может уменьшить повреждение головного мозга и отек при ВМК (Scott et al., 2018). После активации микроглии/макрофагов, происходит дифференциация данных клеток по одному из основных фенотипов (фенотип M1 и фенотип M2) (Xiong et al., 2016). На ранней стадии ВМК микроглия/макрофаги активируются различными компонентами крови и приобретают провоспалительный фенотип M1. Данные клетки в фенотипе M1 экспрессируют значительное количество толл-подобных рецепторов 4 (TLR4), гемоксигеназу-1 (HO-1), а также продуцируют провоспалительные цитокины интерлейкин IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL -23 и TNF- $\alpha$ , усугубляющие повреждение головного мозга (Ponomarev et al., 2013; Varnum et al., 2012). Клетки в M2 фенотипе, наоборот, могут способствовать восстановлению нервной ткани в области повреждения за счет синтеза противовоспалительных факторов IL-10, CD36 и TGF- $\beta$  что приводит к подавлению воспалительных процессов и ремоделированию поврежденной ткани (Pan et al., 2015; Xia et al., 2015). Таким образом, можно сформулировать вывод о том, что стимулирование дифференцировки микроглии в фенотип M2 и подавление дифференцировки в фенотип M1 может оказать восстанавливающий эффект после ВМК. Существуют исследования, демонстрирующие возможность снижения количества M1-микроглии, не затрагивая M2-микроглию в окружающей гематому области (Lan et al., 2017). Литературные данные свидетельствуют о том, что конечные продукты гликирования (AGE) могут вызывать неспецифическое нейровоспаление, опосредованное RAGE/Rho/ROCK сигнальным каскадом. При этом подавление RAGE/ROCK не только позволяло избежать поляризации макрофагов по M1 пути, но также способствовало изменению их фенотипа с M1 на M2 (Chen et al., 2017). А также существуют литературные данные, демонстрирующие способность клеток активированной микроглии экспрессировать высокие уровни TLR4,

что приводит к развитию нейровоспаления, инфильтрации лейкоцитами области поражения, продукции молекул провоспалительных цитокинов и хемокинов (Gang et al., 2018; Lin et al., 2012; Sansing et al., 2011). При экспериментальном моделировании ГИ на мышах блокирование TLR4 (блокирующими антителами) снижало гибель нейронов и образование отека, а экспериментальные животные, имеющие нокаут по TLR4, также демонстрировали лучшее восстановление в рамках данной модели (Lin et al., 2012). Более того, введение в область поражения специфического ингибитора TLR4 (ТАК-242) способствовало уменьшению размеров гематомы и ослаблению неврологических нарушений после ВМК (Fang et al., 2014). TLR4 стимулируется экзогенными или эндогенными лигандами через два основных сигнальных пути: MyD88-зависимый путь и TRIF-зависимый сигнальный каскад. MyD88-зависимый сигнальный путь является основным при развитии воспалительной реакции, индуцированной TLR4 (Gang et al., 2018). Внутриклеточный домен TLR4 связывается с С-концом цитозольного адаптерного белка MyD88 или с адаптерным белком, содержащим домен Toll/IR-1 (TRIF), при этом активируя киназу NIK, которая в свою очередь запускает транскрипционный фактор NF-κB (Gang et al., 2018; Kong et al., 2011; Pearson et al., 1999). Нокаут по гену MyD88 экспериментальных мышей, которым моделировался ГИ, приводит к уменьшению в очаге поражения активированной микроглии/макрофагов и, соответственно, к снижению продукции провоспалительных цитокинов (Lin et al., 2012). TNF-α, продуцируемый активируемой микроглией/макрофагами, также играет важную роль в повреждении нейронов после ВМК (Behrouz, 2016; Lambertsen et al., 2005; Rodríguez-Yáñez et al., 2008). Отек мозга, развивающийся после ВМК, значительно уменьшается у мышей с нокаутом по TNF-α. Еще одним подтверждением роли TNF-α в развитии нейровоспаления служило введение в область поражения экспериментальным животным блокирующих антител к TNF-α, что в итоге также приводило к подавлению активации микроглии/макрофагов, снижало отек мозга и способствовало лучшему

восстановлению неврологической функции животных в эксперименте (Hua et al., 2006). Некоторые литературные данные указывают на то, что использование ингибиторов TNF- $\alpha$  хоть и способно уменьшить отек мозга, подавить нейровоспаление и снизить тяжесть неврологических нарушений, но не влияет на объем гематомы (Lei et al., 2013). IL-1 $\beta$ , продуцируемый активированной микроглией/макрофагами, также считается ключевым медиатором нейровоспаления и оказывает повреждающее влияние на ткань мозга после ВМК; некоторые исследования демонстрируют возможный нейропротекторный эффект при подавлении IL-1 $\beta$  (Vimpis et al., 2015; Wu et al., 2010). Подводя итог, можно сказать, что воспаление, опосредованное сигнальным путем от TLR4, приводит к повреждению нервной ткани после ВМК. Поэтому в качестве терапевтических мишеней при ГИ могут быть использованы антагонисты TLR4, некоторые специфические регуляторы сигнальных путей, связанных с TLR4 или ингибиторы провоспалительных факторов. Однако следует отметить, что фагоцитоз, опосредованный микроглией/макрофагами, может быть также полезен для репарации мозговой ткани и удаления гематомы после ВМК (Wang et al., 2005; Zhao et al., 2007). Еще один важный мембранный белок, экспрессируемый на поверхности микроглии/макрофагов это CD36, который относится к классу В скавенджер-рецепторов. Исследование показало, что экспрессия CD36 увеличивалась в перигематомных тканях у мышей после ВМК, в то время как уменьшение размера гематомы проходило хуже у мышей, нокаутированных по CD36 (Fang et al., 2014). Введение экспериментальным животным таких агонистов PPAR $\gamma$ , как пиоглитазон, росиглитазон или 15d-PGJ2, повышало уровни экспрессии CD36 и улучшало рассасывание гематом после ВМК (Flores et al., 2016). Поэтому стимулирование фагоцитоза в очаге кровоизлияния вместе с подавлением опосредованных микроглией/макрофагами воспалительных реакций является интересным терапевтическим направлением.

Также одним из участников нейровоспалительных реакций, запущенных ВМК, является простагландин E2 (PGE2) (Mohan et al., 2012). PGE2 имеет четыре различных подтипа рецепторов (рецепторы сопряженные с G-белками), известных как EP1-EP4. Сигналинг, осуществляемый через рецепторы EP1 и EP3 приводит к токсическим эффектам в нервной ткани, в то время как активация рецептора EP2, опосредует нейропротекторный эффект, так как приводит к снижению экспрессии провоспалительного цитокина амфотерина (HMGB1) (Mohan et al., 2012; Wu et al., 2017). Было показано, что мизопропростол (неселективный агонист рецепторов EP2/EP4) обладает нейропротекторным эффектом в животной модели ГИ (Wu et al., 2015). Синтез PGE2 в ходе развития воспалительного процесса зависит от фермента ЦОГ-2, именно поэтому ингибиторы ЦОГ-2 могут иметь терапевтический потенциал при ВМК. В пилотном исследовании введение селективного ингибитора ЦОГ-2 целекоксиба на острой стадии ВМК приводило к меньшему распространению перигематомного отека, чем в контрольной группе пациентов (Lee et al., 2013). Важно помнить, что чрезмерное подавление иммунных реакций и воспаления после ВМК может также помешать восстановлению нервной ткани, удалению гематомы иммунными клетками, а также увеличить риск развития у пациента сопутствующих инфекционных заболеваний. Таким образом, в целях поиска грамотного терапевтического подхода при ГИ важно регулирование баланса между провоспалительными и противовоспалительными реакциями.



**Рис. 2** Основные механизмы нейровоспаления (активация микроглии/макрофагов)

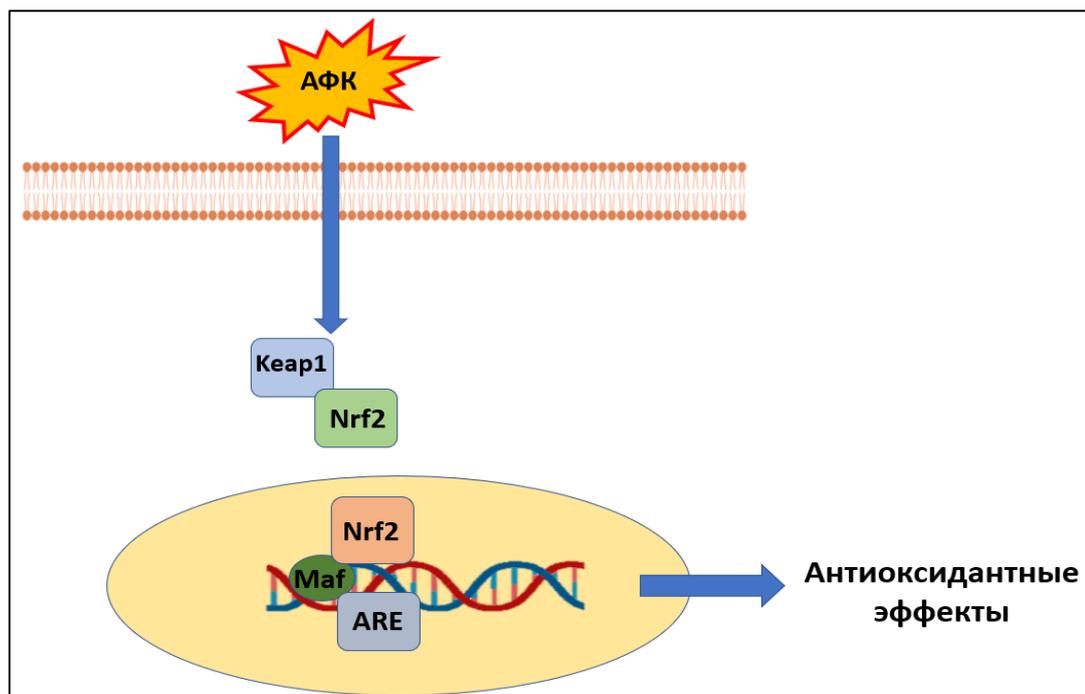
### 2.2.2 Окислительный стресс и глутаматная токсичность

Окислительный стресс (ОС) является важнейшим фактором вторичного повреждения головного мозга после ВМК. Данное состояние достигается путем избыточного образования свободных радикалов, в основном активных форм кислорода (АФК), что приводит к повреждающим эффектам в очаге гематомы и перигематомном пространстве (Aronowski et al., 2011). В физиологических условиях организм полагается на свою антиоксидантную систему для поддержания относительного баланса между синтезом и элиминированием свободных радикалов в клетке. Однако, данный баланс может быть нарушен и, в таком случае, накопившиеся при этом АФК начинают инициировать нарушение функции и гибель клеток (Duan et al., 2016). Кроме того, клетки нервной ткани требовательны к кислороду, а значит

их эндогенный антиоксидантный потенциал ниже, чем у других типов тканей, что делает их более уязвимыми к повреждающему действию АФК. В ходе развития нейровоспаления после ВМК происходит накопление в очаге кровоизлияния и прилежащей мозговой ткани активированных нейтрофилов, которые производят и высвобождают большое количество АФК и оксида азота, а антиоксидантные ферменты не справляются с подобной окислительной нагрузкой, что в итоге приводит к развитию перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран клеток. Помимо интенсификации процессов ПОЛ, нарушающих физические свойства клеточных мембран (их проницаемость), АФК могут вызывать ковалентные модификации белков и нуклеиновых кислот, что в совокупности оказывает существенное повреждающее воздействие на клетки (Gaschler et al., 2017). Продукты распада клеток крови, такие как ионы железа и гем, также могут приводить к повреждению нервной ткани в области кровоизлияния, способствуя образованию большого количества свободных радикалов (Li et al., 2017; Wagner et al., 2003). Был показан нейропротекторный эффект антиоксиданта эдаравона, который снижал повреждающее влияние окислительного стресса на нервную ткань у экспериментальных мышей в модели ишемического инсульта (Lu et al., 2012; Wu et al., 2014). По опубликованным данным эдаравон значительно улучшал показатели NIHSS (шкала инсульта национального института здоровья) у пациентов с ВМК после малоинвазивного хирургического удаления гематомы (Zhao et al., 2014). Хотя нейропротекторная функция эдаравона была показана в некоторых доклинических и клинических исследованиях, но эффективность эдаравона при ВМК все еще остается не подтверждена из-за отсутствия рандомизированных двойных слепых многоцентровых клинических испытаний (Yang et al., 2015).

Согласно данным литературы, транскрипционный фактор Keap1/Nrf2 является основным регулятором антиоксидантной защиты клеток и играет

важную роль в восстановлении нервной ткани как при ишемическом, так и при геморрагическом повреждении (Dang et al., 2012). АФК могут активировать Keap1/Nrf2 путь, что в рамках адаптивного ответа клеток противодействует окислительному стрессу после ВМК. В случае нокаута экспериментальных мышей по гену Nrf2 и моделировании у них ГИ было показано увеличение таких показателей как: объем гематомы, инфильтрация области кровоизлияния лейкоцитами, продукция АФК, повреждение ДНК и ухудшение неврологического статуса животных в сравнении с контрольной группой (без нокаута). Напротив, активация Nrf2 (введением сульфорафана) приводила к уменьшению очага повреждения и уменьшению неврологических дефицитов у животных в эксперименте (Wang et al., 2007; Zhao et al., 2007). Помимо сульфорафана существуют и иные активаторы транскрипционного фактора Nrf2. Так, например, флаваноид изоликвиритигенин также способен ограничить повреждающее действие окислительного стресса и облегчить неврологические дефициты у экспериментальных животных в модели ГИ, благодаря активации Nrf2-опосредованной антиоксидантной системы (Zeng et al., 2017). В другом исследовании было показано, что внутривенное введение экспериментальным мышам никотинамида мононуклеотида в течение 30 минут после постановки модели ГИ, также способствовало значительному уменьшению отека головного мозга, снижению гибели клеток нервной ткани, ограничению нейровоспаления и улучшению неврологического статуса экспериментальных животных (Wei et al., 2017). Механизм антиоксидантного эффекта никотинамида мононуклеотида также основан на активации Nrf2. В рамках того же механизма могут действовать некоторые агонисты PPAR $\gamma$  (Zhao et al., 2015).



**Рис. 3** Схема антиоксидантной защиты при ГИ

Согласно литературным данным, эксайтотоксичность глутамата является одним из важных механизмов, приводящих к вторичному повреждению головного мозга при ВМК. После ВМК происходит масштабное разрушение нервных клеток в очаге кровоизлияния и в перигематомном пространстве, при этом увеличивается высвобождение глутамата, что приводит к его накоплению и активации рецепторов NMDA на постсинаптической мембране нейронов; это способствует увеличению внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (так называемой кальциевой перегрузке нейронов). Митохондрии могут выполнять функцию кальциевых депо клетки. При кальциевой перегрузке нейрона митохондрии начинают аккумулировать ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , закачивая их из цитозоля благодаря митохондриальному кальциевому унипортеру MCU, располагающемуся на внутренней митохондриальной мембране (Abeti et al., 2015). Необходимо заметить, что MCU имеет довольно низкое сродство к  $\text{Ca}^{2+}$ , поэтому концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле должна составлять примерно 5–10 мкМ для подобного механизма транспорта кальция в митохондрии. Таким образом ионы  $\text{Ca}^{2+}$  транспортируются в митохондриальный матрикс нейрона по электрохимическому градиенту. Выход же кальция из матрикса в цитозоль осуществляется благодаря работе

$\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  и  $\text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$  обменников (Nicholls, 2005; Ward et al., 2007). Скорость выхода ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через обменники в условиях высокой цитозольной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  существенно ниже, чем скорость транспорта данных ионов в матрикс митохондрии по MCU, поэтому митохондрии «перегружаются» кальцием, что в определенный момент приводит к открытию высокопроницаемой  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой митохондриальной поры (PTP). Далее происходит закономерное падение трансмембранного потенциала на внутренней митохондриальной мембране, а значит и замедление работы АТФ-синтетазы. Кроме того, открытие PTP приводит к выходу в цитозоль цитохрома С, активации каспаз и запуску апоптоза нейрона. Повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в нейроне также приводит к запуску синтеза нейронального оксида азота и супероксид анион-радикала посредством активации нейрональной синтазы оксида азота и НАДФН оксидазы соответственно (Wang et al., 2019). Данные процессы могут привести к усиленному образованию в нейрональных клетках пероксинитрита. Все три соединения (оксид азота, пероксонитрит и супероксид анион-радикал), по отдельности или в комбинации, способны вызывать повреждение клеточной ДНК и иные процессы, происходящие при окислительном стрессе (Zhang et al., 2022). Также было показано, что продукты окисления (активные формы кислорода и активные формы азота) усиливают высвобождение глутамата из нервных клеток после ВМК за счет увеличения активности каналов, образованных коннексинами и паннексинами (Zhang et al., 2021). Глутамат, высвобождаемый через щелевые контакты, образованные астроглиальным коннексином-43, опосредует гибель нейронов благодаря активации щелевых контактов, образованных паннексином-1 (Orellana et al., 2011). Текущие данные указывают на то, что каналы, образованные паннексином-1 могут активироваться в результате сигнального каскада NMDA рецептора через киназы семейства Src (Weilinger et al., 2016). Эти данные свидетельствуют о порочном круге глутамата, который является важным индуктором кальциевой перегрузки нейрона, синтеза свободных радикалов и разгоняет процессы

окислительного стресса в нервной ткани, а окислительный стресс, в свою очередь, способствует усилению высвобождения глутамата через каналы, образованные коннексинами и паннексинами. Еще один важный механизм, связанный с глутаматным рецептором NMDA, заключается в формировании синаптической пластичности. Белок связывающий рецептор глутамата с цитоскелетом (PSD95) играет важную роль в формировании, дифференцировке, ремоделировании и созревании нейронных синапсов. В рамках одного из исследований предлагалось оценить роль PSD95 в когнитивной дисфункции и повреждении синапсов после ВМК. Взаимодействие комплекса PSD95 с субъединицей рецептора NMDA (NR2B) и нейрональной синтазой оксида азота (nNOS) приводит к образованию сигнального белкового комплекса, опосредующего возбуждающую передачу сигналов. Помимо NR2B-nNOS, PSD95 также может связываться с нейрексином-1 и нейролигином-1 с образованием уже другого комплекса, участвующего в поддержании синаптической функции. В рамках исследования было показано увеличение образования комплекса PSD95-NR2B-nNOS и снижение образования комплекса PSD95 с нейрексином-1 и нейролигином-1 после ВМК, что сопровождалось повышенной гибелью нейронов, процессами нейродегенерации и как следствие поведенческими нарушениями у экспериментальных животных. Ингибитор PSD95 (Tat-NR2B9c) эффективно ингибировал взаимодействие между PSD95 и NR2B-nNOS, а также способствовал взаимодействию PSD95 с нейрексином-1 и нейролигином-1 (Wang et al., 2019). Кроме того, введение в хвостовую вену экспериментальным крысам Tat-NR2B9c значительно уменьшало гибель, дегенерацию нейронов и улучшало когнитивную функцию крыс с ВМК.

Таким образом, воздействие на антиоксидантную систему, снижение окислительного стресса и повреждающего влияния глутамата является одним из возможных терапевтических направлений при ГИ.

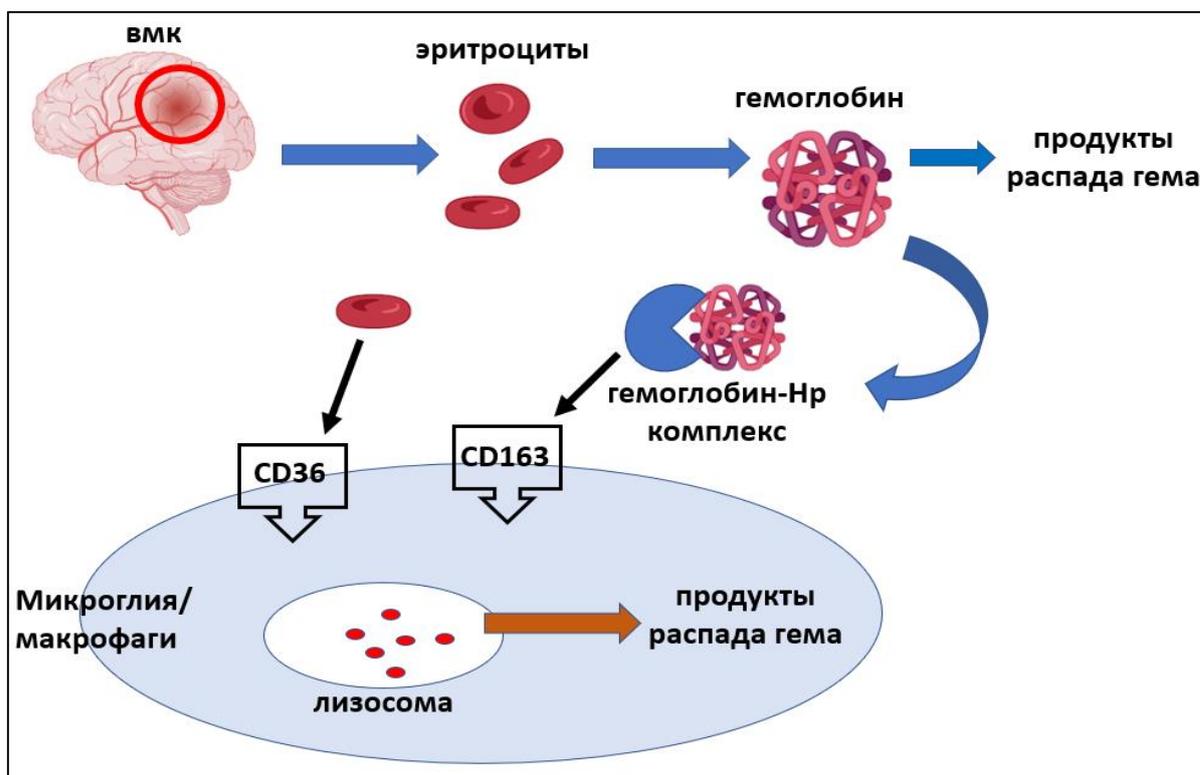
### 2.2.3 Разрушение эритроцитов

Ряд литературных данных указывают на ключевую роль разрушения эритроцитов (высвобождение гемоглобина и железа в очаге кровоизлияния) в повреждении ткани мозга, вызванного ВМК (Wang et al., 2018). Уже через 24 часа после кровоизлияния в мозг большое количество эритроцитов, начинает разрушаться и это приводит к значительному высвобождению гемоглобина в паренхиму головного мозга с последующим распадом гемоглобина на гем и железо (Wagner et al., 2003). Эксперименты показали, что введение лизированных эритроцитов в полосатое тело головного мозга крыс приводит к отеку мозга и неврологическим нарушениям. В том же исследовании было продемонстрировано 14-кратное увеличение экспрессии фермента гемоксигеназы (НО-1), усиление карбонилирования белков (маркер окислительного стресса), а также снижение уровня как Mn-SOD (супероксиддисмутаза), так и CuZn-SOD в полосатом теле после внутримозговой инфузии лизированных эритроцитов, что указывает на развитие окислительного повреждения ткани (Wu et al., 2002). Гемоглобин и продукты его распада также способны вызывать отек мозга и запускать процессы нейровоспаления (активация гемом TLR4, а также индуцируемая гемоглобином сборка гетеродимеров TLR2/TLR4) (Lin et al., 2012; Huang et al., 2002; Wang et al., 2014). Обозначим основные звенья механизма повреждения головного мозга, вызванного разрушением эритроцитов в области кровоизлияния: нейровоспаление, окислительный стресс и отек. Во-первых, высвободившийся гем способствует увеличению экспрессии в клетках активированной микроглии и макрофагах фермента гемоксигеназы-1 (НО-1) (первый и скорость лимитирующий фермент метаболизма гема), что только ускоряет процесс распада гема, приводит к накоплению ионов железа, СО, биливердина, билирубина и может усугубить повреждение ткани мозга (Huang et al., 2002; Zhang et al., 2017). Однако недавние исследования также показали, что индуцированная гемом экспрессия НО-1 в периваскулярных клетках до

ВМК может снизить эффект повреждения гематоэнцефалического барьера после ВМК (Lu et al., 2014). Хотя роль NO-1 при ВМК широко изучалась, но однозначное влияние NO-1 в патогенезе ГИ не определено. Во-вторых, помимо гема в очаге кровоизлияния накапливается существенное количество ионов железа, которые сами по себе могут вызывать повреждение тканей, участвуя в образовании свободных радикалов. Предполагается, что ионы двухвалентного железа могут участвовать в процессах ПОЛ, накоплении липидных АФК, и, как следствие, гибели клеток в результате так называемого ферроптоза (вариант программируемой окислительной клеточной гибели, в основе патогенеза которого лежит железо-зависимое ПОЛ). Было обнаружено, что введение ферростатина-1 (специфического ингибитора ферроптоза) предотвращало гибель нейронов в органотипических культурах, полученных из плоских срезов гиппокампа. А у экспериментальных мышей, получавших ферростатин-1 после моделирования ВМК, наблюдалась заметная нейропротекция и улучшение неврологического статуса (Li et al., 2017). Кроме того, хелатор железа дефероксамина мезилат (DFX) является возможным кандидатом для терапии пациентов с ВМК (Yeatts et al., 2013). DFX может проходить ГЭБ, хелатировать ионы трехвалентного железа, образуя с ними стабильные комплексы и тем самым снижать выработку свободных радикалов. Системное введение DFX уменьшало индуцированный ВМК отек мозга и способствовало снижению неврологических нарушений у экспериментальных крыс (Nakamura et al., 2004; Okauchi et al., 2010). Однако из-за небольшого количества испытаний и малых объёмов выборки в них, недостаточно доказательств, подтверждающих влияние DFX на неврологический исход после ВМК и безопасность его применения (Zeng et al., 2018). Как было описано ранее, гемоглобин высвобождается при распаде эритроцитов в очаге кровоизлияния и опосредует определенные токсические эффекты. Таким образом, нейтрализация гемоглобина может представлять собой важную цель для подавления процессов вторичного повреждения после ВМК. Гаптоглобин (Hr), эндогенный гемоглобин-связывающий белок плазмы крови, который

способен секретироваться также и в нервной ткани олигодендроцитами (Zhao et al., 2011). Гаптоглобин действует как секреторный белок, способный нейтрализовать внеклеточный гемоглобин и играет цитопротекторную роль при ВМК. Взаимодействие комплексов гемоглобин-гаптоглобин с мембранным гликопротеином CD163 (представленным на клетках микроглии и макрофагах) действует как основной путь удаления гемоглобина после ВМК. Также было продемонстрировано на животной модели ВМК повышение уровня CD163-позитивной микроглии и макрофагов (M2c фенотип микроглии, ассоциированный с фагоцитарной активностью) в очаге поражения, что свидетельствует о интенсификации процессов удаления внеклеточного гемоглобина клетками активированной микроглии и макрофагами (Cao et al., 2016). Данные, полученные на животных моделях, показывают, что гаптоглобин защищает нервную ткань при ВМК, поскольку индукция гипогаптоглобинемии в моделях на грызунах приводит к более выраженным неврологическим дефицитам у экспериментальных животных и большему отеку мозга после ВМК (Zhao et al., 2009). В исследовании на животных нокаут по CD163 в мышинной модели внутримозгового кровоизлияния приводил к ранним благоприятным эффектам, но негативными поздними эффектам (Leclerc et al., 2018). Хотя неясно, почему дефицит CD163 изначально полезен в рамках данной модели, но поздние повреждающие эффекты согласуются с ключевой ролью CD163, описанной ранее. Другое исследование показало, что агонист PPAR $\gamma$  монасцин значительно уменьшал объем гематомы и отек головного мозга у экспериментальных животных, предположительно воздействуя именно на CD163-опосредованный путь удаления гемоглобина (Wang et al., 2018). Резюмируя, можно отметить, что подавление токсичности

продуктов распада эритроцитов требует дальнейшего изучения и остаётся важным направлением в лечении пациентов с ВМК.



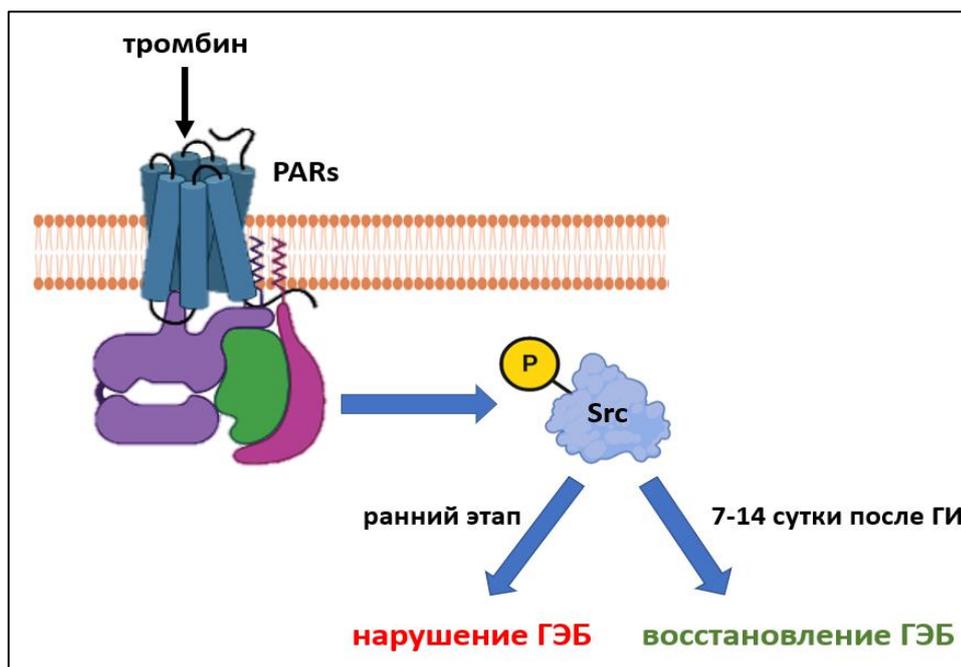
**Рис. 4** Разрушение эритроцитов в очаге кровоизлияния является одним из механизмов вторичного повреждения при ГИ

#### 2.2.4 Тромбин-опосредованная нейротоксичность

Тромбин является важным компонентом каскада свертывания крови и накапливается в очаге повреждения сразу после индукции ВМК (Zheng et al., 2016). Однако тромбин также может участвовать и в повреждении, вызванном ВМК. Повреждающее или защитное действие тромбина зависит от его концентрации (Zhu et al., 2019). Он может оказывать нейропротекторное действие при окислительном стрессе и ишемическом повреждении головного мозга в очень низких концентрациях, в то время как прямое введение в мозг больших доз тромбина вызывает инфильтрацию мозга лейкоцитами, пролиферацию мезенхимных клеток, образование рубцовой ткани и отек мозга, а также судороги (Xi et al., 2003). Эффекты тромбина могут быть как

рецептор не опосредованные (протеазная активность), так и рецептор-опосредованные (активация сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы p44/42). Рецептор-опосредованные эффекты тромбина осуществляются благодаря трем типам рецепторов активируемых протеазами (PARs): PAR-1, PAR-3 и PAR-4. Рецепторы, активируемые протеазами, особенно PAR-1, тесно ассоциированы с повреждением головного мозга после ВМК (Cheng et al., 2014; Jingxia et al., 2004). Тромбин в результате взаимодействия со своими рецепторами PARs активирует тирозинкиназу Src, что может способствовать разрушению ГЭБ и формированию отека (Liu et al., 2010). Из вышеизложенного следует, что ингибирование PAR-1 каскада или киназы Src является потенциально одним из способов снижения вторичного повреждения после ВМК. Было показано, что ингибитор тромбина, аргатробан, проявляет значительный нейропротекторный эффект и подавляет прогрессирование патологического состояния после ВМК, предотвращая цитотоксичность тромбина *in vitro* (Ohnishi et al., 2007). Кроме того, индуцированное тромбином повреждение ГЭБ после ВМК может быть скорректировано однократным введением гирудина (прямой ингибитор тромбина) (Liu et al., 2010). Однако ингибиторы тромбина не могут быть гарантированной формой лечения, поскольку они напрямую влияют на процессы гемостаза. Очевидно, что баланс между гемостатическим и повреждающим (нейротоксическим) действиями тромбина, зависит от таких факторов как локализация (внутри- или внесосудистое) и способа действия (активация рецептора или протеазная ферментативная активность) (Cheng et al., 2014). Поэтому крайне важно блокировать нейротоксические эффекты тромбина, не подавляя его основной гемостатический эффект. Исследование показало, что однократное введение ингибитора тирозинкиназы Src PP2 способно приводить к уменьшению отека головного мозга после ВМК, не влияя на процессы свертывания крови (Liu et al., 2010) (Liu et al., 2011). Другое исследование показало, что системное введение PP2 или внутрижелудочковая инъекция siRNA-Fun (члена семейства киназ семейства Src), предотвращает

потерю нейронов гиппокампа и улучшает когнитивные функции после внутрижелудочкового кровоизлияния (Liu et al., 2017). Однако некоторые представители семейства Src-киназ могут также способствовать восстановлению ГЭБ и уменьшению отека мозга на стадии восстановления (7-14 дней) после ВМК (Liu et al., 2011). Необходимы дополнительные исследования, чтобы выяснить, какие конкретные представители семейства Src-киназ могут опосредовать индуцированные ВМК повреждения головного мозга.



**Рис. 5** Механизм вторичного повреждения нервной ткани при ГИ, опосредованный тромбином

Резюмируя подчеркнем, что патофизиологические механизмы повреждения мозговой ткани после ВМК достаточно сложные, и включают в себя как первичные повреждающие механизмы (массо-объемные эффекты гематомы, сдавление прилегающей мозговой ткани, повышение ВЧД и отек), так и вторичные повреждающие механизмы: нейровоспаление (как следствие инфильтрации очага кровоизлияния лейкоцитами и активации микроглии), глутаматная эксайтотоксичность, окислительный стресс, токсические эффекты гема и других продуктов распада гемоглобина, а также токсичность, опосредованная тромбином. Таким образом, многоцелевая нейропротекторная

терапия, воздействующая одновременно на несколько патофизиологических контуров при ВМК, вероятно, смогла бы стать эффективной терапией пациентов, перенесших ГИ.

## 2.3 Мезенхимные стромальные клетки

### 2.3.1 Общая характеристика МСК

Теория о наличии клеток, вовлеченных в процесс регенерации была впервые выдвинута в конце девятнадцатого века Конхеймом, который считал, что фибробласты, происходящие из костного мозга, участвуют в заживлении ран во всем организме (Cohnheim, Beneke 1914). В 60-ые годы двадцатого века мезенхимные стволовые клетки (МСК) были открыты научным коллективом под руководством А. Я. Фриденштейна в костном мозге мыши (Friedenstein et al., 1966). В конце 1980-х – начале 1990-х годов была изучена гетерогенная популяция МСК, выделенная из КМ, и было обнаружено, что данные клетки связаны с развитием различных мезенхимных тканей, а также выявлены первые поверхностные антигены, экспрессируемые МСК (CD73 и CD105) (Haynesworth et al., 1992). Спустя годы МСК были обнаружены, выделены и охарактеризованы также из других тканей взрослого человека, включая жировую ткань, дерму, синовиальную жидкость, надкостницу, пуповинную кровь, плаценту и амниотическую жидкость. В ряде исследований проводилась оценка содержания МСК в различных тканях, некоторые из этих данных представлены в таблице 1 (Astori et al., 2007; Jones et al., 2008; Kern et al., 2006; Sessarego et al., 2008; Wexler et al., 2003; Zhang et al., 2011).

**Таблица 1. Концентрации и частота МСК (в КОЕ-ф) в различных тканях человека**

Ткань, из которой проводилось выделение МСК	Концентрация МСК в ткани (КОЕ-ф/мл)	Частота МСК в ткани (КОЕ-ф/10 <sup>6</sup> клеток)
аспират КМ	109 – 664	10 – 83
<b>жировая ткань</b>	2058 – 9650	205 – 51000
дерма	–	74000 – 157000
пуповинная кровь	0 – 0,06	0 – 0,02
синовиальная жидкость	4 – 14	2 – 250
амниотическая жидкость	3 – 4	9 – 11

Литературные данные свидетельствуют о периваскулярном расположении МСК во многих органах (Crisan et al., 2008). Кроме того, существует прямая корреляция между частотой нахождения МСК в ткани и плотностью расположения кровеносных сосудов в сосудисто-стромальном компоненте органа (da Silva Meirelles et al., 2009).

Согласно определению, введенному Международным обществом клеточной терапии, существуют некоторые минимальные критерии для идентификации популяций МСК, такие как адгезия к пластику в стандартных условиях культивирования; положительная экспрессия специфических маркеров, таких как CD73, CD90 и CD105, и отрицательная экспрессия гемопоэтических маркеров, таких как CD34, CD45, HLA-DR, CD14 или CD11B, и CD79a или CD19; а также дифференцировка *in vitro*, по крайней мере, в остеобласты, адипоциты и хондробласты (Ефименко и др., 2010; Domínicí et al., 2006). Также некоторые авторы сообщают о способности МСК дифференцироваться *in vitro* или *in vivo* в клетки:

- 1) мезодермального происхождения (перициты, эндотелиоциты, фибробласты, кардиомиоциты, ГМК, клетки стромы костного мозга, макрофаги);
- 2) энтодермального происхождения (гепатоциты);
- 3) эктодермального происхождения (олигодендроциты, астроциты, шванновские клетки).

Множество литературных данных указывает на способность МСК к секреции широкого спектра факторов: нейротрофические факторы (BDNF, GDNF, NGF), ангиогенные факторы (VEGF, HGF, PlGF, PDGF, ангиопоэтин, лептин), антиангиогенные факторы (PAI-I, тромбоспондин-1, эндостатин), противовоспалительные факторы (IL-10, IL-13, MIF, TGF $\beta$ ), провоспалительные факторы (IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , простагландин-E2), хемокины (CCL1, CCL2, CCL5, CCL8, CCL11, CCL15, CCL16, CCL18, CX3CL1, CXCL2, CXCL5 и т.д.), факторы роста (Г-КСФ, М-КСФ, ГМ-КСФ,

FGF-2, IGF-I, EGF, KGF, SDF-1) и матриксные металлопротеиназы (ММП), белки межклеточного матрикса и белки, участвующие в клеточной адгезии (коллагены I, III-VI типов, ламинин, фибронектин, витронектин, тенасцин кадгерин-2,-11,-13), различные микроРНК и другие молекулы, опосредующие различные физиологические эффекты секрета МСК (Ефименко и др., 2010; Nombela-Arrieta et al., 2011; Skalnikova, 2013).

Длительное культивирование (для МСК, выделенных из костного мозга и МСК из жировой ткани более 20 и 30 пассажей, соответственно) снижает их пролиферативный и дифференцировочный потенциал (Efimenko et al., 2011; Gimble et al., 2007; Izadpanah et al., 2008). Поэтому зачастую для достижения максимального регенеративного эффекта от трансплантации данных клеток используют МСК ранних пассажей (2–3 пассаж) достигшие 70–80% конфлюентного монослоя. Методы выделения из тканей, культивирования и индукции МСК усовершенствовались, и теперь почти все типы МСК могут быть дифференцированы в клетки указанных выше тканей (Salgado et al., 2013).

Потенциал разнонаправленной дифференцировки является одной из наиболее важных характеристик МСК. Кроме того, различные тканевые источники влияют на склонность к дифференцировке и способность МСК к пролиферации. Появляется все больше публикаций, посвященных гетерогенности МСК (Andrzejewska et al., 2019). Транскриптом, протеомом, иммунофенотипом и иммуномодулирующей активностью различных типов МСК различаются и это указывает на то, что МСК обладают уникальным потенциалом дифференцировки. Являясь важным источником МСК для тканевой инженерии, МСК костного мозга демонстрируют превосходную способность к остеогенезу и хондрогенезу в соответствии со стандартными протоколами дифференцировки, а МСК синовиального происхождения демонстрируют более значительный пролиферативный и хондрогенный потенциал, чем МСК жирового происхождения (Lin et al., 2019; Mochizuki et

al., 2006). Исследователи должны проводить отбор необходимых типов МСК в соответствии с конкретной целью. Быстрое развитие молекулярной биологии и методов трансплантации способствовало применению МСК в том числе и для регенерации в нервной ткани. Потенциал дифференцировки МСК в клетки нервной ткани был оценен в ряде экспериментов. Так, например, нестин-позитивные нейросферы генерировали из МСК костного мозга (МСК-КМ) и жировой ткани (МСК-ЖТ) (Chung et al., 2013). Нейрональные клетки дифференцировались из нейросфер, происходящих из обеих этих тканей. Данные результаты подчеркивают, что как МСК-КМ, так и МСК-ЖТ могут быть дифференцированы в нейросферы и нейроноподобные клетки, и, следовательно, эти клетки являются наиболее подходящими кандидатами для клеточной трансплантации при различных неврологических нарушениях (Chung et al., 2013). В другом исследовании было продемонстрировано, что МСК-КМ способны дифференцироваться в шванноподобные клетки и способны поддерживать регенерацию периферических нервов (Ladak et al., 2011). Данный коллектив авторов подтвердил, что шванноподобные клетки, полученные из МСК-КМ, способны оказывать такие же нейротрофические эффекты, как и обычные шванновские клетки, приводя к росту нейритов/аксонов. Другие авторы продемонстрировали, что, при использовании особого протокола дифференцировки с добавлением в среду культивирования смеси глиальных факторов роста (таких как GGF-2, bFGF, PDGF и форсколина) МСК-ЖТ также приобретали способность к дифференцировке в фенотип, аналогичный шванновским клеткам и экспрессировали маркеры глиальных клеток (Stro-1, S100, p75 и нестин) (Kingham et al., 2007). Важно понимать, что для эффективной трансляции в клиническую практику получение МСК из костного мозга является довольно инвазивным и часто болезненным методом. Таким образом, при одинаковом регенеративном потенциале в отношении нервной ткани преимущество будет отдаваться клеткам, выделенным из легкодоступного источника в достаточном количестве. И сам факт того, что неадипоцитарная стромальная

фракция жировой ткани содержит обильную популяцию мультипотентных стволовых клеток, которые можно легко собрать в больших количествах с помощью минимально инвазивных хирургических методов, создает существенное преимущество для использования в качестве терапевтического инструмента именно данные МСК. Так, например, была продемонстрирована способность немодифицированных МСК-ЖТ человека приводить к восстановлению функции сердца в модели хронического инфаркта миокарда у крыс (Cai et al., 2009). При инфаркте миокарда происходит не только повреждение клеток миокарда, но и повреждение (денервация) сердечного нерва (Barber et al., 1985). В рамках исследования было показано, что эффект МСК-ЖТ в крысиной экспериментальной модели инфаркта миокарда связан как со стимуляцией процессов ангиогенеза, так и с процессами прорастания нервов в регионе имплантации клеток. Таким образом трансплантация мМСК-ЖТ приводила к росту сосудов и нервных отростков в ишемизированном миокарде, стимулируя регенерацию. Также существует немало литературных данных, подтверждающих регенеративный потенциал МСК-ЖТ в отношении поврежденных периферических нервов. Так было показано, что трансплантация МСК-ЖТ индуцирует восстановление периферических нервов и активизирует рост нервных отростков *in vivo* на мышинной экспериментальной модели травмы периферического нерва (Lopatina et al., 2011). Также было проведено исследование профиля экспрессии генов в мышинных (мМСК-ЖТ) и МСК-ЖТ человека, которое показало, что данные клетки продуцируют широкий спектр нейротрофических факторов и компоненты миелиновой оболочки, которые необходимы для роста нервных отростков и их миелинизации (культивирование клеток в условиях гипоксии и в среде для индукции нейральной дифференцировки повышали экспрессию нейротрофинов в клетках МСК-ЖТ). Важно подчеркнуть, что обозначенный эффект МСК-ЖТ зависел от секреции BDNF (что было доказано экспериментально имплантацией в той же модели мМСК-ЖТ с нейтрализующими антителами к BDNF) (Lopatina et al., 2011). Кроме того,

трансплантация мМСК-ЖТ стимулировала функциональное восстановление как разрушенных сенсорных, так и двигательных нейронов, что указывало на универсальность показанных эффектов для всех нервных волокон, а не избирательность в отношении определенного типа нейронов.

Что касается неврологических нарушений в ЦНС, то они зачастую необратимы из-за ограниченного регенеративного потенциала нервной ткани взрослого организма. В свое время нейральные стволовые клетки (НСК) казались оптимальным выбором для терапевтического вмешательства при заболеваниях ЦНС; однако на сегодняшний день в качестве основных терапевтических механизмов в большинстве исследований сообщается о трофических и иммуномодулирующих эффектах, а не о непосредственном замещении поврежденных нейронов. Применение НСК при патологиях в ЦНС указывает на то, что долгосрочное выживание и интеграция в нервную ткань хозяина не наблюдаются, а терапевтические эффекты могут быть связаны в первую очередь с их паракринной активностью (Doerrner et al., 2014; Huang, Zhang 2019). Получив эти доказательства, основное внимание научного сообщества переключилось на МСК, известные своим паракринным и иммуномодулирующим потенциалом. Лечение с применением МСК продемонстрировало положительный эффект на различных животных моделях неврологических заболеваний в ЦНС. В то же время был достигнут значительный прогресс в разработке клинически приемлемых протоколов их доставки и мониторинга. На сегодняшний день зарегистрировано более сотни клинических исследований по применению МСК для лечения таких неврологических заболеваний в ЦНС как инсульт, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, болезнь Гентингтона, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, а также повреждение спинного мозга.

### ***2.3.2 Исследование МСК при инсульте***

Среди различных типов стволовых клеток МСК, по-видимому, представляют наилучшие перспективы для лечения инсульта. МСК были широко исследованы в качестве терапии на различных животных моделях инсульта из-за их нейропротекторной и иммуномодулирующей функции. В острую фазу инсульта, помимо гибели нейронов, усиливается нейровоспаление, которое является важным фактором вторичного повреждения нервной ткани в очаге повреждения. Высвобождение нейропротекторных факторов и иммуномодулирующая способность МСК оказывают положительное влияние на ограничение области повреждения нервной ткани.

МСК можно вводить внутривенным и внутриартериальным путями или прямой инъекцией в мозг. Было показано, что внутривенное введение иммортализованных МСК человека через 12 часов после индукции транзиторной окклюзии СМА (средней мозговой артерии) у крыс приводит к уменьшению объема инфаркта мозга и улучшению поведенческих показателей экспериментальных животных (Honma et al., 2006). Кроме того, было продемонстрировано, что введенные внутривенно МСК достигали зоны поражения (на что указывает GFP флуоресценция модифицированных клеток). Также был продемонстрирован терапевтический эффект внутривенной инфузии МСК человека крысам через 3 ч после моделирования церебральной ишемии, вызванной 7-минутной остановкой сердца. Внутривенное введение чМСК при этом приводило к увеличению уровня BDNF в гиппокампе (подтвержденное методом ИФА), уменьшению процессов апоптоза, увеличению выживаемости нейронов в гиппокампе и улучшению когнитивных функций у крыс с церебральной ишемией (Zheng et al., 2010). Интрацеребральная трансплантация является целенаправленным методом доставки стволовых клеток в пораженный мозг в отличие от внутривенной доставкой, но клинически менее релевантна в связи с высокой инвазивностью

процедуры (Guzman et al., 2008; Jin et al., 2005). Нет сомнений в том, что внутривенное введение клеток менее инвазивно и относительно просто, однако внутриартериальная доставка МСК оказалась более эффективной так как позволяла решить основную проблему внутривенной трансплантации, а именно то что трансплантированные клетки проходят весь системный кровоток и систему легочного кровообращения и в итоге большая часть трансплантированных внутривенным путем клеток остается в периферических органах и лишь немногие клетки достигают головного мозга (Guzman et al., 2008; Shinozuka et al., 2013). Ряд исследований показывают, что внутриартериальное введение МСК может вызывать функциональное восстановление у животных с ишемическим инсультом (Mitkari et al., 2013; Shen et al., 2006; Shen et al., 2007; Walczak et al., 2008). В настоящее время проведено множество исследований по лечению ВМК на экспериментальных моделях грызунов трансплантацией МСК. Большое количество доказательств указывает на то, что трансплантация МСК является перспективным методом восстановления мозговой ткани после ВМК (Ma et al., 2015; Hu et al., 2016; Zheng et al., 2018). Чтобы исследовать распределение МСК в рамках данной модели, МСК, меченные BrdU (синтетический нуклеозид), доставляли в головной мозг через сонную артерию (СА), шейную вену (ШВ) или боковой желудочек мозга (ЛЖ) соответственно на 1, 3, 5 и 7 дни после ГИ (Zhang et al., 2006). Меченные BrdU МСК были обнаружены в головном мозге в группах с введением в СА и ЛЖ. Большинство меченых МСК мигрировали в ипсилатеральную зону коры, в очаг кровоизлияния и гиппокампа. Кроме того, гистологический анализ показал, что МСК дифференцировались в нейроны в гиппокампе, тогда как вокруг очага поражения МСК дифференцировались в нейроны и астроциты. В ипсилатеральной коре МСК могли дифференцироваться в нейроны, астроциты и олигодендроциты. Важно отметить, что МСК после трансплантации проявляют способность к хоумингу, а именно способны адресно направляться в очаг воспаления. В ряде работ было показано, что в зонах пограничной ишемии в клетках повышается

экспрессия факторов роста VEGF и SDF-1, что может способствовать хоумингу трансплантированных МСК в очаг воспаления (Huang et al., 2009). В совокупности эти результаты показали, что функциональное улучшение неврологического статуса экспериментальных животных при различных способах введения МСК в модели ГИ, вероятно, было связано не только с их секреторной активностью, но и с их способностью к хоумингу и дифференцировке в соответствующие типы клеток. Молекулярные механизмы, лежащие в основе нейропротекции, опосредованной МСК, частично объясняются трофическими свойствами МСК, которые могут секретировать нейротрофические факторы и другие хемокины, способствующие пролиферации и дифференцировке трансплантированных или эндогенных стволовых клеток (Baker et al., 2019; Murphy et al., 2013). Исследования показали, что МСК костного мозга, доставляемые по хвостовой вене, повышали экспрессию нейротрофического фактора BDNF в головном мозге, который является важнейшим фактором роста и дифференцировки для нервной ткани в ЦНС (Wang et al., 2012). Нокаут BDNF в МСК существенно снижал эффективность лечения трансплантированными клетками при внутрижелудочковом кровоизлиянии (ВЖК) (Ahn et al., 2017). Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), тесно связанный с ангиогенезом, также значительно повышался в тканях головного мозга после моделирования ВМК и введения МСК (Zhou et al., 2016). Глиальный нейротрофический фактор (GDNF), секретируемый МСК, также является важным нейротрофическим фактором и фактором нейропротекции при ВМК. Повышение экспрессии GDNF клетками МСК может значительно усилить нейропротекцию в экспериментальной модели ВМК (Deng et al., 2019; Yang, 2011). А введение МСК, предварительно подвергшихся воздействию гипоксических условий, может значительно улучшить восстановление неврологических функций при патологиях в ЦНС, что вероятно связано с повышением секреции данными клетками таких факторов роста, как GDNF, VEGF и BDNF (Efimenko et al., 2011; Sun et al., 2015). Первичное и вторичное повреждение нервной ткани

после ВМК чаще всего развивается в области гематомы и перигематомном пространстве. Однако после локального внутримозгового введения МСК большинство клеток погибало, отчасти из-за отсутствия внеклеточного матрикса. Внутримозговое введение МСК, поддерживаемых в среде обогащенной тромбоцитами плазмы, способно оптимизировать этот тип клеточной терапии. Подобный технологический ход значительно увеличивал выживаемость, биологическую активность вводимых клеток и их интеграцию в поврежденную ткань (Vaquero et al., 2013).

Хотя возможные механизмы восстановления нервной ткани при введении МСК в модели ВМК до сих пор в значительной степени не определены, по-видимому, они не ограничиваются дифференцировкой, ремоделированием нервной ткани в очаге поражения и нейропротекторным действием основных ростовых факторов, присутствующих в секрете данных клеток (GDNF, VEGF и BDNF). Фактически, все механизмы, участвующие в регенерации тканей, такие как нейрогенез, ангиогенез, а также модуляция воспалительных процессов были связаны с эффектом трансплантации МСК при ВМК (Chen et al., 2015; Kim et al., 2015; Kuramoto et al., 2019; Liu et al., 2019; Xie et al., 2016). Важно помнить, что одним из важнейших факторов вторичного повреждения мозговой ткани при ВМК является нейровоспаление, которое включает в себя активацию микроглии, инфильтрацию очага поражения лейкоцитами, нарушение ГЭБ, отек мозга с последующим апоптозом клеток глии и нейронов. Было показано, что введение МСК способствовало снижению отека головного мозга, а также приводило к снижению уровней мРНК медиаторов воспаления (например, IL-1b, IL-2, IL-4, ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ ) (Bao et al., 2013). Более того, введение МСК, полученных из пуповины, статистически значимо усиливало ангиогенез и снижало активацию микроглии, а также инфильтрацию лейкоцитами очага поражения через 3 дня после ВМК в сравнении с контрольной группой. В других работах было продемонстрировано, что помимо подавления процессов воспаления,

трансплантация МСК в очаг поражения, приводит также к снижению экспрессии белка аквапорина-4 (AQP4), что может снизить отек головного мозга при ВМК (Zhang et al., 2019). Еще одним механизмом снижения воспаления трансплантированными МСК может быть подавление экспрессии индуцируемой NO синтазы (Ding et al., 2017). Кроме того, секретом МСК содержит инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1), который способен влиять на поляризацию клеток микроглии в M2 фенотип, что также является возможным механизмом улучшения прогноза при ГИ (Chen et al., 2019; Sun et al., 2020). В совокупности все эти исследования показали, что противовоспалительное действие МСК, осуществляемое за счет паракринных факторов, является важнейшим механизмом их участия в процессах регенерации нервной ткани после ВМК.

Также у крыс с моделированием ВМК, которым вводили МСК-ЖТ, было обнаружено значительное снижение отека мозга и процессов апоптоза в нервной ткани, что приводило к лучшей регенерации после ГИ (Kim et al., 2007). Литературные данные свидетельствуют о том, что трансплантация МСК улучшала целостность ГЭБ после ВМК, что могло быть связано с повышенной экспрессией белка гена 6, индуцируемого фактором некроза опухоли  $\alpha$  (TSG-6) и белков, образующих плотные контакты (клаудин-5 и окклюдин-1) (Chen et al., 2015) (Choi et al., 2018). Поскольку артериальная гипертензия (АГ) является наиболее частой клинической причиной кровоизлияния в мозг, была создана экспериментальная модель спонтанной АГ для оценки долгосрочных нейропротекторных эффектов клеточной терапии МСК при ВМК, что имело большое значение для доклинических исследований. Было продемонстрировано, что трансплантация МСК может снизить проницаемость ГЭБ и улучшить неврологическую функцию экспериментальных животных после ВМК, являющихся следствием АГ (Wang et al., 2015). Что касается способов введения клеток МСК после моделирования ГИ, то как инъекция непосредственно в очаг поражения (внутри мозговое введение), так и введение

в системный кровоток (внутривенное и внутриартериальное введение), имеют ряд недостатков, упомянутых ранее. Таким образом потенциально интересным способом доставки МСК оказался новый способ интраназального введения, продемонстрированный на мышинной модели ГИ (Sun et al., 2015). В рамках данного исследования было показано, что клетки МСК, выделенные из КМ и preconditionированные в гипоксических условиях при интраназальном методе доставки мигрировали в перигематомную область и обеспечивали повышение в очаге поражения факторов роста BDNF, GDNF и VEGF. Это опосредовало нейропротекторный эффект и лучшее восстановление неврологических функций у мышей в экспериментальной модели ГИ. Некоторые примеры оценки на животных экспериментальных моделях ГИ клеточной терапии МСК приведены в таблице 2.

**Таблица 2. Примеры оценки клеточной терапии МСК на животных экспериментальных моделях ГИ**

Объект	Модель	Количество клеток	Способ введения	Результат (кратко)	Ссылка на источник
крыса	Введение коллагеназы	$2 \times 10^6$	в/а, в/в, в/жел.	В головном мозге дифференцировались в нейроны, астроциты и олигодендроциты; Двигательная функция конечностей и поведенческие показатели в группе с введением в/а и в/жел. в сравнении с контр. группой	(Zhang et al., 2006)
крыса	Введение коллагеназы	$2 \times 10^6$	в/мозг.	Усиление эндогенного нейрогенеза и дифференцировки; Снижены неврологические дефициты	(Otero et al., 2010)
крыса	Введение аутологичной крови	$3 \times 10^6$ $5 \times 10^6$ $8 \times 10^6$	в/в	Усиление нейрогенеза; Уменьшение очага повреждения. Снижены неврологические дефициты	(Seyfried et al., 2006)

крыса	Введение коллагеназы	$1 \times 10^6$	в/в	Снижение апоптоза, повышение экспрессии G-CSF и BDNF; Сокращение объема кровоизлияния и снижены неврологические дефициты	(Wang et al., 2012)
крыса	Введение коллагеназы	$5 \times 10^5$	в/мозг.	Снижение апоптоза и инфильтрации лейкоцитами; Усиление эндогенного нейрогенеза, ангиогенеза, повышение экспрессии BDNF и VEGF; снижены неврологические дефициты	(Zhou et al., 2016)
крыса	Введение коллагеназы	$5 \times 10^6$	в/в	Снижение отека мозга и лейкоцитарной инфильтрации, а также подавление активации микроглии и уровня провоспалительных цитокинов, сокращение проницаемости ГЭБ. Снижены неврологические дефициты	(Chen et al., 2015)
крыса	Введение коллагеназы	$2 \times 10^4$	в/мозг.	Усиление ангиогенеза, противовоспалительное действие; Снижение апоптоза, объема повреждения, и показателя неврологических дефицитов	(Liao et al., 2009)
мышь	Введение коллагеназы	$1 \times 10^6$	в/в	Подавление воспаления; Улучшение неврологического статуса	(Kuramoto et al., 2019)
мышь	Введение коллагеназы	$3 \times 10^5$ $4 \times 10^5$ $10 \times 10^5$	в/мозг.	Снижение апоптоза, отека мозга; уменьшение экспрессии AQP4 и провоспалительных факторов; Улучшение неврологического статуса	(Zhang et al., 2019)

свинья	Повреждение коры ГМ	Внеклеточные везикулы МСК	в/в	Ускорение восстановления; Улучшение неврологического статуса	(Williams et al., 2019)
обезьяна	Введение аутологичной крови	1–5 x10 <sup>6</sup>	в/мозг.	При ранней терапии больше представительство трансплантированных клеток в перигематомной области и лучше результаты лечения по сравнению с более поздней группой лечения МСК; Увеличение ангиогенеза и снижение неврологических дефицитов	(Feng et al., 2011)

В связи с тем, что методы клеточной терапии мезенхимными стволовыми клетками были тщательно изучены на животных моделях ГИ и подтверждены как эффективная терапевтическая стратегия, то были проведены и клинические испытания на пациентах с ВМК. Первым клиническим применением МСК в рамках терапии ГИ стал клинический случай двух пациентов, перенесших ВМК, после чего они наблюдались в течение 1 года (Al Fauzi et al., 2016). Пациентам внутривенно вводили МСК (20 x 10<sup>6</sup> клеток/2,5 мл) трижды с интервалом в 1 месяц с использованием резервуара Оммайя. Оценки по шкале инсульта Национального института здоровья (NIHSS) у двух пациентов показали, что их функциональное состояние явно улучшилось. В плацебо-контролируемом исследовании также было обнаружено, что двукратное внутривенное введение МСК (2 x 10<sup>6</sup> клеток/3 мл) с интервалом в 1 месяц может значительно облегчить реабилитацию и клинический прогноз у пациентов с ВМК и тяжелой инвалидностью (Tsang et al., 2017).

Из-за механического сдавления ткани головного мозга гематомой эвакуация сгустка крови была широко используемым хирургическим методом в клинике ВМК. Поэтому комбинированная терапия малоинвазивным

удалением гематомы с последующей трансплантацией МСК рассматривалась как перспективный метод лечения при ВМК. По сравнению с хирургическим лечением, такая комбинация значительно уменьшила отек головного мозга и повышала уровень BDNF, NGF и уровень предшественников эндотелиальных клеток в области поражения (Zhang, 2016). В медицинском отчете о пациентке с АГ в анамнезе комбинация клеточной терапии с малоинвазивным хирургическим вмешательством демонстрировала улучшение неврологического статуса пациентки, что коррелировало с данными доклинических испытаний (Zahra et al., 2020; Zhang et al., 2015). Однако в случае комбинированной терапии наблюдались расхождения в отношении прогноза пациента в случаях различных источников выделения трансплантированных аутологичных МСК, что может быть связано с различиями в выживаемости, потенциале пролиферации и нейрогенной эффективности тестируемых клеточных линий. Ретроспективный анализ (5 лет наблюдения) показал, что пациенты, получавшие клеточную терапию МСК, выделенных из пуповины, в группе комбинированной терапии продемонстрировали лучшие результаты в функциональном восстановлении после ГИ, чем группа с комбинированной терапией и применением МСК-КМ (Chang et al., 2016). В целом, трансплантация аутологичных МСК представляет собой эффективное средство клеточной терапии, которое может быть внедрено в клиническую практику лечения пациентов с ВМК, после дальнейших более масштабных клинических испытаний.

### ***2.3.3 Ограничения клеточной терапии МСК***

Хотя имеется достаточно много доклинических и клинических исследований, изучающих возможность применения МСК, безопасность данной клеточной терапии остается все еще актуальным вопросом. Не стоит забывать, что при внутрисосудистом введении клеток далеко не все из них оказываются в мозговой ткани (Lee et al., 2009; Pendharkar et al., 2010). Одной из важных проблем, связанных с трансвакулярной трансплантацией клеток, является судьба клеточной популяции, не занимающей поврежденную область. Основными рисками при трансплантации МСК пациенту являются потенциальная онкогенность и вероятность развития фиброза. Онкогенность является одним из наиболее серьезных факторов риска. С одной стороны, МСК обладают способностью развиваться в опухоли, и некоторые исследования показали, что клетки саркомы Юинга происходят из МСК (Lin et al., 2010). Кроме того, через четыре года после трансплантации стволовых клеток пациенту с атаксией-телеангиэктазией был зафиксирован случай глиомы, и было показано, что опухолевые клетки происходят из трансплантатов (Amariglio et al., 2009). С другой стороны, МСК могут способствовать развитию существующих опухолей. Некоторые цитокины и факторы роста продуцируемые МСК могут непосредственно воздействовать на поверхностные рецепторы опухолевых клеток, тем самым регулируя рост опухоли. Иммуносупрессорная способность МСК также способна привести к росту опухоли и ее метастазированию (Karnoub et al., 2007). Кроме того, МСК обладают проангиогенными эффектами, что также негативно в контексте развития опухоли. Помимо процессов регенерации в тканях, МСК теоретически могут дифференцироваться в миофибробласты и вызывать развитие фиброза (Pirova et al., 2010). Но последние исследования продемонстрировали способность компонентов секрета МСК (внеклеточных везикул), наоборот, подавлять фиброз в тканях, предотвращая дифференцировку фибробластов в миофибробласты, а также индуцировать

дифференцировку последних путем прямого переноса специфических микроРНК (Basalova et al., 2020). Чтобы улучшить терапевтический эффект МСК и снизить потенциальные риски, необходимо установление строгих правил доклинического тестирования биобезопасности. К счастью, согласно оценке клинических испытаний терапии МСК, серьезные нежелательные явления были крайне редки (Lalu et al., 2010). Однако эти данные лишь доказывают, что МСК хорошо переносятся и безопасны в краткосрочной перспективе, но необходимы более длительные и более масштабные контролируемые клинические испытания для определения безопасности МСК в отсроченном периоде.

#### ***2.3.4 Бесклеточная терапия на основе МСК***

Важно упомянуть, что большую часть своего регенеративного потенциала МСК реализуют за счет секреции факторов, являющихся паракринными регуляторами процессов регенерации и репарации в поврежденных тканях. Этот факт дает возможность использовать компоненты секрета данных клеток в терапевтических целях (переход к бесклеточной терапии). Помимо секреции отдельных паракринных факторов, МСК могут секретировать внеклеточные везикулы (ВВ), преимущественно экзосомы, состав которых также меняется в зависимости от внешних сигналов, получаемых клеткой (Basalova et al., 2020; Lopatina et al., 2014). Значение этого механизма клеточной коммуникации имеет важное значение, поскольку МСК могут передавать молекулы различного состава, включая белки, липиды и нуклеиновые кислоты, такие как мРНК и регуляторные некодирующие РНК в составе ВВ к клеткам-мишеням (Basalova et al., 2020; Efimenko et al., 2016; Yáñez-Mó et al., 2015; Kalinina et al., 2015). ВВ, секретлируемые МСК, содержат большое количество микроРНК, способных ингибировать трансляцию мРНК в клетках-мишенях как *in vitro*, так и *in vivo* (Friedman et al., 2009; Wahid et al.,

2010). Было обнаружено, что микроРНК, наиболее представленные во ВВ МСК, регулируют поддержание пула стволовых клеток путем изменения экспрессии компонентов сигнальных путей Wnt, PDGF и TGF $\beta$ . В ряде исследований было показано, что ВВ МСК содержат микроРНК, подавляющие образование миофибробластов и, соответственно, развитие фиброза за счет подавления сигнального пути TGF $\beta$  /SMAD2 и продукции белков ВКМ (Basalova et al., 2020; Fang et al., 2016). С помощью ВВ МСК могут передавать не только микроРНК, но и мРНК, которые будут транслироваться в соответствующие белки в клетках-мишенях, выполнять иммуносупрессивную функцию и изменять пролиферацию клеток-мишеней (Ragni et al., 2017). Имеются литературные данные, сообщающие о способности МСК, культивируемых в гипоксических условиях, секретировать большое количество ВВ, содержащих белки и микроРНК (такие как miR-223, miR-146b, miR-126 и miR-199a) принимающие важное участие в поляризации макрофагов в M2 фенотип (Lo Sicco et al., 2017). В литературе сообщается о переносе в составе ВВ молекул факторов роста, стимулирующих пролиферацию клеток-мишеней *in vitro*, а также некоторых транскрипционных факторов, что в очередной раз указывает на возможность участия данного механизма в процессах регенерации (Tomasoni et al., 2013). Однако передача сигналов МСК не ограничивается секрецией паракринных факторов или переносом регуляторных молекул в составе ВВ. МСК могут также обеспечивать регенерацию тканей путем переноса отдельных органелл, таких как митохондрии, посредством везикулярного или туннельного транспорта по нанотрубкам. Митохондриальный перенос может быть вызван сигналами от поврежденных клеток в форме митохондриальной ДНК, митохондриальных белков или целых митохондрий (Mahrouf-Yorgov et al., 2017). МСК, в свою очередь, переносят собственные митохондрии в клетки своего микроокружения, что может привести к восстановлению функционального состояния клеток-акцепторов и защите нишевого пула стволовых клеток от истощения соответственно. Таким образом, на модели

острого повреждения легких показано, что перенос митохондрий из МСК в клетки альвеолярного эпителия снижает негативные последствия острого повреждения легких (Islam et al., 2012). Благодаря такому механизму МСК могут подавлять секрецию провоспалительных цитокинов активированными макрофагами и стимулировать их фагоцитарную функцию (Morrison et al., 2017).



**Рис. 6** Механизмы паракринных эффектов МСК

В последнее время при многих заболеваниях широко освещалась возможность применения экзосом МСК, в том числе и при ВМК (Cai et al., 2020; Duan et al., 2020). На модели ГИ крысы с введением аутологичной крови было показано, что количество апоптотических и деградировавших нейронов в группе лечения экзосомами МСК, модифицированными miR-133b, было значительно снижено. Нейропротекторный эффект экзосом в упомянутом исследовании в основном отразился в антиапоптотическом действии miR-133b через воздействие на сигнальные пути RhoA и ERK1/2/CREB (Shen et al., 2018). Также было подтверждено, что экзосомы МСК с нокаутом по miR-206 снижают отек головного мозга и неврологические дефициты на ранних этапах развития патологического состояния у крыс в модели САК, что, вероятно, связано с подавлением апоптоза нейронов посредством передачи сигналов по сигнальному каскаду BDNF/TrkB/CREB (Zhao et al., 2019). Помимо

антиапоптотического эффекта, экзосомы МСК опосредовали также эффекты нейрогенеза и ангиогенеза в перигематомном пространстве в экспериментальной модели ГИ крыс (Han et al., 2018). Более того, было обнаружено, что терапия экзосомами, полученными из МСК, значительно снижала повреждение головного мозга при САК за счет подавления сигнального пути HMGB1-TLR4, что подтверждает как их антиапоптотические эффекты, так и противовоспалительные (Xiong et al., 2020).

Использование бесклеточного препарата на основе кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК (секретом МСК, содержащий как фракцию внеклеточных везикул, так и фракцию растворимых секретиремых факторов) позволяет преодолеть некоторые из описанных ранее ограничений клеточной терапии, а также достичь наиболее полного эффекта, определяемого не только содержанием ВВ. Способность секрета МСК стимулировать регенерацию и ограничивать повреждающие эффекты в нервной ткани после ГИ в нашем исследовании была оценена на модели *in vivo* (модель ГИ крыс с введением аутологичной крови). Также в рамках диссертационной работы были исследованы механизмы нейропротекторного эффекта секрета МСК (стандартизованного по содержанию BDNF, как ключевого нейротрофического фактора), а также был проведен подбор параметра концентрирования и способа введения секрета МСК с последующим определением оптимального временного интервала от индукции ГИ до введения секрета МСК.

## Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1 Животные

Экспериментальные животные (самцы крыс линии Вистар массой 180 – 250 г, 160 особей) были получены из вивария Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М. В. Ломоносова. Все работы на экспериментальных животных осуществляли в соответствии с директивой ЕС 201/63/EU и в согласовании с биоэтическим комитетом МГУ имени М. В. Ломоносова (разрешение №3.4 от 21.03.2021).

### 3.2 Выделение мезенхимных стромальных клеток из ЖТ

В работе были использованы секретом МСК жировой ткани человека и секретом МСК жировой ткани крысы.

МСК человека, выделенные из жировой ткани здоровых доноров ( $n = 3$ ), получены из биобанка Института регенеративной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова: MSU\_MSC\_AD (<https://human.depo.msu.ru>) и культивированы в среде, поддерживающей рост недифференцированных мезенхимных клеток-предшественников (Advance Stem Cell Basal Medium, NuClone, Южный Логан, ЮТА, США), с 10%-ной добавкой фактора роста (Advance Stem Cell Growth Supplement, NuClone, ЮТА, США) и 100 ЕД/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco). Все процедуры, проведенные с образцами тканей пациентов, проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрены Этическим комитетом МГУ имени М. В. Ломоносова (IRB00010587), протокол №4 (2018 г.).

Крысиные МСК были выделены из висцеральной жировой ткани половозрелых самцов крыс линии Вистар (см. раздел животные) в соответствии с ранее описанным протоколом и культивировали в среде

DMEM, с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) и 100 ЕД/мл пенициллина/стрептомицина (все от Gibco, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США) (Aleksandrushkina et al., 2019). Полученные МСК были охарактеризованы как адгезивные к пластику, экспрессирующие CD73, CD90 и CD105, лишённые экспрессии гемопоэтических и эндотелиальных маркеров CD14, CD19, CD34, CD45 и HLA-DR и способные к дифференцировке *in vitro* в адипоциты, хондроциты и линии остеобластов, которые соответствовали критериям, установленным Международным обществом клеточной терапии (ISCT) (Viswanathan et al., 2019). Среду меняли каждые 3–4 дня. Все эксперименты проводили с клетками в течение 5 пассажей.

### **3.3 Получение и стандартизация секрета мезенхимных стромальных клеток**

Секретом МСК человека, получали по ранее опубликованному протоколу (Sagaradze et al., 2019). Для этого субконфлюэнтные объединенные культуры МСК человека на пассажах 4–5 тщательно промывали раствором Хэнкса (ПанЭко, Россия) и культивировали в течение 7 дней в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (DMEM-LG) (Gibco, #31885049) с добавкой GlutaMAX™, пируватом и 100 ЕД/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco, #15240062). Затем среду, собранную с культуры МСК человека центрифугировали в течение 10 минут при 300 g для удаления клеточного дебриса, концентрировали в 5, 10, 25 или 50 раз (группы чМСК5х, чМСК10х, чМСК25х и чМСК50х) с использованием центрифужных концентраторов (ультрафильтры, 10 кДА; MWCO; Merck, Германия). Кондиционирование среды МСК и концентрирование ее с помощью картриджей для ультрафильтрации для ряда экспериментов осуществляла м.н.с. Лаборатории репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины

Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, к.б.н. Н.А. Басалова.

Концентрации нейротрофического фактора мозга (BDNF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста гепатоцитов (HGF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA) в образцах секрета МСК определяли с помощью соответствующих коммерческих наборов для ИФА (R&D Systems для BDNF, VEGF, HGF, uPA). Анализ проводили согласно протоколу производителя. Нормирование состава секрета осуществлялось по содержанию BDNF, как по одному из основных компонентов секрета МСК, обеспечивающего его нейротрофическую активность. В однократном секрете МСК человека (чМСК1х) содержится  $300 \pm 120$  пг/мл BDNF. Для получения секрета МСК крысы использовали аналогичный протокол.

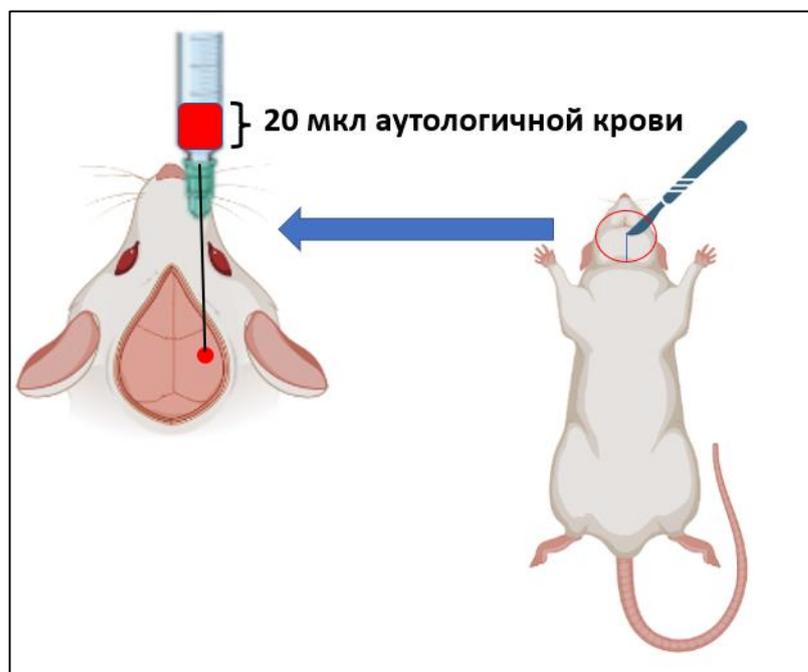
В эксперименте с ингибированием отдельных компонентов секрета МСК были использованы: нейтрализующие антитела к BDNF – AB1513P, Merck (20 мкл; конц. антител = 5 мкг/мл); специфический ингибитор uPA – BC 11 гидробромид, Tocris bioscience (20 мкл; конц. ингибитора = 16 мкМ).

### **3.4 Моделирование геморрагического инсульта и определение неврологического статуса экспериментальных животных**

Исследование проведено на модели внутримозгового кровоизлияния во внутреннюю капсулу (*capsula interna*) правого полушария по А.Н. Макаренко и в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств., 2012; Makarenko et al., 2002).

Для моделирования посттравматической гематомы анестезированным крысам (раствором, содержащим 2% Золетил® 50 (VirBac, Испания) и 1,5% ксилазин (InterChemie, Нидерланды) в физиологическом растворе в дозе 1 мл/кг массы тела; внутрибрюшинно) рассекали кожу и сухожильный

апоневроз черепа. Затем проводили трепанацию черепа в точке, отстоящей от брегмы (точка сочленения лобной и теменных костей) латерально 3,5 мм ( $L=3,5$ ) и кпереди 2 мм ( $A=2$  мм), что, согласно анатомическому атласу, соответствует координатам внутренней капсулы (*capsula interna*). В образовавшееся отверстие в черепе вводили мандрен-нож, позволяющий контролируемо и воспроизводимо повреждать мозговую ткань на фиксированной глубине (до 5 мм). Игла мандрен-ножа загнута под углом 20 градусов, что при трехкратном ее повороте по часовой стрелки в ране приводило к повреждению большей части проводящих путей внутренней капсулы. При помощи инсулинового шприца фиксированной длины в рану вводили 20 мкл аутологичной крови, взятой из подъязычной вены экспериментального животного. Механическое повреждение нервных волокон, скопление крови, отек и воспаление в области внутренней капсулы нарушало взаимодействие корковых структур со спинномозговыми нейронами, что приводило к развитию после операции моторного и сенсорного дефицита у крыс.



**Рис. 7** Модель интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) у крыс с введением аутологичной крови (схематично)

После завершения манипуляций производили ушивание раны непрерывным швом с использованием полипропиленовой нити. Дезинфекцию послеоперационного шва осуществляли раствором йода. Помимо прооперированных животных, которым было произведено повреждение мозговой ткани и инъекция крови, при постановке методики были использованы и ложно оперированные животные, которым была произведена незавершенная трепанация черепной коробки в указанной точке, однако мозговая ткань оставляли интактной.

После проведения хирургического вмешательства за животными устанавливали тщательное наблюдение в течение 14 суток, которое позволяло оценивать выживаемость животных, а также развитие у них неврологических дефицитов.

Данная модель интрацеребральной посттравматической гематомы была освоена при методологической поддержке к.б.н. Литвиновой С.А. и профессора, д.м.н. Ворониной Т.А. (Лаборатория психофармакологии ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В.В. Закусова").

Общую оценку неврологического статуса осуществляли по шкале Stroke-index McGraw (в модификации И.В. Ганушкиной) на 3 и 10 сутки после проведения операции (Gannushkina, 2000). Для этого использовали показатели, приведенные в таблице 3. Тяжесть состояния определяли по сумме баллов. К животным с легкими нарушениями относили крыс, набравших от 0.5 до 2 баллов, а к животным с тяжелыми – от 2,5 до 10 баллов. При этом исследователи, проводившие неврологическое тестирование, не знали к какой экспериментальной группе относится каждое из тестируемых животных.

**Таблица 3** Показатели шкалы Stroke-index McGraw.

Неврологические симптомы Stroke index	Оценка неврологического статуса по шкале McGraw
Вялость, замедленность движений	0,5
Тремор	1
Односторонний полуптоз	1
Двусторонний полуптоз	1,5
Односторонний птоз	1,5
Двусторонний птоз	1,5
Манежные движения	2
Парез 1–4 конечностей	2,0-5,0
Паралич 1–4 конечностей	3,0-6,0
Коматозное состояние	7
Гибель	10

### **3.5 Определение объема очага повреждения методом магнитно-резонансной томографии**

МРТ исследование проводили в Центре коллективного пользования ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" МЗ РФ. Магнитно-резонансную томографию (МРТ) экспериментальным животным выполняли через 11 дней после моделирования ВМК с использованием МРТ-аппарата Clinscan 7T (Bruker Biospin, Биллерика, Массачусетс, США), оснащенного катушкой для исследования мозга крысы. Коронарные (фронтальные) проекции были получены с использованием следующих параметров: TR (время повторения) = 5220 мс; TE (интервал между радиочастотным импульсом и пиком сигнала (эхо), индуцированного в катушке) = 53 мс; длина эхо-последовательности = 9; базовое разрешение 230x320; FoV (поле зрения) = 32x40 мм; толщина среза = 0,5 мм; расстояние между срезами = 0,75 мм. Поперечные проекции были получены с использованием следующих параметров: TR = 4000 мс; TE = 40

мс; длина эхо-последовательности = 9; базовое разрешение 288x320; поле зрения = 40x40 мм; толщина среза = 0,5 мм; расстояние между срезами = 0,6 мм. Обработку полученных томограмм проводили с использованием ПО Radiant Dicom Viewer (версия 2021).

### **3.6 Исследование зоны повреждения ткани мозга методами гистохимии и иммуногистохимии**

Для гистологических исследований крыс эвтаназировали на 14 сутки после моделирования ВМК (путем воздействия постепенно возрастающих концентраций CO<sub>2</sub>). Мозг удаляли (без предварительной перфузии, аккуратно извлекали из черепной коробки), фиксировали в 4% растворе формальдегида и заливали в парафин. Срезы головного мозга, содержащие очаг повреждения, депарафинировали, антигены демаскировали. Некоторые срезы окрашивали гематоксилин-эозином, крезильным фиолетовым (окраска по Нисслю) или берлинской лазурью (окраска по Перлсу). Комбинация этих окрасок позволила оценить следующие аспекты морфологических изменений в поврежденном мозге: размер поражения, фенотипический статус нейронов, инфильтрация очага повреждения лейкоцитами и размер отложений гемосидерина. Парафинизация образцов мозга экспериментальных животных, а также гистологическая окраска полученных срезов выполнялась под руководством: профессора д.м.н. П.Г. Малькова и к.м.н. Н.В. Даниловой (Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова).

Для иммуногистохимического окрашивания срезы обрабатывали 50 мМ раствором ацетата аммония и блокировали 10% козьей сывороткой для уменьшения фоновой флуоресценции. После блокировки их инкубировали с антителами к CD68 (Abcam, #ab125212, Уолтем, Массачусетс, США) и CD163 (Abcam, #ab182422, Уолтем, Массачусетс, США) с последующей инкубацией с флуоресцентно-мечеными вторичными козьими антикроличьими

антителами (Invitrogen, #A11034, Уолтем, Массачусетс, США). Ядра окрашивали раствором 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Sigma, #MBD0015-10ML, Сент-Луис, Миссури, США). Образцы исследовали с помощью микроскопа Leica DM600, оснащенного камерами DFC360 FX и DFC420C (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany); использовались репрезентативные поля зрения для получения фотографий. Обработку и анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения LasX (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) и Fiji.

Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов осуществляла м.н.с. Лаборатории репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, к.б.н. Н.А. Басалова.

### **3.7 Исследование прямой нейропротекторной активности секрета МСК *in vitro***

Для оценки прямой нейропротекторной активности секретомов МСК мы использовали ранее опубликованную модель *in vitro* индуцированной глутаматом нейротоксичности на клетках нейробластомы SH-SY5Y (Hu et al., 2012; Namroothiri et al., 2014). Эта клеточная модель отражает одну из основных причин гибели нейронов при инсульте: нейротоксичность, опосредованную глутаматом. Для этого клетки нейробластомы SH-SY5Y рассаживали в 48-луночные планшеты в полной среде роста в количестве 40000 клеток/лунку в четырех повторностях. Среду удаляли на следующий день, и в экспериментальные образцы добавляли бессывороточную среду (K+), бессывороточную среду с добавлением 3,5 нг/л человеческого BDNF (BDNF) или секретом МСК (человеческий чМСК или крысиный кМСК), также к образцам добавляли 100 мМ L глутамата и 5 мкМ IncuCyte® Caspase-3/7 Apoptosis Reagent (Essen Bioscience, #4440, Анн-Арбор, Мичиган, USA).

Содержание ионов  $Mg^{2+}$  в среде культивирования 0,8 ммоль/л; ионов  $Ca^{2+}$  2,3 ммоль/л, что подтверждает биорелевантность данного метода. В контрольной группе (К-) L-глутамат, BDNF или секретом МСК не добавляли для мониторинга спонтанной гибели клеток в бессывороточной среде (DMEM-LG). Глутамат вызывает быстрое увеличение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  в клетках SH-SY5Y (аналогично тому, что происходит в нейронах) с последующей активацией каспаз. При этом краситель клеточной визуализации апоптоза IncuCyte® Caspase-3/7, расщепленный активированной каспазой-3/7, окрашивает ядерную ДНК (зеленая флуоресценция). Для наблюдения за гибелью клеток SH-SY5Y планшет помещали в систему анализа живых клеток Incucyte® ZOOM (Essen Bioscience, Анн-Арбор, Мичиган, США), расположенную внутри инкубатора с подачей диоксида углерода ( $CO_2$ ). Покадровую съемку девяти полей зрения (фазовый и зеленый канал) каждой лунки проводили через 1, 3, 6, 12, 24, 48 и 72 ч после замены среды.

Для оценки способности секрета МСК стимулировать рост нейритов, клетки SH-SY5Y высевали в 48-луночные планшеты в полной питательной среде также в количестве 40 000 клеток/лунку в четырех повторностях. Питательную среду удаляли на следующий день и добавляли бессывороточную среду (контроль), бессывороточную среду с 3,5 нг/л человеческого BDNF (BDNF) или секретом МСК (человеческий чМСК или крысиный кМСК). Для мониторинга роста нейритов SHSY5Y планшет с клетками помещали в систему анализа живых клеток Incucyte® ZOOM (Essen Bioscience, Анн-Арбор, Мичиган, США), расположенную внутри инкубатора с подачей диоксида углерода ( $CO_2$ ). Покадровую визуализацию девяти полей зрения каждой лунки проводили через 0, 6 и 24 ч после замены среды. Микрофотографии анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ (версия 1.41) (Национальный институт здравоохранения, Bethesda, Мэриленд, США) для подсчета процента живых клеток (по сравнению с

исходным числом клеток) и роста нейритов в каждый момент времени. Клеточные отростки длиной более двух диаметров клетки считали нейритами.

### **3.8 Исследование поляризации моноцитов и макрофагов периферической крови человека под действием секрета МСК *in vitro***

Для оценки способности секрета МСК (чМСК1х) влиять на процессы активации/подавления клеток моноцитарно-макрофагального ряда гематогенного происхождения была использована модель поляризации моноцитов/макрофагов в М1- и М2-фенотип *in vitro*.

Для этого 20 мл донорской крови собирали в пробирки объемом 50 мл, тщательно перемешивали с 200 мкл 0.5М раствора ЭДТА\*К2 (антикоагулянт) и центрифугировали при 400g в течение 10 минут (отделяли плазму крови от форменных элементов). Плазму отбирали, а к осадку клеток добавляли эквивалентный объем DPBS (ПанЭко, #P060п). Суспензию форменных элементов крови в DPBS наслаивали на раствор фикола (ПанЭко, #P050) с удельной плотностью 1,077 г/мл и затем центрифугировали при 400g в течение 30 минут без активного торможения. На границе разделения фаз фикола и DPBS собирали слой мононуклеаров, их отмывали два раза DPBS, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в среде роста RPMI (ThermoFisher Scientific, #21875034), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки FBS (ThermoFisher Scientific, #26140079) и 1% раствора антибиотика/антимикотика (ThermoFisher Scientific, #15240062). Клетки высаживали на культуральные планшеты с высокоадгезионной поверхностью BD Primaria в концентрации  $1.5 \cdot 10^6$  клеток/мл, а планшеты помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 35–40 минут. После окончания времени инкубации, неприкрепившиеся клетки отмывали, а к оставшимся добавляли бессывороточную культуральную среду X-VIVOTM 15 (Lonza, #BE02-060F) с колониестимулирующим фактором макрофагов

(GM-CSF) (SciStore, #PSG030-10) в концентрации 50 нг/мл. Клетки культивировали в течение 8 дней. На 6-й день после выделения популяции моноцитов/макрофагов осуществляли их поляризацию в M1-фенотип путем добавления в среду роста рекомбинантного IFN $\gamma$  человека (R&D Systems, #285-IF-100/CF) (50 нг/мл) и липополисахарида (10 нг/мл) (SigmaAldrich, #297-473-0) или в M2-фенотип путем добавления в среду роста рекомбинантных IL-4 (R&D Systems, #204-IL-010/CF) (20 нг/мл) и TGF $\beta$  человека (Peprotech, #100-21) (20 нг/мл). В часть образцов добавляли однократный секретом МСК человека.

Клетки инкубировали в поляризующих средах в течение 48 часов, после чего их снимали с пластика культуральными скребками (TPP, Швейцария), окрашивали на маркеры M1- и M2-фенотипов и анализировали состав популяций с помощью проточной цитометрии FACSCanto™ II (BD Biosciences, США). Оценивали также прямое и боковое светорассеяние клеток, для визуализации степени чистоты полученных клеточных популяций. Для оценки эффективности поляризации макрофагов в M1-фенотипа в присутствии или отсутствии секрета МСК использовали антитела к маркерам CD80 (BD, #566992) и CD86 (BD, #555660). Для оценки эффективности поляризации макрофагов в M2-фенотип в присутствии или отсутствии секрета МСК использовали антитела к маркерам CD206 (BioLegend, #141720) и CD209 (BioLegend, #343006).

Оценка иммуномодулирующей активности секрета МСК была выполнена сотрудником Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ к.б.н. Е.С. Зубковой.

### 3.9 Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SigmaPlot11.0 (Systat Software, Inc., Эркрат, Германия). Числовые данные оценивали на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Различия между экспериментальной и контрольной группами анализировали с использованием t-критерия Стьюдента или дисперсионного анализа (ANOVA) по рангам (критерий Данна) в зависимости от того, имело ли место нормальное распределение группы данных. Данные выражены как среднее стандартное отклонение или медиана (25%; 75%), в зависимости от используемого теста. Мы считали различия значимыми при  $p < 0,05$ .

Для анализа категориальных данных (неврологический исход после ГИ) использовали точный критерий Фишера: экспериментальные группы попарно сравнивали с контрольной группой. Поскольку точный критерий Фишера поддерживает только массивы 2x2 (критерий  $\chi^2$  не применим для малых групп), животные были объединены в две группы: «визуально здоровые животные» + «животные с легкими неврологическими нарушениями», «животные с тяжелыми неврологическими нарушениями» + «летальный исход». Различные временные точки эксперимента сравнивались отдельно.

## Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 4.1 Исследование белково-пептидного состава секретома МСК

Субстанция на основе секретома МСК человека, применяемая нами на модели интрацеребральной посттравматической гематомы представляет собой композицию, состоящую из широкого спектра биологически активных факторов, таких как: BDNF (не менее 0,3 нг/мл), VEGF (не менее 0,2 нг/мл), GDNF (не менее 0,03 нг/мл), HGF (не менее 0,15 нг/мл), uPA (не менее 0,15 нг/мл), TGFb (суммарно по изоформам TGFb1, TGFb2 и TGFb3 не менее 0,055 нг/мл), цитокины: IL-4 (не менее 0,08 нг/мл), IL-6 (не менее 0,1 нг/мл), IL-10 (не менее 0,01 нг/мл), IL-11 (не менее 0.4 нг/мл), а также микроРНК обладающие нейропротективной и противовоспалительной активностью: hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-10, hsa-miR-146a, hsa-miR-491-5p и т.д..

Концентрации данных факторов в составе секретома МСК были получены методами иммуноферментного анализа (для белковых факторов), ПЦР в реальном времени (для микроРНК). Таким образом можно заключить, что применяемая нами композиция охарактеризована и содержит комбинацию факторов роста, внеклеточных везикул, переносящих определенные микроРНК и различных молекул, обладающих иммуотропным эффектом (цитокины, хемокины). Концентрации ключевых факторов, предположительно вовлеченных в процессы регенерации нервной ткани, приведены в таблице 4.

**Таблица 4. Концентрации ключевых факторов секретома МСК, предположительно опосредующих нейропротекторный эффект.**

Компонент секретома	Концентрация
BDNF	300 ± 120 пг/мл
HGF	290 ± 70 пг/мл
VEGF	270 ± 80 пг/мл
uPA	170 ± 50 пг/мл

## 4.2 Оценка нейропротекторного эффекта секрета МСК на модели геморрагического инсульта крыс

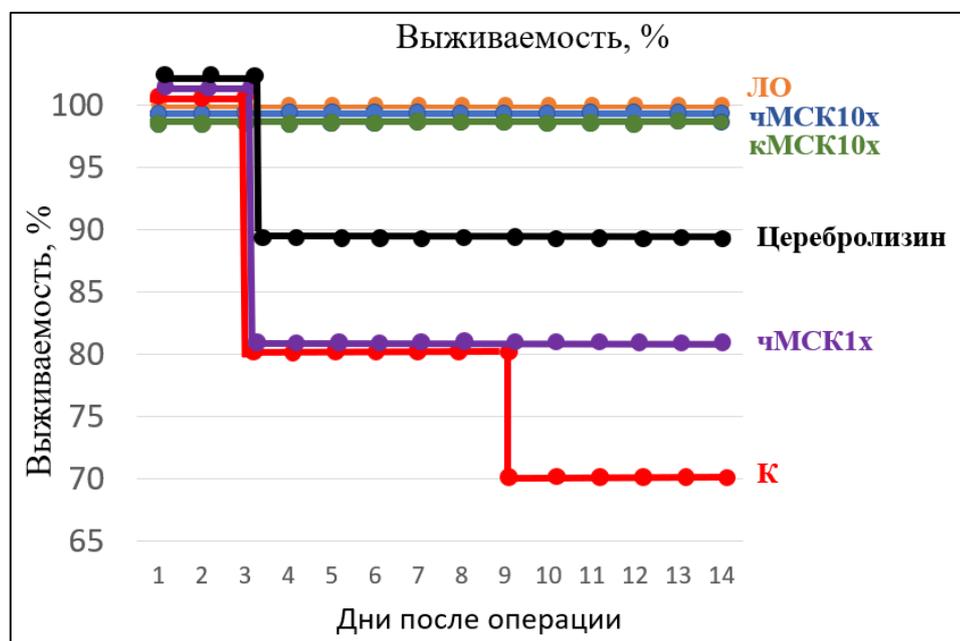
В рамках исследования были сформированы несколько экспериментальных групп (количество крыс в каждой экспериментальной группе N=10):

- 1) чМСК1х – введение в очаг поражения секрета МСК однократного (20 мкл);
- 2) чМСК10х – введение в очаг поражения секрета МСК человека, сконцентрированного в 10 раз (20 мкл);
- 3) кМСК10х – введение в очаг поражения секрета МСК крысы, сконцентрированного в 10 раз (20 мкл);
- 4) К – введение в очаг поражения бессывороточной среды DMEM-LG (20 мкл);
- 5) ЛО – ложнооперированные животные, без инсульта;
- 6) Церебролизин – внутрибрюшинное однократное введение 1,475 мл в качестве препарата сравнения (ампулы объёмом 5 мл, Ever pharma, серия #C2VB1A). Дозу Церебролизина рассчитывали, исходя из инструкции по медицинскому применению с использованием соответствующих коэффициентов пересчета (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, 2012).

В ходе эксперимента оценивались показатели: выживаемость, наличие и тяжесть неврологических нарушений, проводился МРТ анализ и гистологический анализ срезов в области повреждения.

### 4.2.1 Выживаемость

Показатель выживаемости оценивался в течение 14 суток после моделирования ГИ. Результаты исследования (рис. 8) показали, что в экспериментальных группах ЛО и с введением сконцентрированного в 10 раз секрета МСК (чМСК10х и кМСК10х) наблюдалась 100% выживаемость, в то время как в обеих контрольных группах (К и с введением церебролизина) были зафиксированы летальные исходы (в группе К – выживаемость в конечной точке эксперимента 70%, в группе с введением церебролизина – 90%). Введение однократного секрета МСК человека (чМСК1х) приводило к выживанию 80% животных в эксперименте.

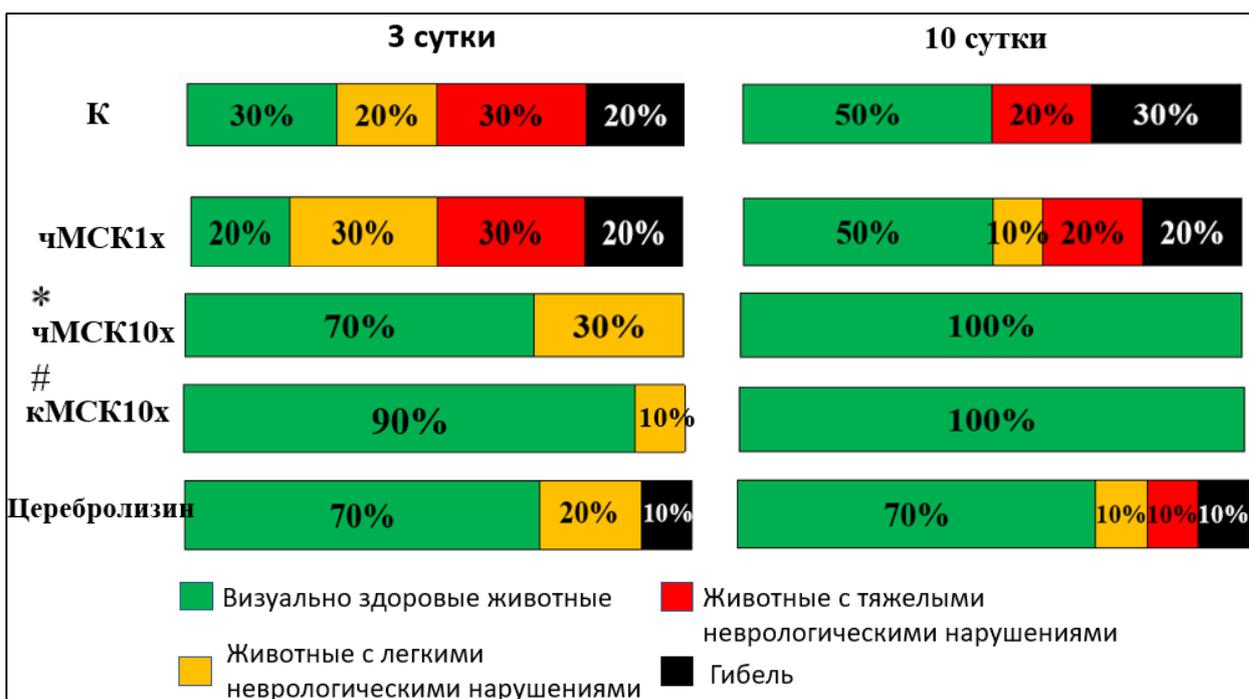


**Рис. 8** Динамика выживаемости крыс в эксперименте с интрацеребральным введением секрета МСК. N=10 (в каждой из экспериментальных групп на момент начала эксперимента), наблюдение за крысами проводилось в течение 14 суток.

### 4.2.2 Оценка неврологического статуса животных в экспериментальных группах

Тяжесть неврологических дефицитов оценивалась по показателям шкалы Stroke-index McGrow в модификации И.В. Ганушкиной на 3 и 10 сутки после

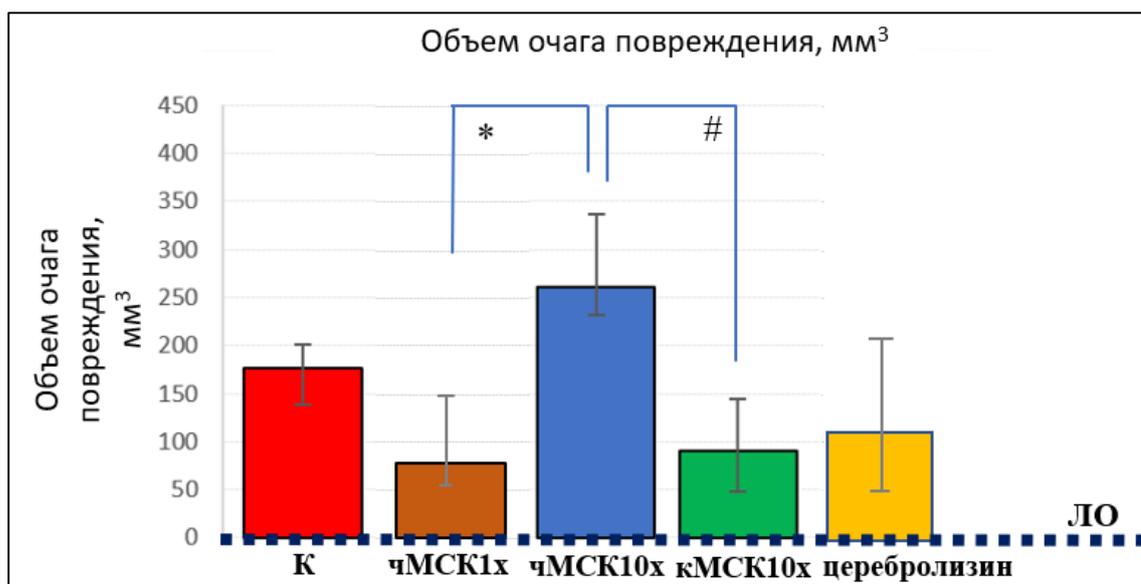
проведения операции. Все неврологические нарушения в рамках данной шкалы можно разделить по тяжести на легкие и тяжелые нарушения. К животным с легкими нарушениями относили крыс, набравших от 0.5 до 2 баллов, а к животным с тяжелыми – от 2,5 до 10 баллов. Оценка неврологических дефицитов показала существенное снижение тяжести неврологических нарушений в группах с введением сконцентрированных секретомов МСК (уже на 3 сутки в группах чМСК10х и кМСК10х не было животных с тяжелыми неврологическими нарушениями, а на 10 сутки все животные были визуально здоровы). Оба варианта секрета МСК как крысиный, так и человеческий, сконцентрированные в 10 раз, достоверно снижали тяжесть неврологических нарушений у экспериментальных животных (при сравнении группы чМСК10х с группой отрицательного контроля (К):  $p = 0,006$ ;  $N = 10$ ; а при сравнении группы кМСК 10х с контрольной группой (К):  $p < 0,005$ ;  $N = 10$ ; двусторонний точный критерий Фишера). Данный эффект был доза-зависимым, так как в экспериментальной группе без концентрирования чМСК1х (как на 3, так и на 10 сутки) были животные с выраженными неврологическими расстройствами. В то же время в группе с введением церебролизина было меньше крыс с неврологическими дефицитами, чем в группе контроля (К), но крысы как с легкими, так и с тяжелыми неврологическими нарушениями в этой группе все же присутствовали в отличие от групп чМСК10х и кМСК10х. Результаты неврологической оценки крыс в группах эксперимента приведены на рис.9.



**Рис. 9** Результаты неврологической оценки животных в эксперименте с интрацеребральным введением секрета МСК на 3 и 10 сутки. (\* –  $p = 0,006$ ,  $N = 10$ ; # –  $p < 0,005$ ,  $N = 10$ , двусторонний точный критерий Фишера)

#### 4.2.3 МРТ-исследование

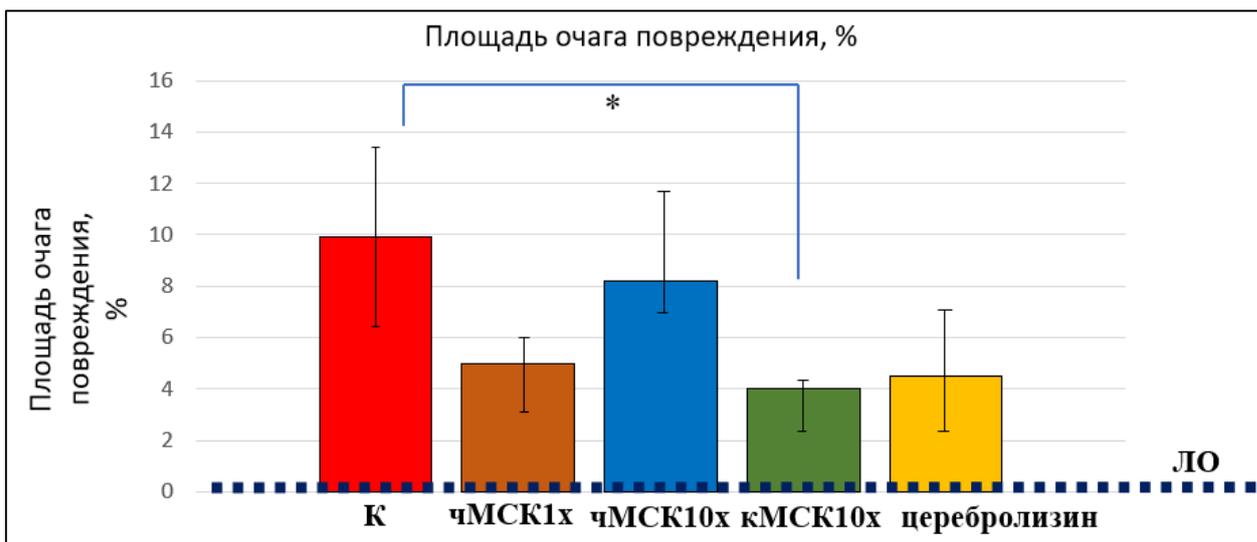
МРТ выполняли через 11 дней после начала эксперимента. Объем очага повреждения определялся как сумма площадей поврежденной мозговой ткани в совокупности срезов на съемке во фронтальной проекции T2-взвешенное. Анализ томографических изображений и последующий обсчет площадей повреждения проводился при помощи программы для визуализации томограмм Radiant Dicom Viewer (вер. 2021). Размер очага повреждения при этом уменьшался во всех экспериментальных группах в сравнении с контрольной (К) кроме экспериментальной группы чМСК10х. Крысы в группе чМСК10х имели очаг поражения статистически значимо больше, чем в группах чМСК1х и кМСК10х.



**Рис. 10** Сравнение объёмов очага повреждения в эксперименте с интрацеребральным введением секрета МСК (МРТ, 11 сутки,  $N \geq 8$ , \* -  $p = 0,019$ ; # -  $p = 0,004$ ). Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). Синяя пунктирная линия – объем очага поражения головного мозга у ЛО животных.

#### 4.2.4 Гистологический анализ

При гистологическом анализе рассматривались срезы головного мозга, содержащие очаг повреждения. Был проведен обсчет площадей очага повреждения на срезах, окрашенных гематоксилин-эозином. Результат данного подсчета показал, что во всех экспериментальных группах к моменту забора гистологического материала (14 сутки) размеры очага повреждения мозговой ткани меньше, чем в контрольной группе (К). В группах чМСК1х, чМСК10х и с введением церебролизина наблюдалась тенденция к снижению очага кровоизлияния в сравнении с контролем, а в группе кМСК10х разница с контрольной группой по данному показателю оказалось статистически значимой ( $p = 0,023$ ).



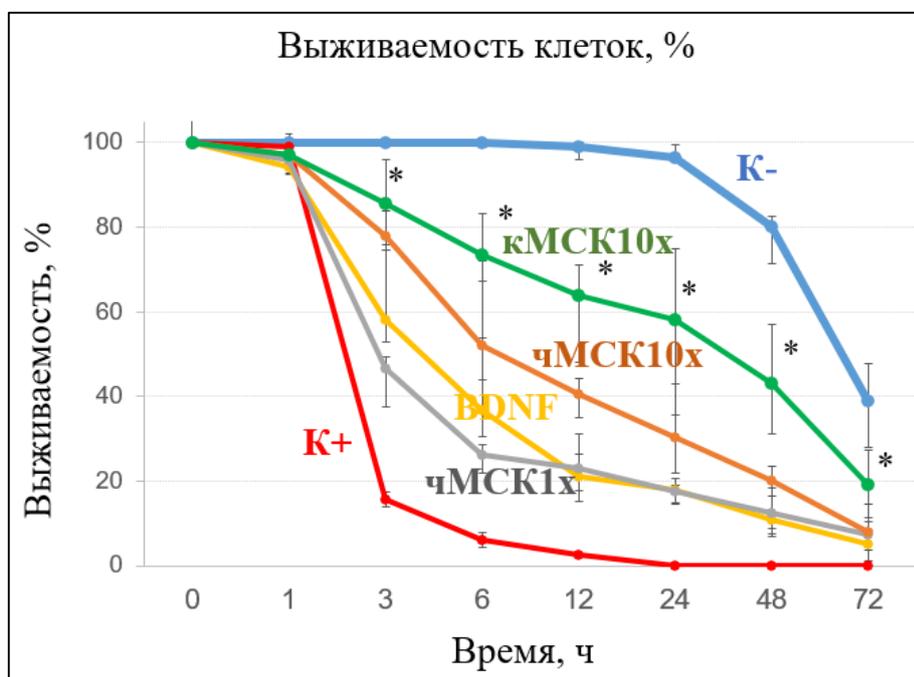
**Рис. 11** Сравнение площадей очага повреждения на срезах, окрашенных гематоксилин-эозином в эксперименте с интрацеребральным введением секрета МСК. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). Гистологический материал забирался на 14 сутки,  $N \geq 4$ , \* -  $p = 0,023$ . Синяя пунктирная линия – площадь очага поражения головного мозга у ЛО животных.

Окрашивание срезов головного мозга по Ниссию также подтвердило наличие микроскопических признаков повреждения мозговой ткани: некроза, отека, глиального рубца, нейтрофильной инфильтрации и застоя крови в капиллярном русле. Окрашивание берлинской лазурью по Перлсу продемонстрировало отложения гемосидерина (синий цвет) в тканях головного мозга, располагающихся вокруг гематомы, практически во всех экспериментальных группах (количественной оценки при данном методе окрашивания срезов не проводилось).

## 4.3 Исследование механизмов, вовлеченных в реализацию нейропротекторных свойств секрета МСК при ГИ

### 4.3.1 Влияние секрета МСК на выживаемость клеток *in-vitro* на модели глутамат-опосредованной токсичности

Чтобы оценить прямое нейропротекторное влияние секрета МСК нами была использована описанная модель *in vitro* индуцированной глутаматом нейротоксичности на клетках нейробластомы SH-SY5Y (Nampoothiri et al., 2014; Hu et al., 2012). В экспериментальные образцы клеток добавляли бессывороточную среду культивирования DMEM-LG (K+), бессывороточную среду с добавлением 3,5 нг/мкл человеческого BDNF или секретом МСК (человеческий чМСК1х и чМСК10х или крысиный кМСК10х), также ко всем образцам добавляли L-глутамат до конечной концентрации 100 мМ. А уже в контрольную группу (К-) не вносилось дополнительно никаких реактивов для мониторинга спонтанной гибели клеток в бессывороточной среде.



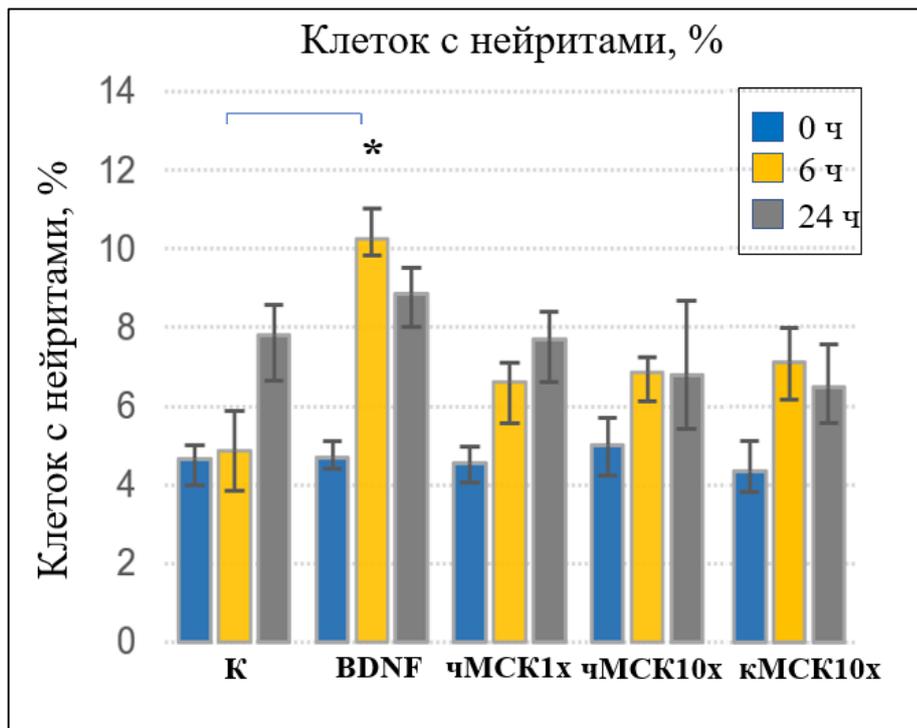
**Рис. 12** Результаты *in vitro* исследования прямой нейропротекторной активности секрета МСК. На диаграмме показана динамика выживаемости клеток нейробластомы SH-SY5Y в модели индуцированной глутаматом нейротоксичности; N (количество лунок) = 12; \*-  $p < 0,001$ .

Мы обнаружили, что секретомы чМСК1х, чМСК10х, кМСК10х поддерживают выживание клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y в условиях индуцированной глутаматом нейротоксичности (рис. 12). Количество живых клеток в группах чМСК1х, чМСК10х, кМСК10х и BDNF было значительно выше через 3–24 ч после добавления глутамата, чем в группе положительного контроля (K+), где клетки были в бессывороточной среде культивирования DMEM-LG. Выживаемость SH-SY5Y в группе с добавлением однократного секрета (чМСК1х) была сравнима с выживаемостью, наблюдаемой в группе BDNF. Нейропротекторная активность была статистически значимо выше у сконцентрированного в 10 раз секрета МСК крыс (кМСК10х) по сравнению с группой (K+) (n=12, p <0,001). Добавление к клеткам нейробластомы человека чМСК1х, чМСК10х и кМСК10х поддерживало выживаемость клеток SH-SY5Y до 72 ч в нейротоксических условиях с результатами 7% (0%; 9%), 8% (4%; 10%) и 19% (11 %; 27%) живых клеток соответственно, тогда как живых клеток через 24 ч эксперимента в группе K+ не наблюдалось. Помимо глутамат-опосредованной токсичности также наблюдалась спонтанная гибель клеток SH-SY5Y (группа K-), которая возрастала только по прошествии первых 24 ч эксперимента.

Данные результаты указывают на наличие в секретах МСК (как человеческих, так и крысиных) компонентов, способствующих прямой нейропротекции в условиях глутамат-опосредованной токсичности.

### 4.3.2 Влияние секрета МСК на рост нейритов клеток *in-vitro*

Чтобы оценить способность секрета МСК стимулировать рост нейритов, к клеткам нейробластомы SH-SY5Y добавляли бессывороточную среду (К), бессывороточную среду с 3,5 нг/л человеческого BDNF BDNF или секретом МСК (человеческий чМСК1х и чМСК10х или крысиный кМСК10х).

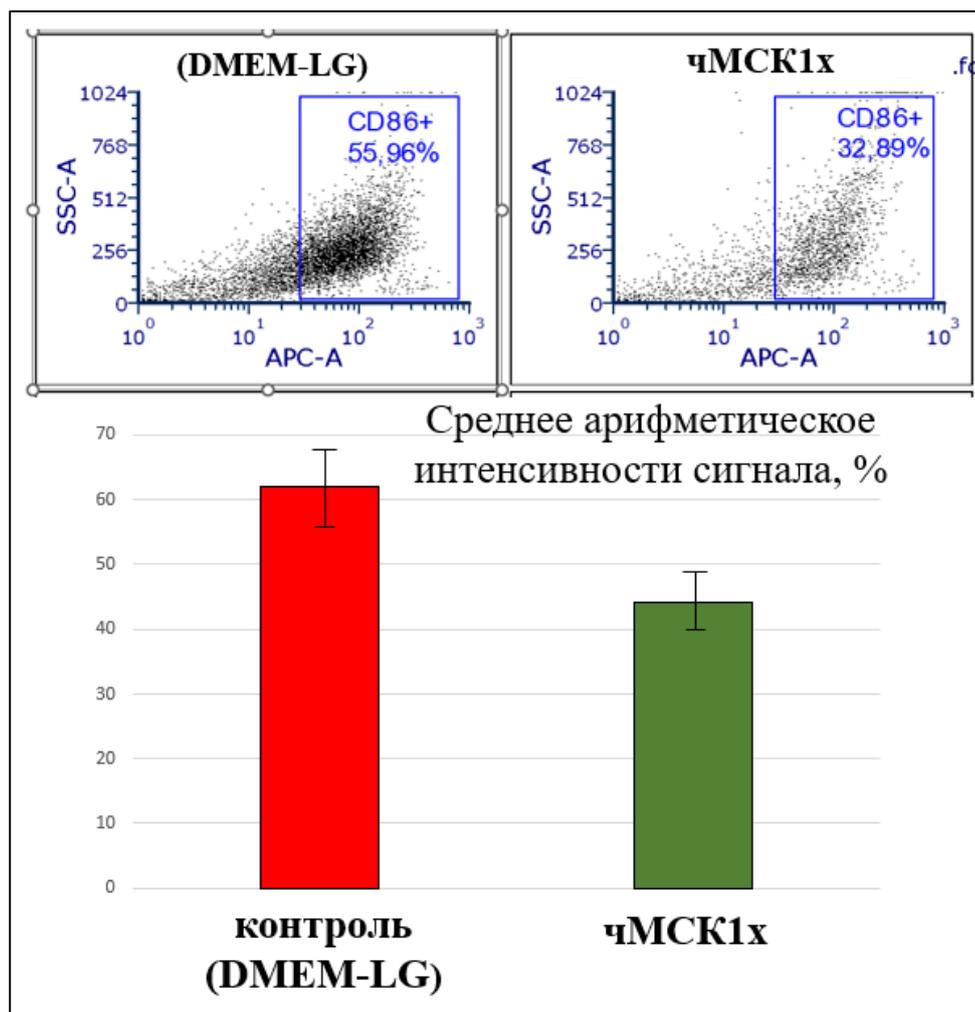


**Рис. 13** Сравнение роста нейритов у клеток нейробластомы SH-SY5Y в экспериментальных группах. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). N = 5; \*- p < 0.005. Статистически значимым было значение данного показателя в группе BDNF 6ч в сравнении с контрольной группой. Все сравнения проводились со значением контрольной группы в соответствующий момент времени.

Клеточные отростки длиной более двух диаметров клетки считали нейритами. В таких условиях был произведен подсчет клеток с нейритами. Было показано, что добавление секрета МСК (чМСК1х, чМСК10х и кМСК10х) не приводило к статистически значимому росту числа нейритов в отличие от группы BDNF.

### 4.3.3 Влияние секрета МСК на поляризацию моноцитов и макрофагов из периферической крови

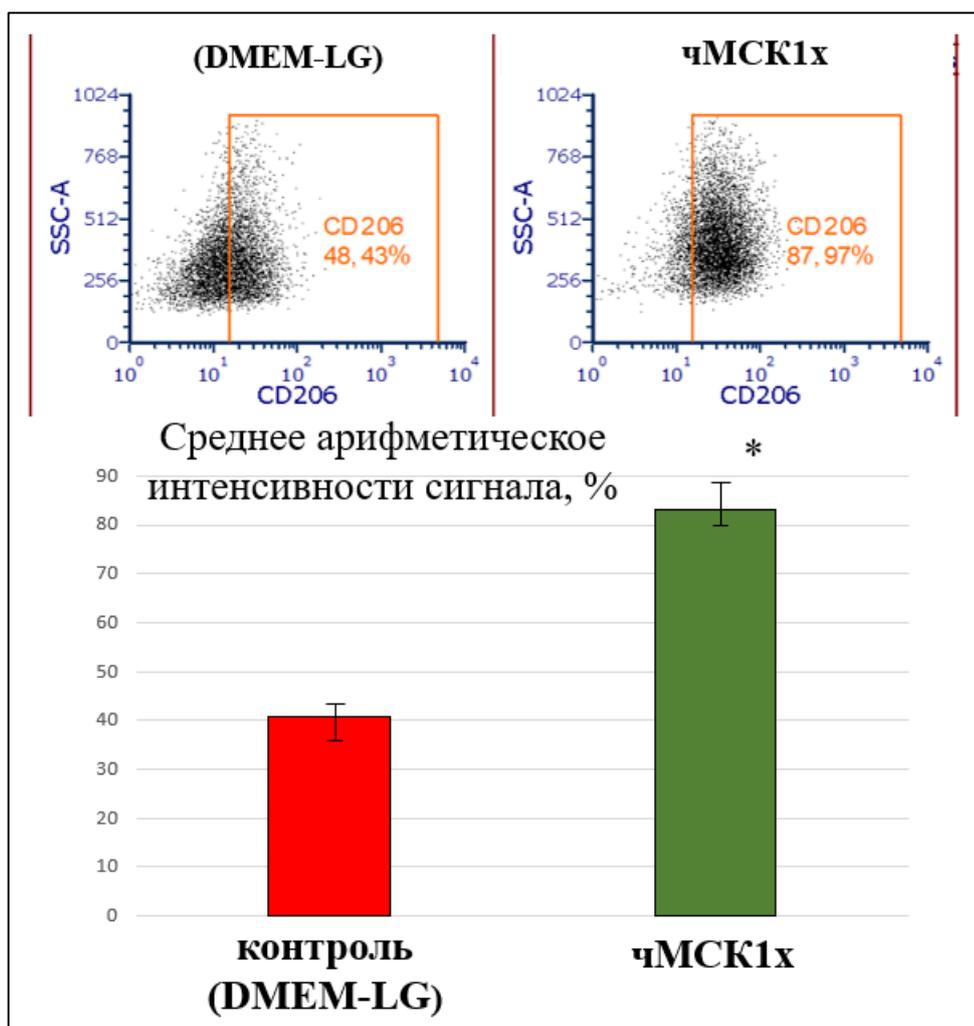
Проведенное исследование показало, что добавление в среду культивирования однократного секрета МСК (чМСК1х) подавляет поляризацию моноцитов/макрофагов в провоспалительный М1-фенотип по сравнению с группой контроля (DMEM-LG) (рис.14).



**Рис. 14** Анализ влияния секрета МСК на поляризацию клеток моноцитов и макрофагов из периферической крови в провоспалительный (М1-фенотип). Вверху – первичные данные проточной цитометрии клеток, поляризованных в М1-фенотип (и окрашенных антителами на маркер CD86). Внизу – значения среднего арифметического интенсивности сигнала, представленные в виде столбчатой диаграммы. Результаты представлены в виде медианы (25%; 75%).

Так, в группе без добавления секрета МСК средняя интенсивность окраски (среднее арифметическое интенсивности сигнала) клеток, поляризованных в М1-фенотип и окрашенных антителами к CD86 (маркер М1 моноцитов/макрофагов) составила 62,0 (55,1;67,1) усл.ед., в то время как добавление секрета МСК снижало количество CD 86+ клеток. Средняя интенсивность окраски таких клеток снизилась до 44,1 (39,7;48,0) усл.ед.

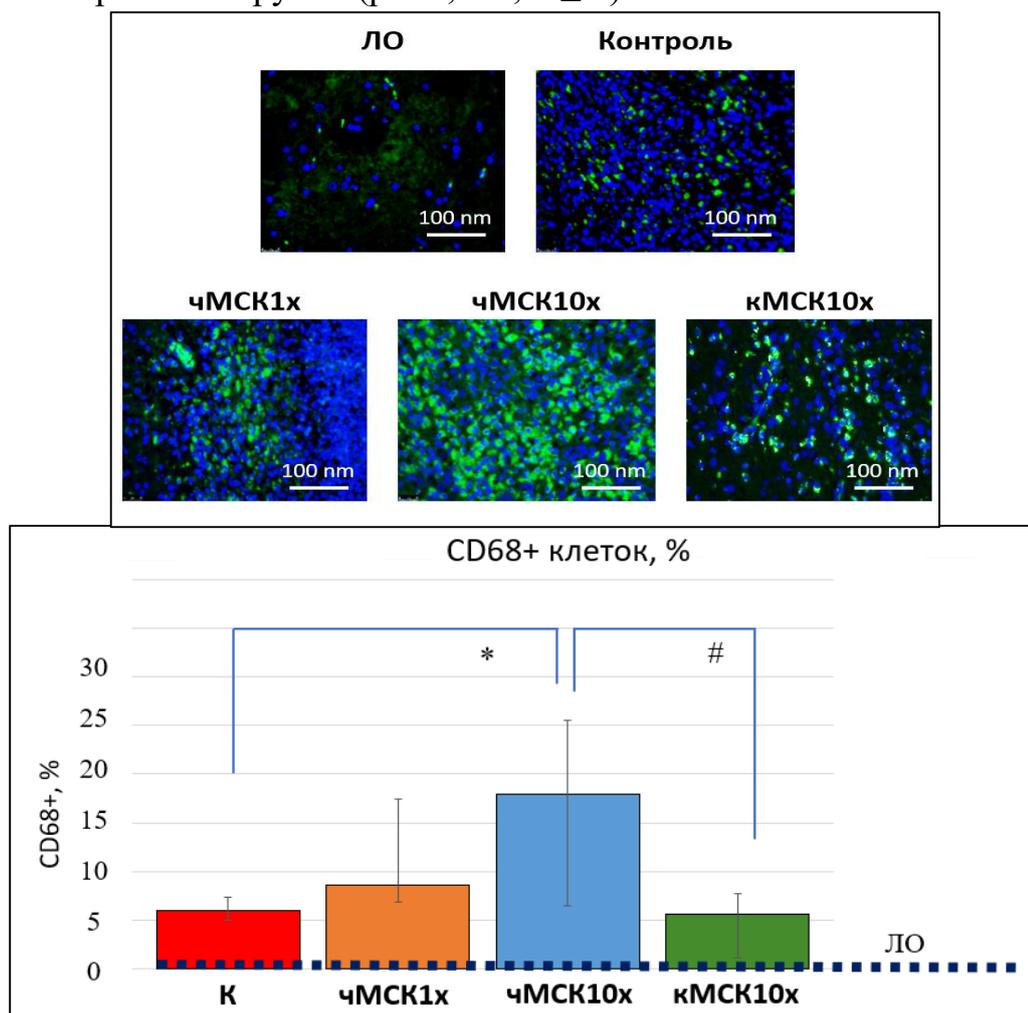
Также добавление однократного секрета МСК (чМСК1х) в среду культивирования достоверно повышало эффективность поляризации моноцитов/макрофагов в противовоспалительный М2-фенотип: средняя интенсивность окраски клеток, поляризованных в М2-фенотип и окрашенных антителами к CD206 (маркер М2 моноцитов/макрофагов) в группе контроля составила 40,9 (37,1;42,9) усл.ед., в то время как в группе с добавлением секрета МСК – 83,0 (80,3;88,2) усл.ед. (n=4; p <0,05) (рис.15).



**Рис. 15** Анализ влияния секретома МСК на поляризацию клеток моноцитов и макрофагов из периферической крови в противовоспалительный (M2-фенотип). Вверху – первичные данные проточной цитометрии клеток, поляризованных в M2-фенотип (и окрашенных антителами на маркер CD206). Внизу – значения среднего арифметического интенсивности сигнала, представленные в виде столбчатой диаграммы. Результаты представлены в виде медианы (25%; 75%). N = 4; \*- p < 0.05.

#### 4.3.4 Влияние секрета МСК на активацию процессов фагоцитоза в очаге повреждения и вокруг него

Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга в перигематомной области на маркер CD68 (маркер провоспалительных клеток М1-микроглии и лизосомальной активности) выявило достоверно более высокую его представленность в срезах мозга группы чМСК10х: CD68-специфически окрашенная площадь – 18,0% (6,5%; 25,6%) против 5,9 % (5,0%; 7,4%) в контрольной группе ( $p = 0,034$ ;  $n \geq 9$ ).



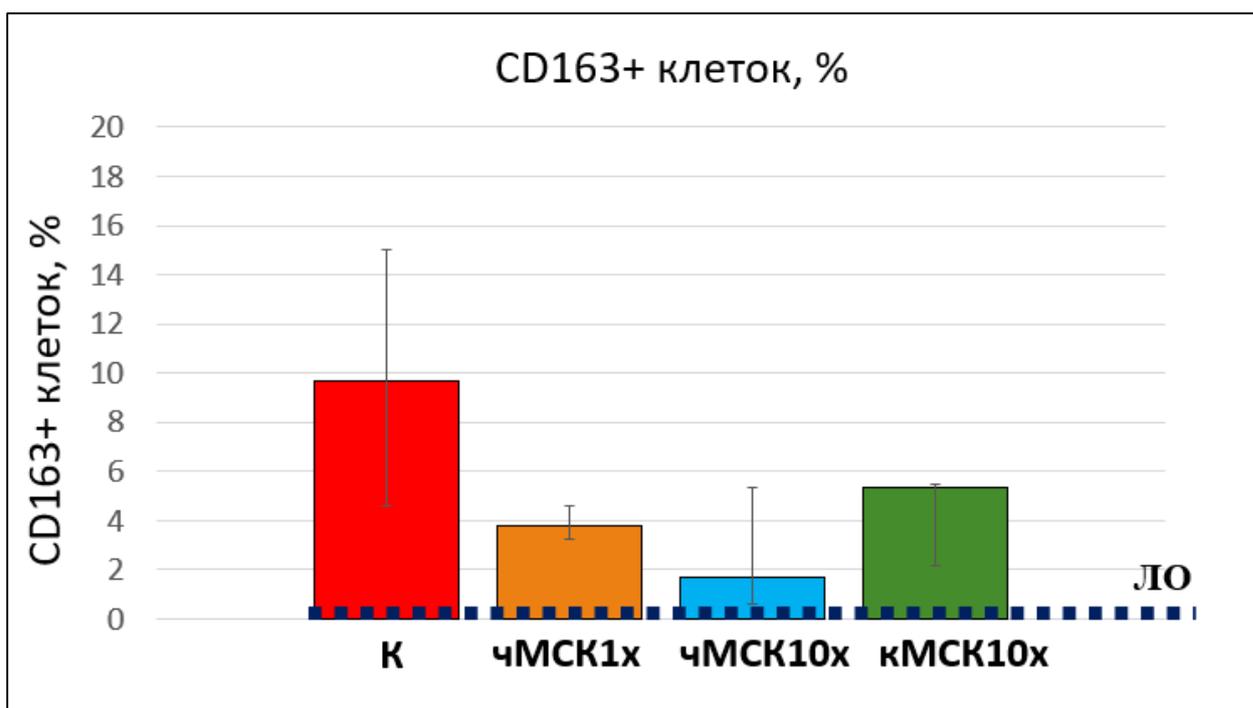
**Рис. 16** Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов головного мозга на маркер лизосомальной активности CD 68 (на 14 сутки) в перигематомной области. Вверху на фото: зеленое окрашивание соответствует окрашиванию CD68; синее окрашивание соответствует ядрам клеток. Внизу на диаграмме данные представлены в виде медианы (25%; 75%); \* -  $p = 0,034$ ; # -  $p = 0,005$ ;  $N \geq 9$ .

Достоверной разницы в площади окрашивания на CD68 в остальных группах по сравнению с контрольной группой (К) не наблюдалось.

Поскольку площадь, специфично окрашенная на CD68, в группе чМСК10х была значительно больше, чем в других группах, и соотносилась с объемом поражения головного мозга по данным МРТ и гистохимических исследований, мы полагаем, что этот негативный эффект связан с применением ксеногенного (человеческого) секрета МСК в модели на крысе. В подтверждение нашей гипотезы отметим снижение размеров области окрашивания CD68 в срезах головного мозга крыс из группы с введением аллогенного секрета кМСК10х: 5,6% (1,1%; 7,7%) по сравнению с чМСК10х: 18,0% (6,5%; 25,6%) ( $p = 0,005$ ). Возможно, большая площадь поражения в экспериментальной группе чМСК10х вызвана гиперактивацией клеток микроглии везикулярной фракцией секрета МСК человека, поскольку везикулы несут видоспецифичные молекулы МНС (Marar et al., 2021; Robbins et al., 2014). Литературные данные демонстрируют, что внеклеточные везикулы могут активировать иммунные клетки, особенно если они ксеногенные. С одной стороны, активированные клетки микроглии способствуют раннему фагоцитозу компонентов крови, что снижает ее токсическое действие (Huang et al., 2016; Janda et al., 2018). А с другой стороны, гиперактивация клеток микроглии усиливает инфильтрацию очага поражения иммунными клетками и приводит к продукции провоспалительных цитокинов, что проявляется в виде расширения очага поражения.

Отметим, что в группе чМСК10х отмечается не только большая интенсивность окрашивания на CD68+ клетки (маркер как провоспалительной M1 микроглии, так и M2c фагоцитарной микроглии), но и снижение окрашивания клеток на маркеры противовоспалительных гемоглобинактивированных макрофагов CD163 (Moestrup et Moller, 2004; Walker et Lue, 2015). Так окрашивание гистологических срезов на CD163, показало выраженное (но не статистически значимое) снижение уровня

CD163+ клеток в группе чМСК10х – 1,7% (0,6%; 5,3%) по сравнению с 9,7% (4,6%; 15,0 %) в контрольной группе ( $p = 0,052$ ;  $n \geq 8$ ) (рис. 17). Аналогичное снижение наблюдалось в группе чМСК1х. Существенно больше было CD163+ клеток в срезах головного мозга крыс из группы кМСК10х 5,3% (2,2%; 5,5%), что могло проявляться в лучшем удалении фагоцитами продуктов распада гемоглобина и комплексов гемоглобин-гаптоглобин в очаге поражения, а значит и снижении их токсических эффектов.



**Рис. 17** Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов головного мозга на маркер противовоспалительных гемоглобинактивированных макрофагов CD163 (на 14 сутки). Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). Синяя пунктирная линия – площадь очага поражения головного мозга у ЛО животных.

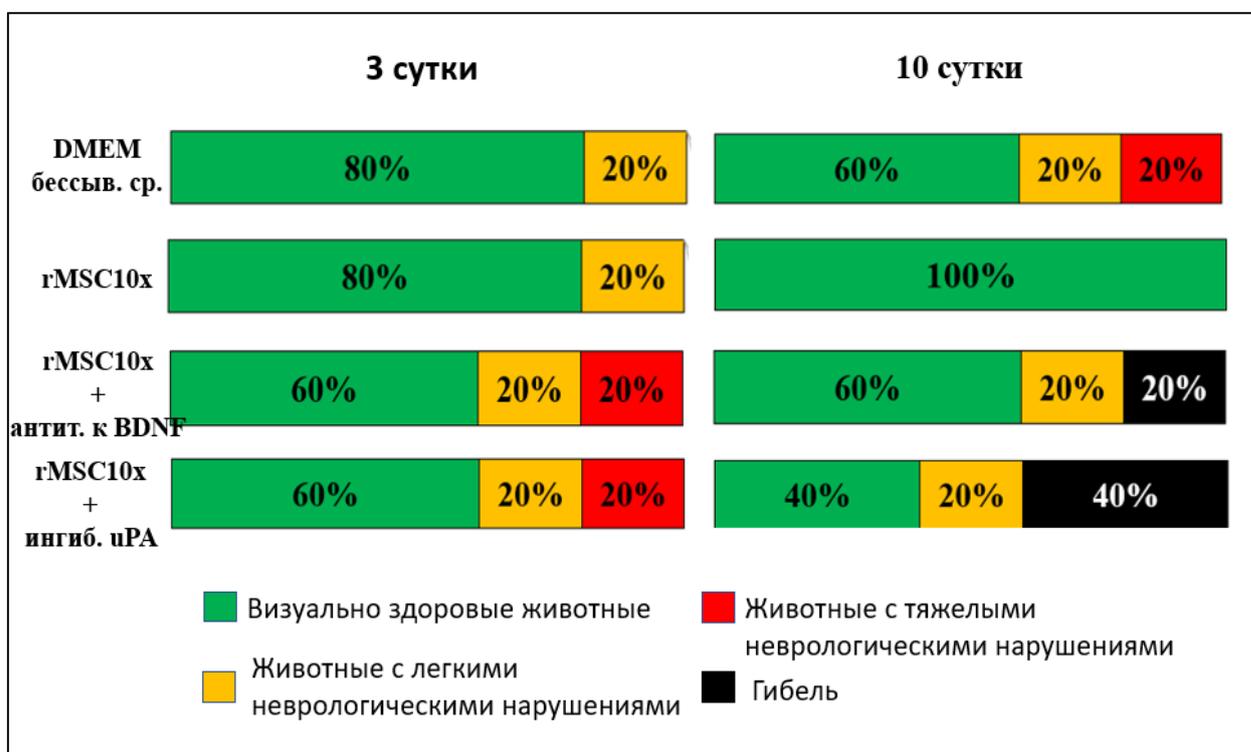
#### ***4.3.5 Установка вовлеченности мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и урокиназного активатора плазминогена (uPA) в реализацию нейропротекторного эффекта секрета МСК***

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) является классическим нейропротекторным и прорегенеративным фактором в периферической и центральной нервной системе. Показана его способность стимулировать восстановление поврежденной нервной ткани после ишемического инсульта и внутрижелудочкового кровоизлияния (Ahn et al., 2021; Liu et al., 2020). Однако современная концепция регенерации позволяет нам утверждать, что один фактор, даже если он существенный, не может быть единственным фактором, влияющим на такой сложный биологический процесс как регенерация и репарация в ЦНС после инсульта. Ранее нами было показано, что активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) потенцирует активность BDNF и стимулирует восстановление нервной ткани (Dzhauari et al., 2022). Местное одновременное введение BDNF и uPA обеспечивало эффективную нейропротекцию мозговой ткани после внутримозгового кровоизлияния, способствовало выживанию экспериментальных животных и их неврологическому восстановлению, уменьшало объем поражения. Упомянутые факторы представлены в составе секрета МСК и, предположительно, оказывают существенную роль в осуществлении нейропротекции, опосредованной введением секрета МСК после ВМК. С целью установки роли данных факторов в процессах восстановления мозговой ткани после геморагического повреждения нами был применен ингибиторный анализ. В рамках данного эксперимента крысам после моделирования ВМК в очаг поражения вводился секретом МСК, содержащий нейтрализующие антитела к BDNF или специфический ингибитор uPA с целью маскирования эффектов данных факторов в составе секрета.

Экспериментальные группы были составлены следующим образом (количество крыс в каждой экспериментальной группе N=5):

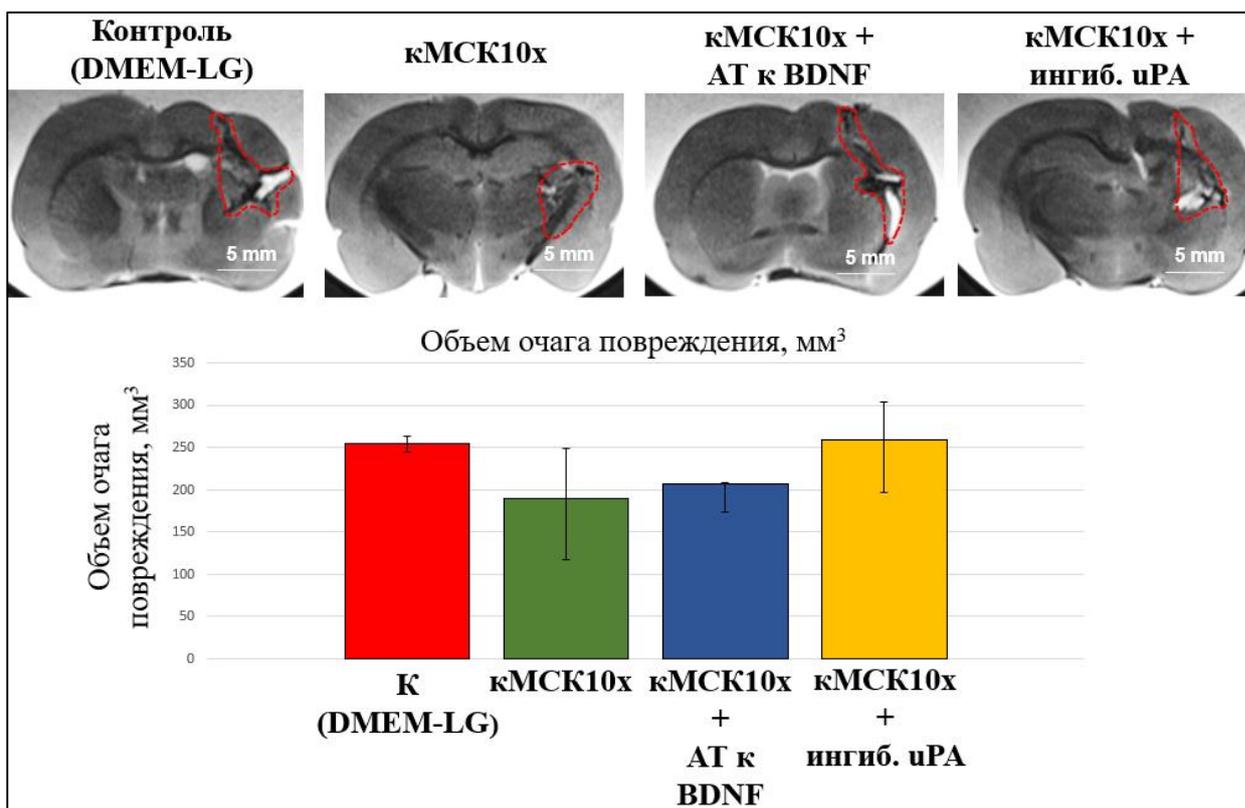
- 1) кМСК10х – введение в очаг поражения секрета МСК крысы, сконцентрированного в 10 раз (20 мкл);
- 2) кМСК10х + АТ к BDNF – введение в очаг поражения секрета МСК крысы, сконцентрированного в 10 раз с добавлением нейтрализующих антител к BDNF;
- 3) кМСК10х + ингиб. uPA – введение в очаг поражения секрета МСК крысы, сконцентрированного в 10 раз с добавлением специфического ингибитора uPA;
- 4) К – введение в очаг поражения бессывороточной среды DMEM-LG (20 мкл).

Результаты оценки неврологического статуса животных приведены на рис. 18. Статистически значимой разницы из-за небольшого размера выборки обнаружить не удалось.



**Рис. 18** Оценка неврологических дефицитов у животных на 3 и 10 сутки при ингибировании отдельных компонентов секрета МСК (BDNF; uPA).

МРТ исследование показало тенденцию к увеличению очагов поражения в группах с подавлением BDNF и uPA (рис. 19). Что может свидетельствовать о вовлеченности данных факторов в составе секрета МСК в процессы нейропротекции после ВМК. Для уточнения данного эффекта необходимо провести дополнительное испытание с большим количеством экспериментальных животных.



**Рис. 19** Сравнение объёмов очага повреждения (МРТ, 11 сутки, N = 10) при ингибировании отдельных компонентов секрета МСК (BDNF; uPA). Данные представлены в виде медианы (25%; 75%).

## **4.4 Определение основных параметров введения бесклеточного препарата секрета МСК в модели ГИ**

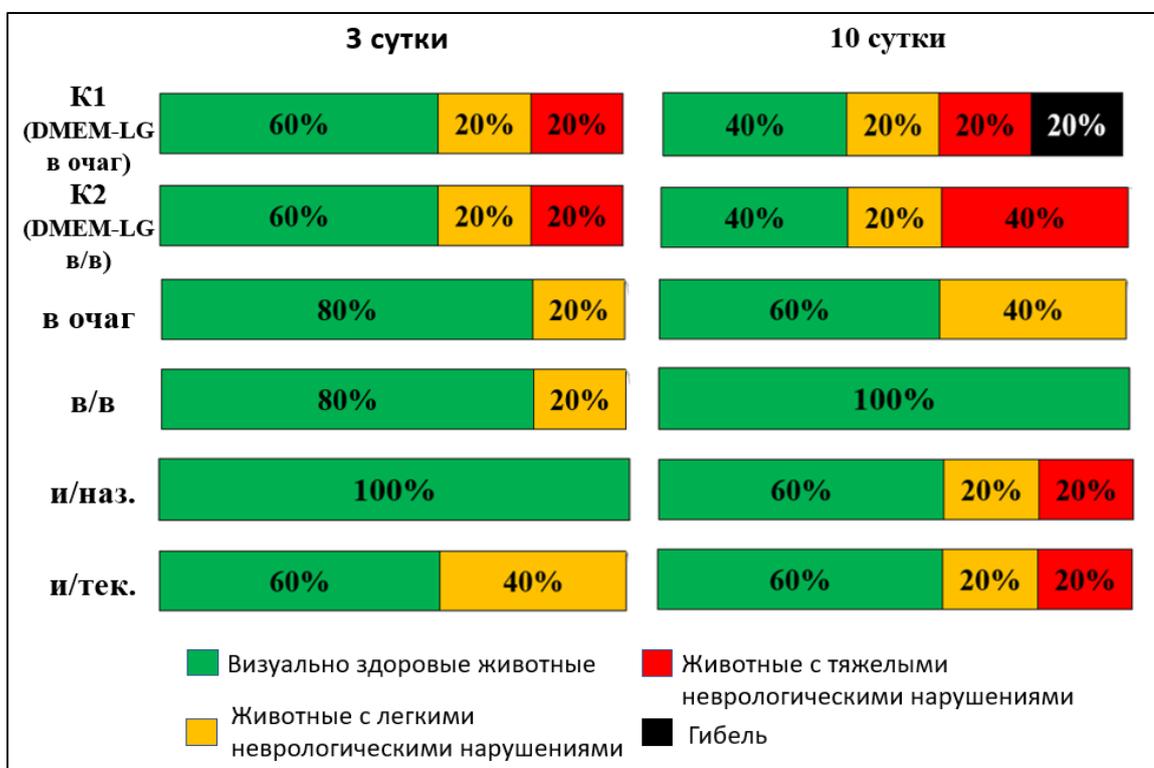
### **4.4.1 Определение эффективности секрета МСК при различных путях введения**

В описанном ранее эксперименте нами было продемонстрировано, что введение секрета МСК в очаг кровоизлияния (интрацеребрально) приводит к нейропротекторным эффектам в модели ГИ крыс. Однако подобный путь введения имеет существенные ограничения. Введение секрета непосредственно в область повреждения сопряжено с высокой инвазивностью процедуры (в клинике интрацеребральный путь введения практически не проводится при небольших размерах гематомы), тогда как неочевидно, сохраняет ли секрет МСК свою нейропротекторную активность при иных путях введения. Для выявления оптимальных путей введения нашего бесклеточного препарата нами были выбраны внутривенный (в/в), интраназальный (и/наз.) и интратекальный (и/тек.) пути введения, в качестве контроля проводилось сравнение с группой введения секрета МСК непосредственно в очаг поражения (К1), а также с группой введения в очаг поражения бессывороточной среды культивирования (DMEM-LG) (К2). Таким образом, в рамках данного исследования были сформированы несколько экспериментальных групп (количество крыс в экспериментальных группах N=5):

- 1) В очаг – введение в очаг поражения секрета МСК человека, сконцентрированного в 10 раз (40 мкл);
- 2) В/в – введение в хвостовую вену секрета МСК человека, сконцентрированного в 10 раз (100 мкл);
- 3) И/тек. – введение в спинномозговой канал (между L5 и S1 позвонками) секрета МСК человека, сконцентрированного в 10 раз (100 мкл);

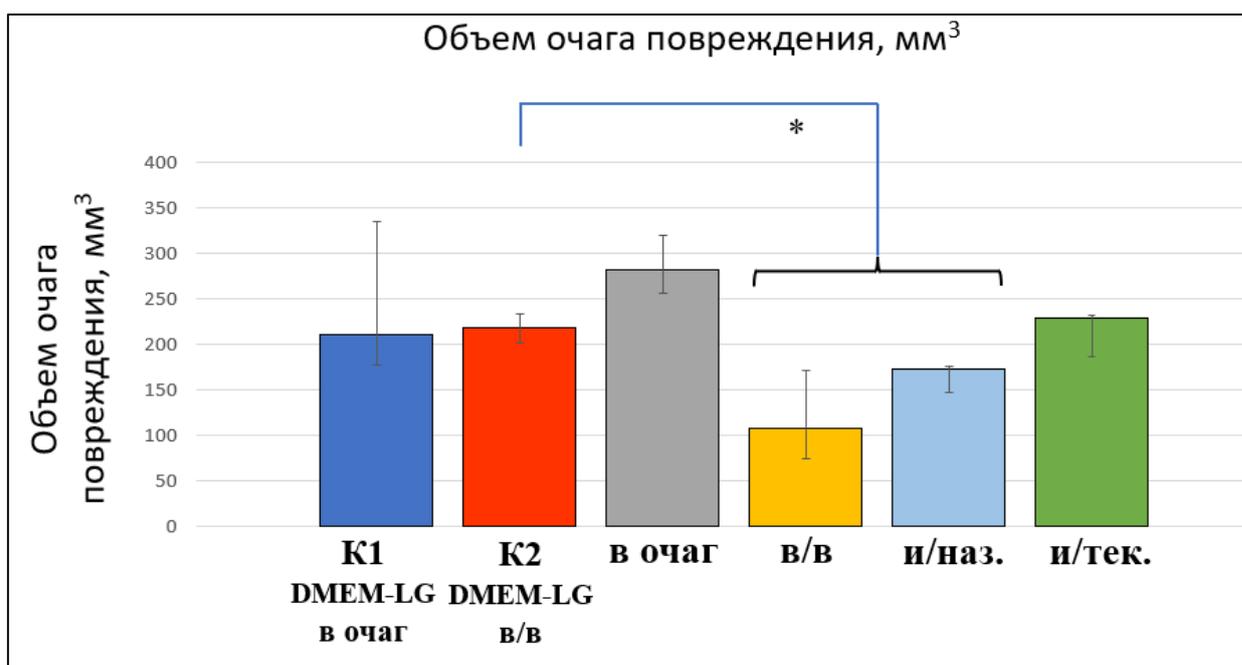
- 4) И/наз. – введение в ноздрю секрета МСК человека, сконцентрированного в 10 раз (по 50 мкл в каждую ноздрю);
- 5) К1 – контрольная группа 1, крысам вводилась бессывороточная среда DMEM-LG в очаг поражения (40 мкл);
- 6) К2 – контрольная группа 2, крысам вводилась бессывороточная среда DMEM-LG внутривенно (100 мкл).

Результаты исследования показывают, что секретом МСК сохраняет свое нейропротекторное действие на модели внутримозгового кровоизлияния наиболее полно при внутривенном введении. В данной экспериментальной группе у животных нами наблюдалась меньшая выраженность неврологических расстройств, чем в обеих контрольных группах (К1 и К2). Хотя статистически значимой разницы из-за небольшого размера выборки обнаружить не удалось. В группах с другими способами введения результаты оказались чуть хуже, чем при внутривенном введении. Результаты оценки неврологического статуса животных приведены на рис. 20.



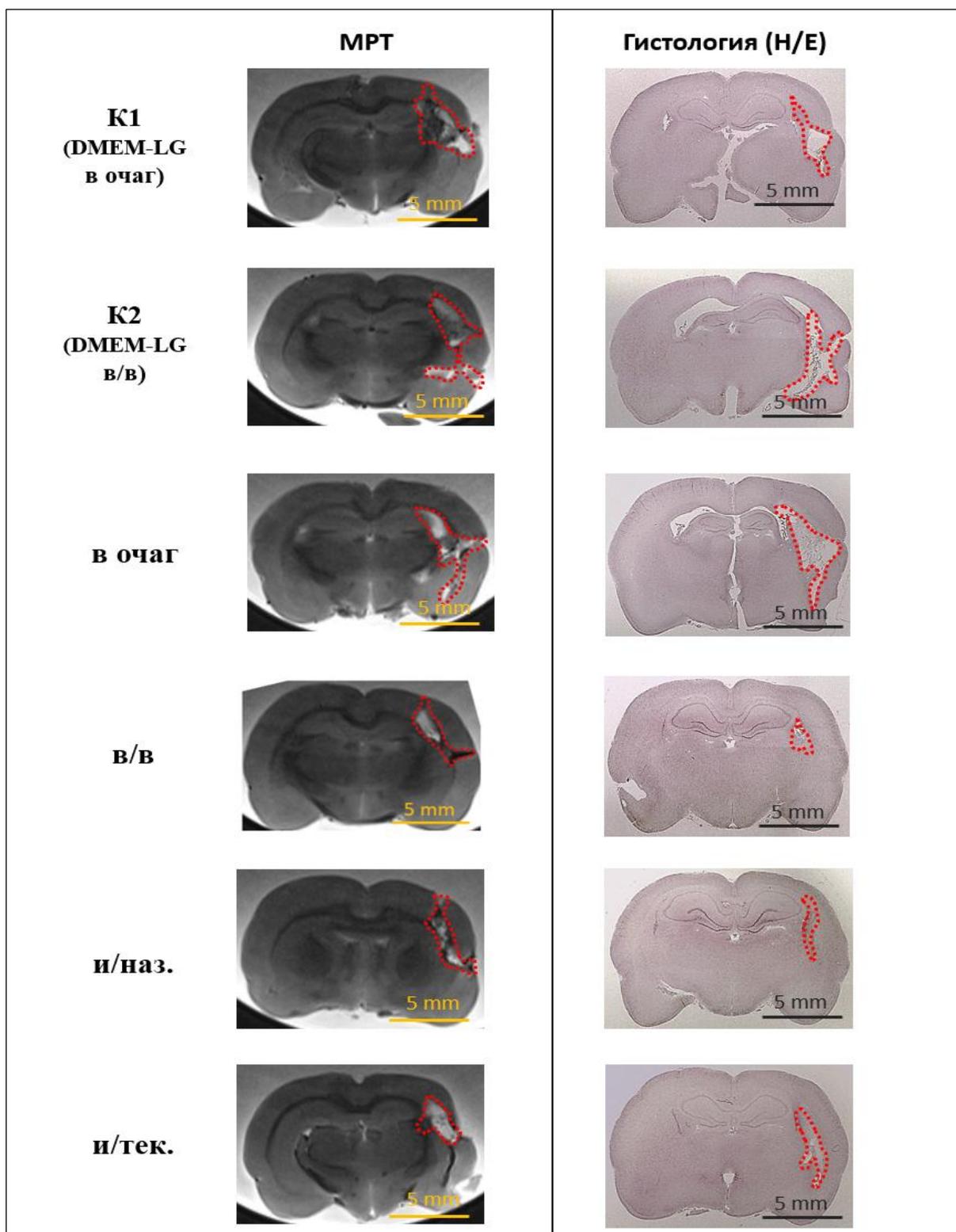
**Рис. 20** Оценка неврологических дефицитов у животных при различных путях введения секрета МСК на 3 и 10 сутки.

МРТ исследование показало, что внутривенное и интраназальное введение секрета МСК уменьшало объем поражения в 2 и 1,3 раза соответственно по сравнению с контрольной группой, которой проводилось внутривенное введение DMEM-LG (K2). Более того, согласно МРТ, внутривенное введение секрета МСК оказывает более выраженный нейропротекторный эффект, чем введение секрета непосредственно в очаг кровоизлияния (рис. 21). По-видимому, это связано с постепенным поступлением компонентов секрета из кровяного русла в очаг повреждения и, как следствие, меньшей активацией клеток микроглии в зоне повреждения (или, возможно, с другим, пока не установленным механизмом). Интратекальное введение секрета МСК не приводило к заметному уменьшению размера очага поражения.



**Рис. 21** Объем очага повреждения при различных путях введения секрета МСК (МРТ, 11 сутки, N = 5; \*- p < 0,05). Данные представлены в виде медианы (25%; 75%).

Полученные гистологические данные согласуются с результатами МРТ исследования (рис. 22).



**Рис. 22** Примеры очагов повреждения головного мозга через 14 суток после моделирования ГИ с последующим введением секрета МСК при различных путях введения (слева – МРТ изображение во фронтальной проекции T2-взвешенное; справа – гистологические срезы головного мозга тех же крыс в области гематомы, окрашенные гематоксилин-эозином).

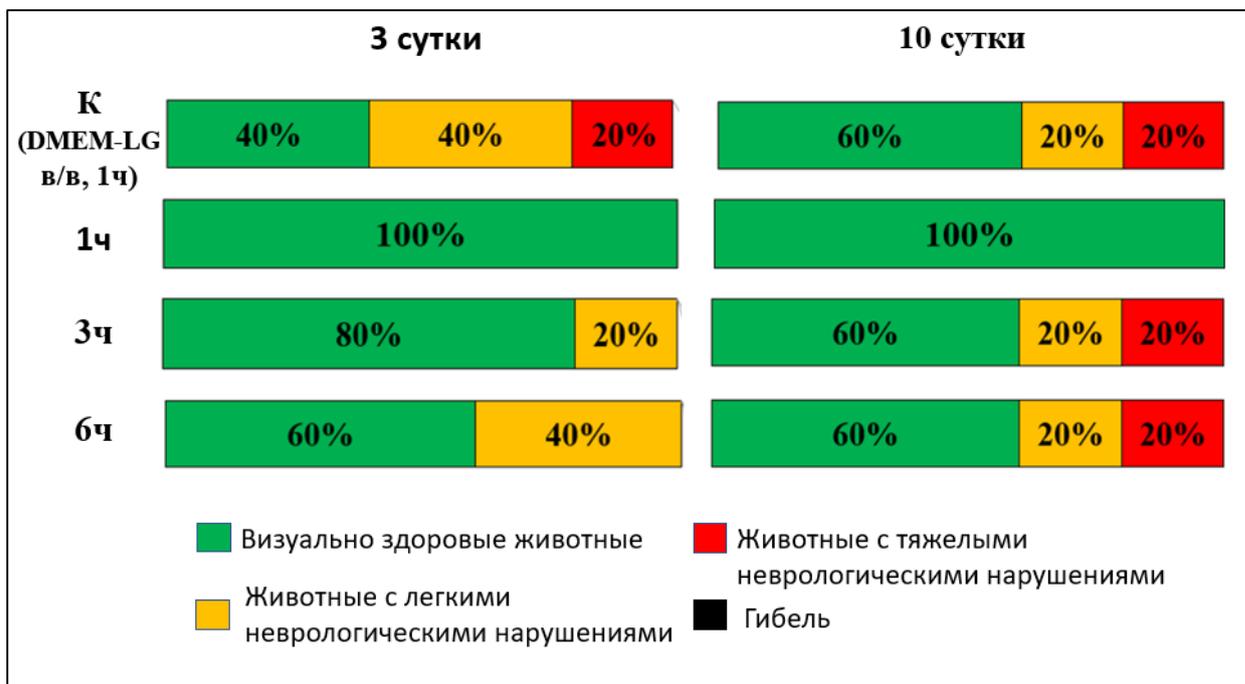
#### ***4.4.2 Определение оптимального временного интервала от индукции ГИ до введения секрета МСК***

Поскольку известно, что эффективность терапии инсультов во многом зависит от времени начала лечения после повреждения, было необходимо установить эффективное время от индукции ГИ на крысиной модели до начала терапевтических мероприятий (введение секрета МСК). Изучались временные точки 1, 3 и 6 часов после моделирования внутримозгового кровоизлияния. В качестве основного пути введения секрета МСК был избран внутривенный путь, оказавшийся оптимальным по результатам предыдущего этапа исследования. Состав экспериментальных групп выглядел следующим образом (количество крыс в каждой экспериментальной группе N=5):

- 1) 1ч – введение в хвостовую вену секрета МСК человека, сконцентрированного в 10 раз (100 мкл, через 1 час после ГИ);
- 2) 3ч – введение в хвостовую вену секрета МСК человека, сконцентрированного в 10 раз (100 мкл, через 3 часа после ГИ);
- 3) 6ч – введение в хвостовую вену секрета МСК человека, сконцентрированного в 10 раз (100 мкл, через 6 часов после ГИ);
- 4) К – контрольная группа введение в хвостовую вену бессывороточной среды DMEM-LG (100 мкл, через 1 час после ГИ).

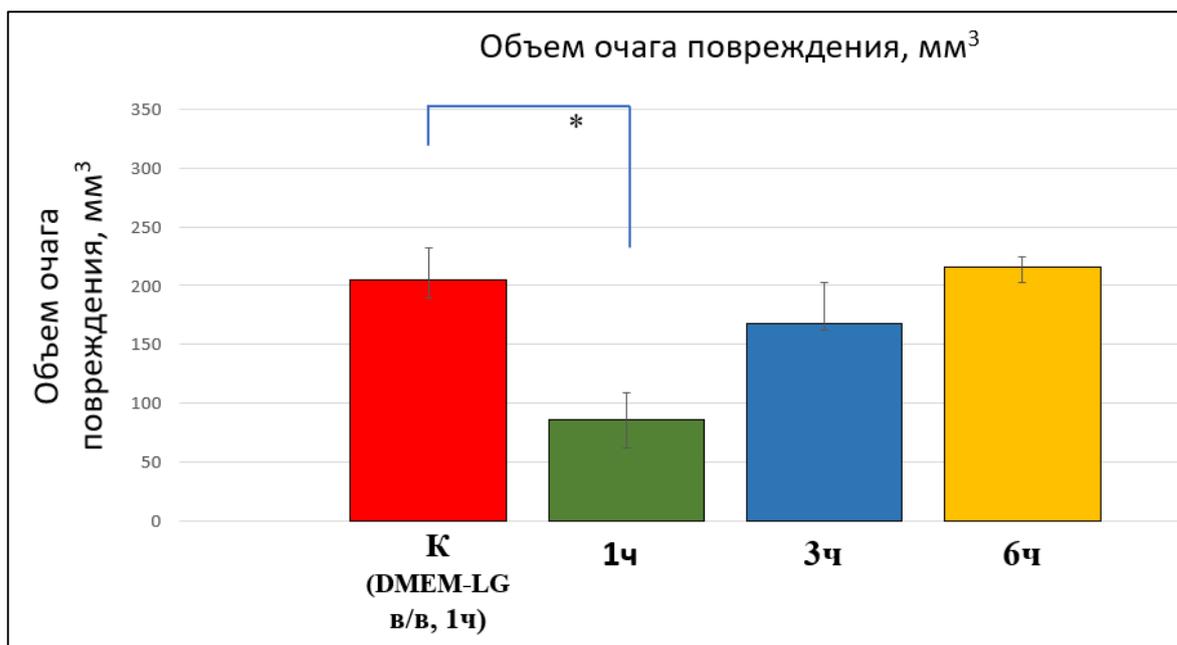
Наибольший нейропротекторный эффект наблюдался при внутривенном введении секрета МСК через 1 час после моделирования внутримозгового кровоизлияния: все пять подопытных животных этой группы не имели признаков неврологических расстройств в течение всего срока наблюдения. В контрольной же группе (внутривенное введение DMEM-LG) у 2 животных к концу эксперимента были зафиксированы неврологические нарушения (в том числе и тяжелые). В группах введения секрета через 3 часа и 6 часов после индукции ГИ неврологические дефициты у экспериментальных животных

нарастали и были сопоставимы с неврологическими показателями крыс из группы контроля, хотя наблюдаемые различия не являются статистически значимыми (из-за небольшой выборки).



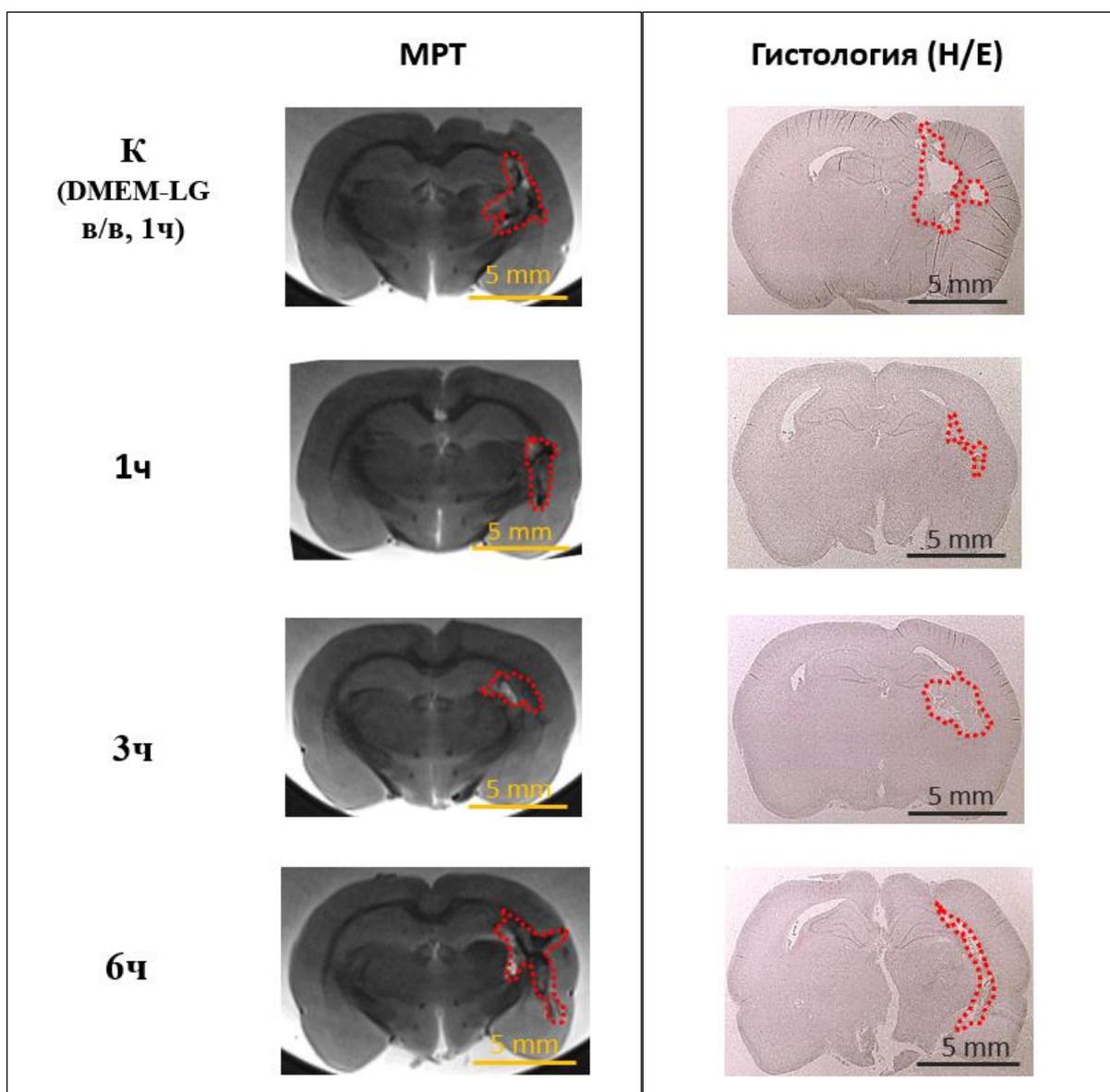
**Рис. 23** Результаты неврологической оценки животных с определением зависимости нейропротекторной активности секрета МСК от временного интервала с момента индукции ГИ до внутривенного введения на 3 и 10 сутки.

Увеличение временного интервала введения препарата после моделирования кровоизлияния снижало нейропротекторную функцию секрета МСК. Что также подтверждалось результатами МРТ исследования и гистологии. Так, объем поражения головного мозга в группах с внутривенным введением секрета МСК через 3 и 6 ч после моделирования кровоизлияния достиг 168 (162;203) и 216 (203;224) мм<sup>3</sup> соответственно. В экспериментальной группе, получившей инъекцию секрета МСК через 1 час после моделирования внутримозгового кровоизлияния, средний объем очага поражения головного мозга составлял 86 (62; 109) мм<sup>3</sup>. Данный показатель статистически значимо отличался от среднего объема очага поражения у животных в группе контроля со средним объемом поражения головного мозга 205 (189;232) мм<sup>3</sup> ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 24** Сравнение объемов очага повреждения при различных временных интервалах введения секрета МСК от момента индукции ГИ (МРТ, 11 сутки, N = 5; \*- p <0,05). Данные представлены в виде медианы (25%; 75%).

Результаты гистологического исследования коррелировали с данными МРТ-исследования (рис. 25).



**Рис. 25** Примеры очагов повреждения головного мозга через 14 суток после моделирования ГИ при различных временных интервалах введения секрета МСК от момента индукции ГИ (слева – МРТ изображение во фронтальной проекции T2-взвешенное; справа – гистологические срезы головного мозга тех же крыс в области гематомы, окрашенные гематоксилин-эозином).

Поскольку наибольшая нейропротекторная активность секрета МСК наблюдалась при его внутривенном введении через 1 час после моделирования внутримозгового кровоизлияния, такое сочетание способа и времени введения использовали при титровании дозы секрета МСК.

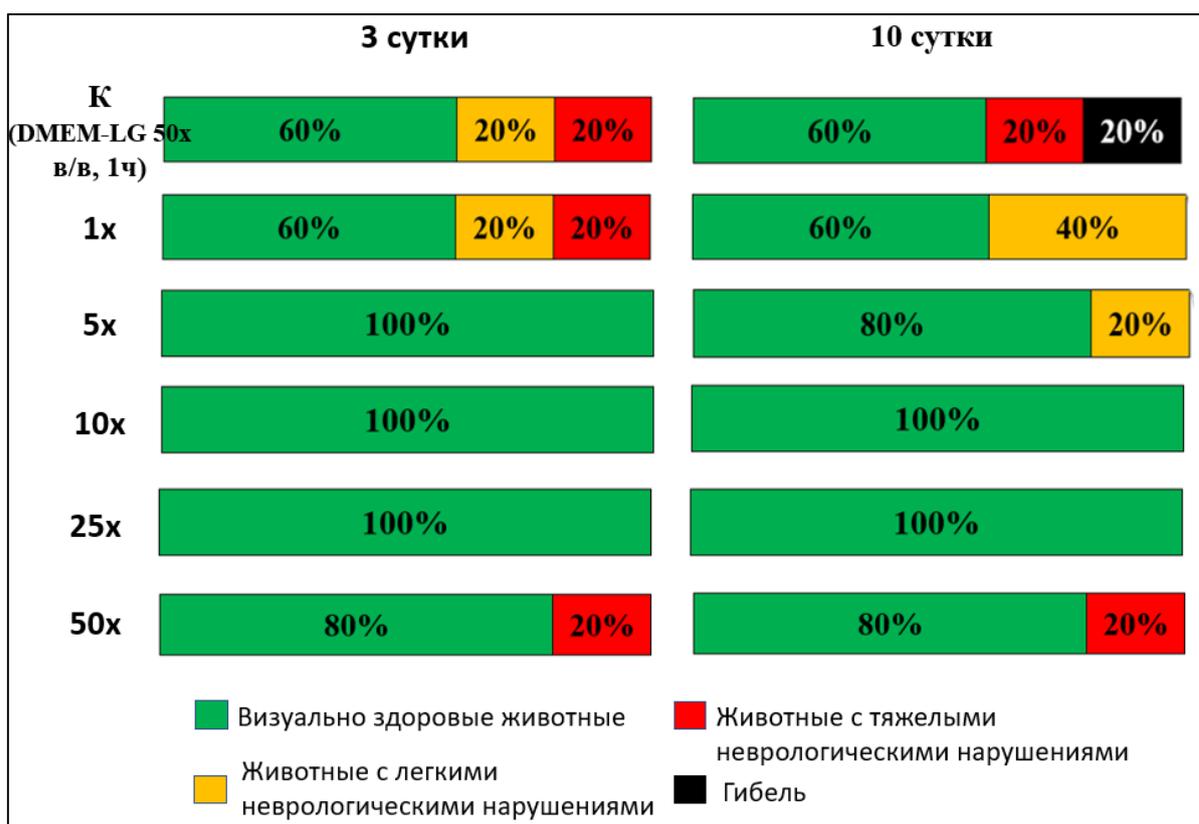
#### **4.4.3 Определение оптимального показателя концентрирования секрета МСК**

Следующим этапом изучения нейропротекторных свойств секрета МСК было установление его оптимальной дозы, т. е. концентрации секрета МСК, проявляющей наибольшую нейропротекцию при введении в постоянном объеме (внутривенное введение, объем = 100 мкл). Стандартизация состава секрета МСК проводилась по одному из основных нейропротекторных компонентов секрета – мозговому нейротрофическому фактору BDNF. Для неконцентрированного секрета МСК (1х) концентрации BDNF колеблются в пределах  $3 \pm 1,2$  нг/мл. Для образцов секрета МСК, концентрированных в 5, 10, 25 и 50 раз (5х, 10х, 25х, 50х соответственно), концентрация BDNF достигала 15 нг/мл, 30 нг/мл, 75 нг/мл и 150 нг/мл. соответственно. Концентрирование проводили с использованием центрифужных концентраторов (ультрафильтры, 10 кДА). В качестве контроля нами была использована среда DMEM-LG, также сконцентрированная в 50 раз. Состав экспериментальных групп выглядел следующим образом (количество крыс в каждой экспериментальной группе N=5):

- 1) 1х – введение в хвостовую вену секрета МСК человека неконцентрированного (100 мкл, через 1 час после ГИ);
- 2) 5х – введение в хвостовую вену секрета МСК человека, сконцентрированного в 5 раз (100 мкл, через 1 час после ГИ);
- 3) 10х – введение в хвостовую вену секрета МСК человека, сконцентрированного в 10 раз (100 мкл, через 1 час после ГИ);
- 4) 25х – введение в хвостовую вену секрета МСК человека, сконцентрированного в 25 раз (100 мкл, через 1 час после ГИ);
- 5) 50х – введение в хвостовую вену секрета МСК человека, сконцентрированного в 50 раз (100 мкл, через 1 час после ГИ);

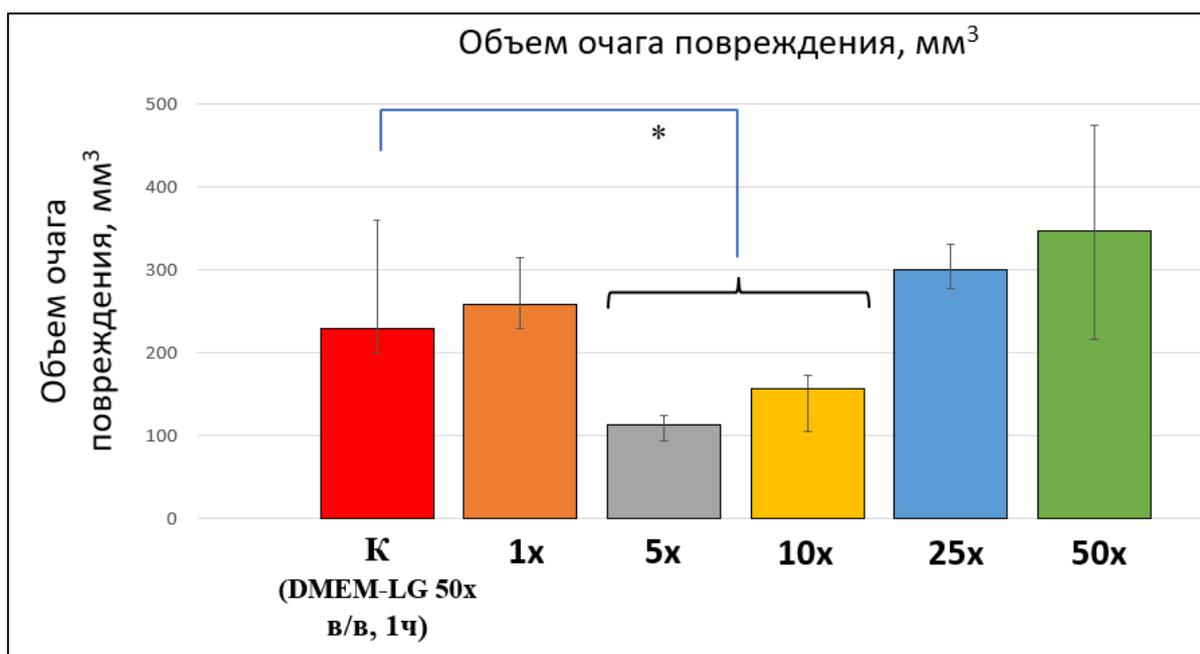
б) К – контрольная группа, введение в хвостовую вену бессывороточной среды DMEM-LG 50x (100 мкл, через 1 час после ГИ).

Исследование показало, что секретом МСК, сконцентрированный в 5, 10, 25 и 50 раз, проявлял нейропротекторный эффект и уменьшал выраженность неврологических нарушений у оперированных крыс по сравнению с контрольной группой, хотя наблюдаемые различия не являются статистически значимыми. (из-за малых размеров выборки). И только в группах введения 1x и 50x секретомов МСК были животные с неврологическими дефицитами. В то же время в контрольной группе на 10 сутки эксперимента был один летальный исход и 1 случай проявления тяжелой неврологической картины. Но надо заметить, что в данном представлении результатов неврологической оценки нет достоверных различий между группами в следствие небольших размеров выборки.



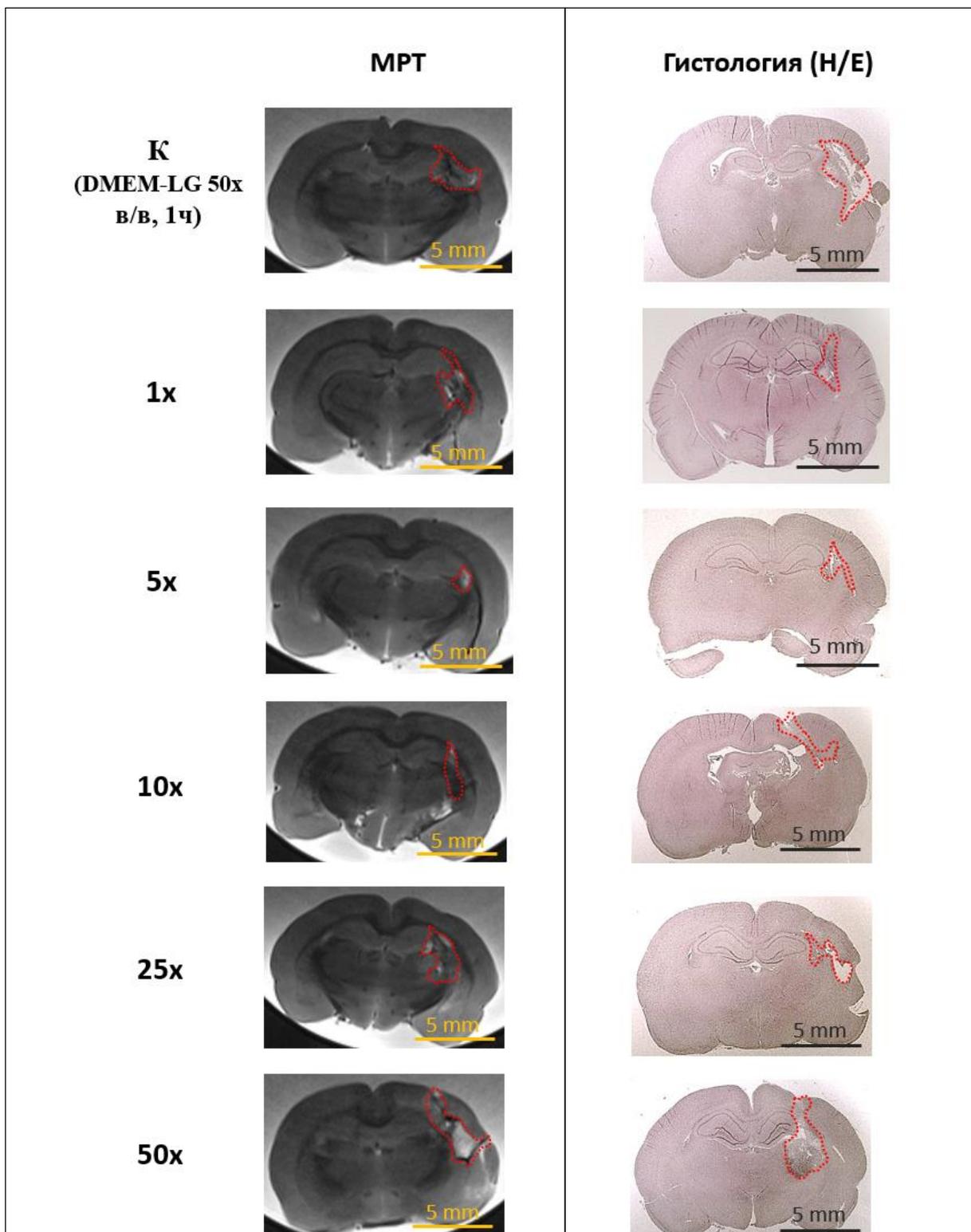
**Рис. 26** Результаты неврологической оценки животных на 3 и 10 сутки с определением зависимости нейропротекторной активности секрета МСК в различных степенях концентрирования.

По данным МРТ-исследования, наибольшим нейропротекторным эффектом обладал секретом МСК, сконцентрированный в 5 и 10 раз. Так, внутривенное введение 5-кратного или 10-кратного секретомов МСК через 1 ч после моделирования внутримозгового кровоизлияния приводило к уменьшению объема поражения мозговой ткани до 113 (93;124) мм<sup>3</sup> и 156 (104;172) мм<sup>3</sup> соответственно при среднем объеме поражения 229 (199; 359) мм<sup>3</sup> в контрольной группе. Неконцентрированный 1х секретом МСК не показал значимого нейропротекторного действия, что согласуется с ранее полученными данными. Секретом МСК, сконцентрированный в 25 и 50 раз, напротив, увеличивал объем поражения головного мозга до 299 (277;330) мм<sup>3</sup> и 347 (215;474) мм<sup>3</sup> соответственно.



**Рис. 27** Объем очага повреждения при введении секрета МСК в различных степенях концентрирования (МРТ, 11 сутки, N = 5; \*- p <0,05). Данные представлены в виде медианы (25%; 75%).

Результаты гистологического исследования коррелировали с данными МРТ-исследования (рис. 28).



**Рис. 28** Примеры очагов повреждения головного мозга через 14 суток после моделирования ГИ при введении секрета МСК в различных степенях концентрирования (слева – МРТ изображение во фронтальной проекции T2-взвешенное; справа – гистологические срезы головного мозга тех же крыс в области гематомы, окрашенные гематоксилин-эозином).

Таким образом наибольший нейропротекторный эффект в модели интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагический инсульт) оказало введение сконцентрированного в 10 раз секрета МСК (10х, с содержанием BDNF примерно 30 нг/мл) при внутривенном введении во временном интервале 1–3 часа после моделирования ГИ.

## Глава 5. Обсуждение результатов

Геморрагический инсульт – это тяжелое заболевание, требующее разработки новых терапевтических подходов, поскольку существующие препараты обеспечивают только симптоматическую терапию и практически не влияют на основные звенья патогенеза внутримозгового кровоизлияния, такие как: процессы нейровоспаления, окислительный стресс, глутамат-опосредованная эксайтотоксичность, токсическое действие компонентов крови (ферроптоз, токсические эффекты тромбина) и другие механизмы, приводящие к развитию вторичного повреждения ткани мозга после ВМК (Keep et al., 2012; Ren et al., 2020; Shao et al., 2019). В связи с тем, что ни один из механизмов вторичного повреждения нервной ткани при ГИ не является основным и абсолютно превалирующим над остальными, то очевидно, что комплексное воздействие на большинство из звеньев патогенеза способно привести к более перспективным терапевтическим подходам, в отличие от монокомпонентной терапии.



**Рис. 29** Влияние секрета МСК на последовательность клеточных и тканевых ответов при ГИ.

Применение клеточной терапии МСК имеет ряд ограничений, связанных в первую очередь с распределением клеток в различных органах при любом способе трансплантации клеток кроме интрацеребрального (применение хирургических методов не всегда клинически оправдано при ГИ). В то же время бесклеточный препарат на основе секрета МСК, позволяет избежать ограничений клеточной терапии и содержит необходимый набор факторов, способных оказывать воздействие как на процессы нейровоспаления (подавляя их), так и осуществлять нейротрофическую поддержку ткани мозга в очаге повреждения. Кроме того, важно учесть потенцирующее влияние некоторых факторов в составе секрета. Ранее нами было показано усиление нейротрофического эффекта одного из основных факторов нейропротекции в составе секрета МСК – мозгового нейротрофического фактора (BDNF) – при совместном присутствии с uPA (урокиназным активатором плазминогена) (Dzhauari et al., 2022). Такой эффект, предположительно связан с ограниченным протеолизом pro-BDNF и преобразованием его в зрелую форму BDNF, имеющую преимущественное сродство к рецептору TrkB, а не к опосредующим апоптоз рецепторам p75 (Gray, Ellis 2008). Наличие в составе секрета МСК совокупности нейротрофических, проангиогенных, противовоспалительных факторов, способных действовать синергично на различные патогенетические звенья ГИ, делает секретом МСК перспективным терапевтическим инструментом при ОНМК по геморрагическому типу.

Для оценки нейропротекторного эффекта секрета МСК при ГИ необходимо было выбрать наиболее релевантную экспериментальную модель. Важно заметить, что ни одна экспериментальная модель не может на 100% соответствовать клинической картине ГИ. Различные модели могут достаточно хорошо демонстрировать некоторые клинически значимые аспекты этого патологического состояния, но при интерпретации результатов следует учитывать их ограничения. Идеальная модель должна приводить к воспроизводимым объемам кровоизлияния, приводить к образованию

гематомы с механизмами, достаточно хорошо имитирующим патофизиологическое течение ГИ, иметь возможность моделировать образование гематомы в различных областях мозга минимальными вариациями модели, быть легко выполнимой при приемлемой стоимости и с небольшими требованиями к оператору модели. Существует несколько доклинических моделей, каждая из которых более или менее соответствует указанным критериям. Хотя мы концентрируемся на моделях ГИ на грызунах, но для этой цели также использовались различными научными коллективами и другие виды, например кролик, кошка, собака, свинья и приматы (Coulter, Gooch 1993; Del Zoppo et al., 1986; Kaufman et al., 1985; Kobari et al., 1988). Наиболее часто используемые модели интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) включают инъекцию аутологичной крови или инъекцию коллагеназы. Кроме того, существуют модели раздувания баллона и авульсия церебральных кровеносных сосудов. Модели инъекции крови и коллагеназы технически схожи. Они просты в исполнении и воспроизводимы; размер гематомы в этих двух моделях хорошо контролируется, поэтому данные модели широко применимы исследовательскими группами для моделирования ВМК. В то же время модель раздувания баллона менее распространенная модель ВМК. Ее используют для изучения массово-объемного влияния гематомы и ее удаления при геморрагическом повреждении головного мозга. Экспериментальная модель авульсии кровеносных сосудов также достаточно редко применяется в исследовательской практике. В рамках данной модели коркового повреждения поверхностные кортикальные кровеносные сосуды обнажены, а разрыв вен приводит к кортикальному внутримозговому кровоизлиянию (Funnell et al., 1990; Hue, Del Bigio 2003). В модели авульсии кровеносных сосудов инфильтрация нейтрофилами очага поражения заметно меньше, чем в моделях с инъекцией аутологичной крови или коллагеназы. Кроме того, авульсия сосудов ограничивает экспериментатора в выборе зоны повреждения головного мозга (только кортикальные гематомы с поверхностным

расположением). Таким образом, сравнительный анализ экспериментальных моделей на основе литературных данных привел нас к выводу о том, что наиболее релевантной экспериментальной моделью интрацеребральной посттравматической гематомы является модель инъекции аутологичной крови. Она достаточно хорошо имитирует внутримозговое кровоизлияние, и все звенья патогенеза при ВМК. Важным фактором в выборе данной модели являлось также то, что данная экспериментальная модель рекомендована в руководстве по доклиническим исследованиям.

В рамках данной доклинической модели кровь животного, собранная из легкодоступной артерии, вводится в выбранную область мозга. Кровь можно вводить практически в любую область мозга; однако инъекция крови в кору часто осложняется субарахноидальным кровоизлиянием (Xue, Del Bigio 2000). Введение крови в область внутренней капсулы напротив считается наиболее удачным вариантом, поскольку внутренняя капсула головного мозга (*capsula interna*) содержит множество нервных трактов, которые соединяют кору с базальными ганглиями, ядрами спинного мозга и черепными нервами. Следовательно, деструкция нервной ткани в данной области вызывает различные неврологические нарушения, тяжесть которых коррелирует со степенью повреждения головного мозга. Что касается объема вводимой крови, существует широкий диапазон, различающийся у разных исследовательских групп; наиболее часто используются объемы до 50 мкл, что соответствует среднему размеру гематом у человека (примерно 30 мл). Такое количество крови при медленном введении приводит к гематомам, которые обычно не просачиваются в другие отделы, кроме желаемого (например, внутрижелудочковое, субарахноидальное или субдуральное пространство). Хотя некоторые исследователи вводят большие объемы (до 100 мкл) крови, такой подход может повысить ВЧД и привести к осложнениям в послеоперационном периоде (Kingman et al., 1988). Исследовательский опыт показал, что 20 мкл крови, вводимые медленно в намеченную заранее область

головного мозга, обеспечивало достаточно хорошую воспроизводимость объемов гематом и использовалось нами в серии экспериментов. Вводилась аутологичная кровь в паренхиму мозга медленно, после чего игла удерживалась на месте еще какое-то время. Струйные инъекции больших объемов приводили к обратному току введенной крови по следу иглы, а также повреждению тканей на большей площади чем планировалось, или даже к прорыву в желудочки головного мозга (внутрижелудочковое кровоизлияние) и утечке по мозолистому телу. Модель ИПГ ассоциирована с относительно не высоким показателем смертности (примерно 20–30%), что позволяло успешно фиксировать различие между контрольной и экспериментальными группами в показателе выживаемость.

На первом этапе исследования нами было показано, что введение секрета МСК в очаг внутримозгового кровоизлияния способствует выживанию экспериментальных животных, снижению тяжести неврологических нарушений и уменьшению очага повреждения мозговой ткани (Karagyaour et al., 2021).

Выявление нейропротекторного эффекта секрета МСК инициировало углубленное исследование по установлению механизма действия. В ходе проведенных исследований *in vitro* и *in vivo* были установлены следующие механизмы нейропротекторного действия секрета МСК:

- прямая нейропротекция в модели глутамат-опосредованной нейротоксичности;
- влияние на активацию моноцитов/макрофагов периферической крови и смещение их поляризации в сторону противовоспалительного М2 фенотипа, подавление поляризации в М1 (провоспалительный) фенотип;
- влияние на процессы активации фагоцитоза в перигематомном пространстве
- важность роли BDNF и uPA в осуществлении процессов нейропротекции.

Можно полагать, учитывая плейотропность биологических факторов, входящих в состав секрета МСК, и другие механизмы, обеспечивающие нейропротекцию.

На следующем этапе исследования нами был проведен анализ нейротрофической активности секрета МСК при различных путях введения, дозах и режимах введения на модели ГИ крыс. Прежде всего, мы показали, что секретом МСК сохраняет свою нейропротекторную активность при различных путях введения. Так, внутривенное и интраназальное введение секрета МСК человека стимулирует нейропротекцию мозговой ткани на модели внутримозгового кровоизлияния и значительно уменьшает объем очага поражения по сравнению с внутримозговым введением. По-видимому, это может быть связано с тем, что потенциально иммуногенные компоненты секрета человека при подобном способе введения оказывают не моментальное, а постепенное и ограниченное действие на иммунокомпетентные клетки головного мозга (микроглию).

По совокупности исследуемых параметров (выживаемость, неврологическая оценка животных в экспериментальных группах, размеры очага поражения по данным МРТ и гистологическому анализу срезов в месте повреждения ткани мозга) нами был избран для дальнейших испытаний внутривенный способ введения секрета МСК. Более того это согласуется с исследованиями, демонстрирующими способность ряда белковых факторов, а также микровезикул в составе секрета МСК проникать через ГЭБ и оказывать прямую нейропротекцию (Ghasempour et al., 2022; Khan et al., 2022; Matsuno et al., 2022; Wu et al., 2022; Yari et al., 2022). Важно подчеркнуть тот факт, что проницаемость ГЭБ также повышается после ВМК, что только улучшает доставку компонентов секрета в очаг поражения (Keer et al., 2008; Qiu et al., 2021). Помимо механизма прямой нейропротекции секретом МСК при внутривенном введении способен оказывать противовоспалительное и иммуномодулирующее действие за счет подавления активации клеток

моноцитарно-макрофагального компонента крови и тем самым подавлять лейкоцитарную инфильтрацию гематомы и перигематомного пространства.

Интраназальный способ введения был также рассмотрен нами в отношении секрета МСК. Данный способ введения ЛП имеет ряд преимуществ, одно из которых – возможность преодоления ГЭБ, а также технологическое удобство и данного метода (Lochhead et Thorne, 2012). Но также существуют значимые недостатки, такие как мукоцилиарный клиренс, действие протеаз и РНКаз слизистой поверхности носовой полости, а также относительно быстрое удаление вещества с поверхности слизистой оболочки (Kashyap et Shukla, 2019). Хотя интраназальный способ введения также показал статистически значимое ограничение размеров поврежденной мозговой ткани в сравнении с группами контроля, но неврологические нарушения у крыс в данной группе, а также ограничения описанные выше способствовали отказу от данного способа введения секрета МСК в пользу внутривенного.

Другим широко используемым методом введения ЛП при неврологических заболеваниях является интратекальное введение. Однако в нашем исследовании интратекальное введение секрета МСК не обеспечило какой-либо нейропротекции на модели ГИ крыс. Вероятно, компоненты секрета просто не достигли пораженной нервной ткани из-за существенного расстояния между местом инъекции (L5-S1 позвонки спинного мозга) и очагом кровоизлияния в головном мозге, а также из-за рострально-каудального направления тока ликвора.

Известно, что эффективность терапии острых нарушений мозгового кровообращения во многом определяется своевременностью терапевтических мероприятий. Мы показали, что внутривенное введение секрета МСК в течение 1 часа после моделирования ВМК обеспечивает наилучший исход в экспериментальных группах животных и приводит к существенному снижению неврологических расстройств и наименьшим объемам очага

поражения. С увеличением временного интервала между началом индукции патологии и внутривенным введением секрета МСК (с 1 до 6 часов) снижалась эффективность нейропротекции, что коррелировало с литературными данными и проявлялось в ухудшении неврологической картины в экспериментальных группах и увеличению размеров очага поражения мозговой ткани.

Определение оптимальной дозы также является одной из важных задач нашего исследования. Нами было показано, что оптимальный терапевтический эффект наблюдается при использовании секрета МСК 5- или 10-кратно сконцентрированных (с содержанием BDNF 1,5 нг/мл и 3 нг/мл соответственно) при внутривенном введении крысам через 1 час после моделирования внутримозгового кровоизлияния. Неконцентрированный секрет МСК (с содержанием BDNF 0,3 нг/мл) не проявлял значимого нейропротекторного эффекта, а внутривенное введение секрета МСК, сконцентрированного в 25 или 50 раз (с содержанием BDNF 7,5 нг/мл и 15 нг/мл соответственно), напротив, приводило к увеличению очага поражения мозговой ткани по данным МРТ и гистологии. Предположительно, данный эффект может объясняться концентрационным уровнем определенных факторов роста или цитокинов и хемокинов, которые действуют в достаточно узком терапевтическом диапазоне. Так, ранее было показано, что эффекты избыточного содержания BDNF (или преобладание его незрелой про-формы) приводит к передаче сигнала через альтернативный рецептор p75 и к последующему апоптозу нервных клеток, а не к их нейропротекции (Miranda-Lourenço et al., 2020; Teng et al., 2005). Подобная зависимость (увеличение эффективности с дозой, затем достижение «эффекта плато» и последующие токсические эффекты с повышением концентрации) от введения разных доз МСК или их секрета неоднократно наблюдалась в других экспериментах, что свидетельствует в пользу универсальности этого явления. Роль отдельных компонентов секрета, определяющих токсический эффект при

существенном концентрировании, а также механизмы этого явления еще предстоит установить, однако мы не исключаем, что в его основе лежат эффекты избыточного количества нейротрофических или иных ростовых факторов. Примечательно, что среда DMEM-LG (контрольная группа), сконцентрированная в 50 раз, не оказывала значимого действия (защитного или токсического) на регенерацию мозговой ткани в модели ГИ крыс. Это свидетельствует о том, что наблюдаемые нейропротекторные и токсические эффекты обусловлены исключительно специфическим действием определенных компонентов секрета МСК.

## Выводы

- 1) Исследован белково-пептидный профиль секрета МСК и установлено содержание ключевых факторов, опосредующих его нейротрофический эффект.
- 2) Продемонстрирован выраженный нейропротекторный эффект секрета МСК, проявляющийся в улучшении показателей выживаемости и неврологического статуса, а также уменьшении размеров очага повреждения при моделировании интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) крыс, тогда как препарат сравнения церебролизин уступает секрету МСК по всем изученным показателям.
- 3) Показана зависимость нейропротекторной активности от видоспецифичности секрета МСК. Так, по показателям «выживаемость» и «неврологический статус» различий в группах с введением как ксеногенного (источник МСК жировой ткани человека), так и аллогенного секрета МСК (источник МСК жировой ткани крысы) не наблюдали. Вместе с тем, интрацеребральное введение ксеногенного секрета МСК приводило к увеличению очага повреждения в отличие от введения аллогенного секрета МСК.
- 4) Установлено, что одним из механизмов нейропротекторного эффекта секрета МСК является способность подавлять гибель нейтральных клеток в условиях глутамат-индуцируемой токсичности. Секретом МСК не оказывал влияния на нейритогенез.
- 5) Секретом МСК эффективно препятствует поляризации клеток моноцитов/макрофагов в провоспалительный М1-фенотип и стимулирует поляризацию клеток моноцитов/макрофагов в противовоспалительный М2-фенотип, что свидетельствует о наличии у секрета противовоспалительных свойств.

б) Продemonстрировано наличие нейропротекторного эффекта секрeтoма МСК при внутривенном и интраназальном введении крысам с интрацеребральной посттравматической гематомой. При этом наибольшая эффективность секрeтoма МСК наблюдалась при внутривенном введении крысам спустя 1 час после индукции патологии.

## Глава 6. Список цитируемой литературы

1. Ефименко А. Ю. и др. Влияние гипоксии и воспалительных факторов на жизнеспособность и ангиогенную активность мезенхимных стромальных клеток из жировой ткани и костного мозга //Цитология. – 2010. – Т. 52. – №. 2. – С. 144-154.
2. Миронов А. Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств //М.: Гриф и К. – 2012. – Т. 944.
3. Abeti R., Abramov A. Y. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in neurodegenerative disorders //Pharmacological research. – 2015. – Т. 99. – С. 377-381.
4. Adeoye O., Broderick J. P. Advances in the management of intracerebral hemorrhage //Nature Reviews Neurology. – 2010. – Т. 6. – №. 11. – С. 593–601.
5. Aguilar M. I., Freeman W. D. Spontaneous intracerebral hemorrhage //Seminars in neurology. – © Thieme Medical Publishers, 2010. – Т. 30. – №. 05. – С. 555–564.
6. Ahn S. Y. et al. Brain-derived neurotrophic factor mediates neuroprotection of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles against severe intraventricular hemorrhage in newborn rats //Stem Cells Translational Medicine. – 2021. – Т. 10. – №. 3. – С. 374-384.
7. Ahn S. Y. et al. Pivotal role of brain-derived neurotrophic factor secreted by mesenchymal stem cells in severe intraventricular hemorrhage in newborn rats //Cell Transplantation. – 2017. – Т. 26. – №. 1. – С. 145-156.
8. Al Fauzi A. et al. Intraventricular transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells via ommaya reservoir in persistent vegetative state patients after haemorrhagic stroke: report of two cases & review of the literature //Journal of stem cells & regenerative medicine. – 2016. – Т. 12. – №. 2. – С. 100.
9. Aleksandrushkina N. A. et al. Cell sheets of mesenchymal stromal cells effectively stimulate healing of deep soft tissue defects //Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2019. – Т. 167. – С. 159-163.
10. Amarglio N. et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient //PLoS medicine. – 2009. – Т. 6. – №. 2. – С. e1000029.
11. Andrzejewska A., Lukomska B., Janowski M. Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost //Stem cells. – 2019. – Т. 37. – №. 7. – С. 855-864.
12. Aronowski J., Zhao X. Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: secondary brain injury //Stroke. – 2011. – Т. 42. – №. 6. – С. 1781-1786.

13. Astori G. et al. " In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells //Journal of Translational Medicine. – 2007. – T. 5. – №. 1. – C. 1-10.
14. Baker E. W., Kinder H. A., West F. D. Neural stem cell therapy for stroke: A multimechanistic approach to restoring neurological function //Brain and behavior. – 2019. – T. 9. – №. 3. – C. e01214.
15. Bao X. et al. Transplantation of Flk-1+ human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats //European Journal of Neuroscience. – 2011. – T. 34. – №. 1. – C. 87-98.
16. Barber M. J. et al. Interruption of sympathetic and vagal-mediated afferent responses by transmural myocardial infarction //Circulation. – 1985. – T. 72. – №. 3. – C. 623-631.
17. Basalova N. et al. Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated microRNAs within extracellular vesicles //Cells. – 2020. – T. 9. – №. 5. – C. 1272.
18. Behrouz R. Re-exploring tumor necrosis factor alpha as a target for therapy in intracerebral hemorrhage //Translational stroke research. – 2016. – T. 7. – C. 93-96.
19. Bhatia H. S. et al. Rice bran derivatives alleviate microglia activation: possible involvement of MAPK pathway //Journal of Neuroinflammation. – 2016. – T. 13. – C. 1-16.
20. Bimpis A. et al. Neuronal tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  expression in a porcine model of intracerebral haemorrhage: Modulation by U-74389G //Brain research. – 2015. – T. 1615. – C. 98-105.
21. Brouwers H. B., Greenberg S. M. Hematoma expansion following acute intracerebral hemorrhage //Cerebrovascular diseases. – 2013. – T. 35. – №. 3. – C. 195-201.
22. Cai L. et al. IFATS collection: human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function //Stem cells. – 2009. – T. 27. – №. 1. – C. 230-237.
23. Cai Y. et al. Stroke treatment: Is exosome therapy superior to stem cell therapy? //Biochimie. – 2020. – T. 179. – C. 190-204.
24. Cao S. et al. Hematoma changes during clot resolution after experimental intracerebral hemorrhage //Stroke. – 2016. – T. 47. – №. 6. – C. 1626-1631.
25. Caplan A. I., Correa D. The MSC: an injury drugstore //Cell stem cell. – 2011. – T. 9. – №. 1. – C. 11-15.

26. Chang Z. et al. Cell therapy for cerebral hemorrhage: five year follow-up report //Experimental and Therapeutic Medicine. – 2016. – T. 12. – №. 6. – C. 3535-3540.
27. Chen J. et al. Inhibition of AGEs/RAGE/Rho/ROCK pathway suppresses non-specific neuroinflammation by regulating BV2 microglial M1/M2 polarization through the NF- $\kappa$ B pathway //Journal of neuroimmunology. – 2017. – T. 305. – C. 108-114.
28. Chen M. et al. The inhibitory effect of mesenchymal stem cell on blood–brain barrier disruption following intracerebral hemorrhage in rats: contribution of TSG-6 //Journal of Neuroinflammation. – 2015. – T. 12. – №. 1. – C. 1-14.
29. Chen T. F. et al. Dental pulp stem cell-derived factors alleviate subarachnoid hemorrhage-induced neuroinflammation and ischemic neurological deficits //International journal of molecular sciences. – 2019. – T. 20. – №. 15. – C. 3747.
30. Cheng Y. et al. Thrombin-induced cerebral hemorrhage: role of protease-activated receptor-1 //Translational stroke research. – 2014. – T. 5. – C. 472-475.
31. Choi B. Y. et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells reduce mortality and hematoma size in a rat intracerebral hemorrhage model in an acute phase //Stem Cells International. – 2018. – T. 2018.
32. Chung C. S. et al. A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells //Journal of Veterinary Medical Science. – 2013. – T. 75. – №. 7. – C. 879-886.
33. Clevers H., Loh K. M., Nusse R. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control //science. – 2014. – T. 346. – №. 6205. – C. 1248012.
34. Cohnheim J., Beneke R. Ueber entzündung und eiterung. – JA Barth, 1914. – T. 23.
35. Cordonnier C. et al. Intracerebral haemorrhage: current approaches to acute management //The Lancet. – 2018. – T. 392. – №. 10154. – C. 1257-1268.
36. Cordonnier C., Al-Shahi Salman R., Wardlaw J. Spontaneous brain microbleeds: systematic review, subgroup analyses and standards for study design and reporting //Brain. – 2007. – T. 130. – №. 8. – C. 1988 – 2003.
37. Cordonnier C., van der Flier W. M. Brain microbleeds and Alzheimer's disease: innocent observation or key player? //Brain. – 2011. – T. 134. – №. 2. – C. 335–344.
38. Coulter D. M., Gooch M. Falling intracranial pressure: an important element in the genesis of intracranial hemorrhage in the beagle puppy //Neonatology. – 1993. – T. 63. – №. 5. – C. 316-326.

39. Crisan M. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs //Cell stem cell. – 2008. – T. 3. – №. 3. – C. 301-313.
40. da Silva Meirelles L. et al. MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue //Tissue Engineering Part A. – 2009. – T. 15. – №. 2. – C. 221-229.
41. Dang J. et al. Nrf2 expression by neurons, astroglia, and microglia in the cerebral cortical penumbra of ischemic rats //Journal of Molecular Neuroscience. – 2012. – T. 46. – C. 578-584.
42. Del Zoppo G. J. et al. The beneficial effect of intracarotid urokinase on acute stroke in a baboon model //Stroke. – 1986. – T. 17. – №. 4. – C. 638-643.
43. Delcourt C. et al. Hematoma growth and outcomes in intracerebral hemorrhage: the INTERACT1 study //Neurology. – 2012. – T. 79. – №. 4. – C. 314-319.
44. Deliran S. S., Brouwer M. C., van de Beek D. Intracerebral haemorrhage in bacterial meningitis //Journal of Infection. – 2022. – T. 85. – №. 3. – C. 301–305.
45. Deng L. et al. Effects of GDNF-transfected marrow stromal cells on rats with intracerebral hemorrhage //Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2019. – T. 28. – №. 9. – C. 2555-2562.
46. Ding D. C., Shyu W. C., Lin S. Z. Mesenchymal stem cells //Cell transplantation. – 2011. – T. 20. – №. 1. – C. 5-14.
47. Ding R. et al. Therapeutic benefits of mesenchymal stromal cells in a rat model of hemoglobin-induced hypertensive intracerebral hemorrhage //Molecules and Cells. – 2017. – T. 40. – №. 2. – C. 133.
48. Doepfner T. R. et al. Effects of neural progenitor cells on post-stroke neurological impairment—a detailed and comprehensive analysis of behavioral tests //Frontiers in cellular neuroscience. – 2014. – T. 8. – C. 338.
49. Dominici M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement //Cytotherapy. – 2006. – T. 8. – №. 4. – C. 315-317.
50. Duan S. et al. Exosomes derived from MicroRNA-146a-5p-enriched bone marrow mesenchymal stem cells alleviate intracerebral hemorrhage by inhibiting neuronal apoptosis and microglial M1 polarization //Drug Design, Development and Therapy. – 2020. – C. 3143-3158.
51. Duan X. et al. Intracerebral hemorrhage, oxidative stress, and antioxidant therapy //Oxidative medicine and cellular longevity. – 2016. – T. 2016.
52. Dunn A. et al. Biomaterial and stem cell-based strategies for skeletal muscle regeneration //Journal of Orthopaedic Research®. – 2019. – T. 37. – №. 6. – C. 1246-1262.
53. Dzhanvari S. et al. Urokinase-type plasminogen activator enhances the neuroprotective activity of brain-derived neurotrophic factor in a model of

- intracerebral hemorrhage //Biomedicines. – 2022. – T. 10. – №. 6. – C. 1346-1357.
54. Efimenko A. et al. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning //Journal of translational medicine. – 2011. – T. 9. – C. 1-13.
  55. Efimenko A. et al. Data supporting that miR-92a suppresses angiogenic activity of adipose-derived mesenchymal stromal cells by down-regulating hepatocyte growth factor //Data in Brief. – 2016. – T. 6. – C. 295-310.
  56. Fang H. et al. CD36-mediated hematoma absorption following intracerebral hemorrhage: negative regulation by TLR4 signaling //The Journal of Immunology. – 2014. – T. 192. – №. 12. – C. 5984-5992.
  57. Fang S. et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNAs suppress myofibroblast differentiation by inhibiting the transforming growth factor- $\beta$ /SMAD2 pathway during wound healing //Stem cells translational medicine. – 2016. – T. 5. – №. 10. – C. 1425-1439.
  58. Feng M. et al. Serial 18F-FDG PET demonstrates benefit of human mesenchymal stem cells in treatment of intracerebral hematoma: a translational study in a primate model //Journal of Nuclear Medicine. – 2011. – T. 52. – №. 1. – C. 90-97.
  59. Flaherty M. L. Anticoagulant-associated intracerebral hemorrhage //Seminars in neurology. – © Thieme Medical Publishers, 2010. – T. 30. – №. 05. – C. 565–572.
  60. Flores J. J. et al. PPAR $\gamma$ -induced upregulation of CD36 enhances hematoma resolution and attenuates long-term neurological deficits after germinal matrix hemorrhage in neonatal rats //Neurobiology of disease. – 2016. – T. 87. – C. 124-133.
  61. Friedenstein A. J., Piatetzky-Shapiro I. I., Petrakova K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. – 1966.
  62. Friedman R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs //Genome research. – 2009. – T. 19. – №. 1. – C. 92-105.
  63. Funnell W. R. J., Maysinger D., Cuello A. C. Three-dimensional reconstruction and quantitative evaluation of devascularizing cortical lesions in the rat //Journal of neuroscience methods. – 1990. – T. 35. – №. 2. – C. 147-156.
  64. Gang X. et al. Dynamic changes in Toll-like receptor 4 in human Perihematoma tissue after intracerebral hemorrhage //World neurosurgery. – 2018. – T. 118. – C. e593-e600.
  65. Gannushkina I. V. Mozgovee krovoobrashchenie pri razlichnykh vidakh tsirkulatornoĭ gipoksii mozga [Cerebral circulation in different types of brain hypoxia] //Vestn. Ross. Akad. Meditsinskikh Nauk. – 2000. – T. 9. – C. 22–27.

66. Gaschler M. M., Stockwell B. R. Lipid peroxidation in cell death //Biochemical and biophysical research communications. – 2017. – T. 482. – №. 3. – C. 419-425.
67. Ghaly R. F. et al. Complete recovery after antepartum massive intracerebral hemorrhage in an atypical case of sudden eclampsia //Surgical Neurology International. – 2012. – T. 3.
68. Ghasempour E. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy in the brain tumors //Stem Cell Research & Therapy. – 2022. – T. 13. – №. 1. – C. 527.
69. Gimble J. M., Katz A. J., Bunnell B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine //Circulation research. – 2007. – T. 100. – №. 9. – C. 1249-1260.
70. Gray K., Ellis V. Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin //FEBS letters. – 2008. – T. 582. – №. 6. – C. 907-910.
71. Greenberg S. M. et al. Cerebral microbleeds: a guide to detection and interpretation //The Lancet Neurology. – 2009. – T. 8. – №. 2. – C. 165–174.
72. Gutierrez-Fernandez M. et al. Adipose tissue-derived stem cells in stroke treatment: from bench to bedside //Discovery medicine. – 2013. – T. 16. – №. 86. – C. 37-43.
73. Guzman R. et al. Intravascular cell replacement therapy for stroke //Neurosurgical focus. – 2008. – T. 24. – №. 3-4. – C. E15.
74. Han Y. et al. Multipotent mesenchymal stromal cell-derived exosomes improve functional recovery after experimental intracerebral hemorrhage in the rat //Journal of neurosurgery. – 2018. – T. 131. – №. 1. – C. 290-300.
75. Haynesworth S. E. et al. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow //Bone. – 1992. – T. 13. – №. 1. – C. 81-88.
76. Haynesworth S. E., Barer M. A., Caplan A. I. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies //Bone. – 1992. – T. 13. – №. 1. – C. 69-80.
77. Honma T. et al. Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat //Experimental neurology. – 2006. – T. 199. – №. 1. – C. 56-66.
78. Hu Y. et al. Preclinical studies of stem cell transplantation in intracerebral hemorrhage: a systemic review and meta-analysis //Molecular Neurobiology. – 2016. – T. 53. – C. 5269-5277.
79. Hu Y. et al. Protection of SH-SY5Y neuronal cells from glutamate-induced apoptosis by 3, 6'-disinapoyl sucrose, a bioactive compound isolated from Radix Polygala //Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2012. – T. 2012.

80. Hua Y. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases in the brain after intracerebral hemorrhage and thrombin stimulation //Neurosurgery. – 2006. – T. 58. – №. 3. – C. 542-550.
81. Huang F. P. et al. Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products //Journal of neurosurgery. – 2002. – T. 96. – №. 2. – C. 287-293.
82. Huang G. T. J., Gronthos S., Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine //Journal of dental research. – 2009. – T. 88. – №. 9. – C. 792-806.
83. Huang L. et al. Mesenchymal stem cells modulate light-induced activation of retinal microglia through CX3CL1/CX3CR1 signaling //Ocular immunology and inflammation. – 2016. – T. 24. – №. 6. – C. 684-692.
84. Huang L., Zhang L. Neural stem cell therapies and hypoxic-ischemic brain injury //Progress in neurobiology. – 2019. – T. 173. – C. 1-17.
85. Inagawa T. et al. Primary intracerebral hemorrhage in Izumo City, Japan: incidence rates and outcome in relation to the site of hemorrhage //Neurosurgery. – 2003. – T. 53. – №. 6. – C. 1283-1298.
86. Islam M. N. et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury //Nature medicine. – 2012. – T. 18. – №. 5. – C. 759-765.
87. Izadpanah R. et al. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells //Cancer research. – 2008. – T. 68. – №. 11. – C. 4229-4238.
88. Janda E., Boi L., Carta A. R. Microglial phagocytosis and its regulation: a therapeutic target in Parkinson's disease? //Frontiers in molecular neuroscience. – 2018. – T. 11. – C. 144.
89. Jin K. et al. Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat //Neurobiology of disease. – 2005. – T. 18. – №. 2. – C. 366-374.
90. Jingxia G. et al. Experimental study on the PAR-1 expression around hemotoma following intracerebral hemorrhage in rats //Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]. – 2004. – T. 24. – C. 266-268.
91. Jones E. A. et al. Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level //Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology. – 2008. – T. 58. – №. 6. – C. 1731-1740.
92. Kalinina N. et al. miR-92a regulates angiogenic activity of adipose-derived mesenchymal stromal cells //Experimental Cell Research. – 2015. – T. 339. – №. 1. – C. 61-66.

93. Kalinina N. I. et al. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair //Acta Naturae (англоязычная версия). – 2011. – Т. 3. – №. 4 (11). – С. 30–37.
94. Karagyaur M. et al. MSC secretome as a promising tool for neuroprotection and neuroregeneration in a model of intracerebral hemorrhage //Pharmaceutics. – 2021. – Т. 13. – №. 12. – С. 2031-2046.
95. Karnoub A. E. et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis //Nature. – 2007. – Т. 449. – №. 7162. – С. 557-563.
96. Kashyap K., Shukla R. Drug delivery and targeting to the brain through nasal route: mechanisms, applications and challenges //Current Drug Delivery. – 2019. – Т. 16. – №. 10. – С. 887-901.
97. Kaufman H. H. et al. A rabbit model of intracerebral hematoma //Acta neuropathologica. – 1985. – Т. 65. – С. 318-321.
98. Keep R. F. et al. Blood-brain barrier function in intracerebral hemorrhage //Cerebral Hemorrhage. – 2008. – С. 73-77.
99. Keep R. F., Hua Y., Xi G. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets //The Lancet Neurology. – 2012. – Т. 11. – №. 8. – С. 720-731.
100. Kern S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue //Stem cells. – 2006. – Т. 24. – №. 5. – С. 1294-1301.
101. Khan S. U. et al. Applications of Extracellular Vesicles in Nervous System Disorders: An Overview of Recent Advances //Bioengineering. – 2022. – Т. 10. – №. 1. – С. 51.
102. Kim J. M. et al. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model //Brain research. – 2007. – Т. 1183. – С. 43-50.
103. Kim K. et al. The effect of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in a collagenase-induced intracerebral hemorrhage rat model //Experimental Neurobiology. – 2015. – Т. 24. – №. 2. – С. 146-155.
104. Kim K. H. Predictors of 30-day mortality and 90-day functional recovery after primary intracerebral hemorrhage: hospital based multivariate analysis in 585 patients //Journal of Korean Neurosurgical Society. – 2009. – Т. 45. – №. 6. – С. 341.
105. Kingham P. J. et al. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro //Experimental neurology. – 2007. – Т. 207. – №. 2. – С. 267-274.
106. Kingman T. A. et al. Experimental intracerebral mass: description of model, intracranial pressure changes and neuropathology //Journal of Neuropathology & Experimental Neurology. – 1988. – Т. 47. – №. 2. – С. 128-137.

107. Kobari M. et al. Bilateral hemispheric reduction of cerebral blood volume and blood flow immediately after experimental cerebral hemorrhage in cats //Stroke. – 1988. – T. 19. – №. 8. – C. 991-996.
108. Kong Y., Le Y. Toll-like receptors in inflammation of the central nervous system //International immunopharmacology. – 2011. – T. 11. – №. 10. – C. 1407-1414.
109. Kuramoto Y. et al. Intravenous administration of human adipose-derived stem cells ameliorates motor and cognitive function for intracerebral hemorrhage mouse model //Brain Research. – 2019. – T. 1711. – C. 58-67.
110. Ladak A. et al. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model //Experimental neurology. – 2011. – T. 228. – №. 2. – C. 242-252.
111. Lalu M. M. et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (MSCs): a systematic review //D49. CLINICAL TRIALS IN CRITICAL CARE. – 2010. – C. A6043-A6043.
112. Lambertsen K. L. et al. A quantitative study of microglial—Macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2005. – T. 25. – №. 1. – C. 119-135.
113. Lan X. et al. Pinocembrin protects hemorrhagic brain primarily by inhibiting toll-like receptor 4 and reducing M1 phenotype microglia //Brain, behavior, and immunity. – 2017. – T. 61. – C. 326-339.
114. Leclerc J. L. et al. The absence of the CD163 receptor has distinct temporal influences on intracerebral hemorrhage outcomes //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2018. – T. 38. – №. 2. – C. 262-273.
115. Lee R. H. et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6 //Cell stem cell. – 2009. – T. 5. – №. 1. – C. 54-63.
116. Lee S. H. et al. Effects of celecoxib on hematoma and edema volumes in primary intracerebral hemorrhage: a multicenter randomized controlled trial //European journal of neurology. – 2013. – T. 20. – №. 8. – C. 1161-1169.
117. Lee S. H., Ryu W. S., Roh J. K. Cerebral microbleeds are a risk factor for warfarin-related intracerebral hemorrhage //Neurology. – 2009. – T. 72. – №. 2. – C. 171–176.
118. Lei B. et al. Tumor necrosis factor alpha antagonism improves neurological recovery in murine intracerebral hemorrhage //Journal of neuroinflammation. – 2013. – T. 10. – C. 1-9.
119. Li Q. et al. Inhibition of neuronal ferroptosis protects hemorrhagic brain //JCI insight. – 2017. – T. 2. – №. 7.
120. Liao W. et al. Therapeutic benefit of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells in intracerebral hemorrhage rat: implications of

- anti-inflammation and angiogenesis //Cellular Physiology and Biochemistry. – 2009. – T. 24. – №. 3-4. – C. 307-316.
121. Lin H. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing //Biomaterials. – 2019. – T. 203. – C. 96-110.
  122. Lin P. P., Wang Y., Lozano G. Mesenchymal stem cells and the origin of Ewing's sarcoma //Sarcoma. – 2010. – T. 2011.
  123. Lin S. et al. Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage //Journal of neuroinflammation. – 2012. – T. 9. – C. 1-14.
  124. Liu D. Z. et al. Blood–brain barrier breakdown and repair by Src after thrombin-induced injury //Annals of neurology. – 2010. – T. 67. – №. 4. – C. 526-533.
  125. Liu D. Z. et al. Inhibition of Src family kinases improves cognitive function after intraventricular hemorrhage or intraventricular thrombin //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2017. – T. 37. – №. 7. – C. 2359-2367.
  126. Liu D. Z., Sharp F. R. The dual role of SRC kinases in intracerebral hemorrhage. – Springer Vienna, 2011. – C. 77-81.
  127. Liu W. et al. Brain-derived neurotrophic factor and its potential therapeutic role in stroke comorbidities //Neural plasticity. – 2020. – T. 2020.
  128. Liu W. et al. Mesenchymal stem cells alleviate the early brain injury of subarachnoid hemorrhage partly by suppression of Notch1-dependent neuroinflammation: involvement of Botch //Journal of Neuroinflammation. – 2019. – T. 16. – C. 1-20.
  129. Lo Sicco C. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as mediators of anti-inflammatory effects: endorsement of macrophage polarization //Stem cells translational medicine. – 2017. – T. 6. – №. 3. – C. 1018-1028.
  130. Lochhead J. J., Thorne R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system //Advanced drug delivery reviews. – 2012. – T. 64. – №. 7. – C. 614-628.
  131. Lopatina T. et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo //PloS one. – 2011. – T. 6. – №. 3. – C. e17899.
  132. Lopatina T. et al. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential //Cell Communication and Signaling. – 2014. – T. 12. – №. 1. – C. 1-12.
  133. Lu F. et al. Edaravone, a free radical scavenger, attenuates behavioral deficits following transient forebrain ischemia by inhibiting oxidative damage in gerbils //Neuroscience Letters. – 2012. – T. 506. – №. 1. – C. 28-32.

134. Lu X., Chen-Roetling J., Regan R. F. Systemic hemin therapy attenuates blood–brain barrier disruption after intracerebral hemorrhage //Neurobiology of disease. – 2014. – T. 70. – C. 245-251.
135. Ma X. et al. Stem cell-based therapies for intracerebral hemorrhage in animal model: a meta-analysis //Neurological Sciences. – 2015. – T. 36. – C. 1311-1317.
136. Mahrouf-Yorgov M. et al. Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties //Cell Death & Differentiation. – 2017. – T. 24. – №. 7. – C. 1224-1238.
137. Makarenko A. N. et al. Metod modelirovaniia lokal'nogo krovoizlianiia v razlichnykh strukturakh golovnogo mozga u éksperimental'nykh zhivotnykh [Simulation of local cerebral hemorrhage in different brain structures of experimental animals] //Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti. – 2002. – T. 52. – №. 6. – C. 765-768.
138. Marar C., Starich B., Wirtz D. Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression //Nature immunology. – 2021. – T. 22. – №. 5. – C. 560-570.
139. Matsuno H. et al. Association between vascular endothelial growth factor-mediated blood–brain barrier dysfunction and stress-induced depression //Molecular Psychiatry. – 2022. – T. 27. – №. 9. – C. 3822-3832.
140. Miranda-Lourenço C. et al. Challenges of BDNF-based therapies: From common to rare diseases //Pharmacological Research. – 2020. – T. 162. – C. 105281.
141. Mitkari B. et al. Intra-arterial infusion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells results in transient localization in the brain after cerebral ischemia in rats //Experimental neurology. – 2013. – T. 239. – C. 158-162.
142. Mochizuki T. et al. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium–and adipose synovium–derived cells compared with subcutaneous fat–derived cells: Distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans //Arthritis & Rheumatism. – 2006. – T. 54. – №. 3. – C. 843-853.
143. Moestrup S., Møller H. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response //Annals of medicine. – 2004. – T. 36. – №. 5. – C. 347-354.
144. Mohan S. et al. Putative role of prostaglandin receptor in intracerebral hemorrhage //Frontiers in neurology. – 2012. – T. 3. – C. 145.
145. Morrison T. J. et al. Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer //American journal of respiratory and critical care medicine. – 2017. – T. 196. – №. 10. – C. 1275-1286.

146. Murphy M. B., Moncivais K., Caplan A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine //Experimental & molecular medicine. – 2013. – T. 45. – №. 11. – C. e54-e54.
147. Nakamura T. et al. Deferoxamine-induced attenuation of brain edema and neurological deficits in a rat model of intracerebral hemorrhage //Journal of neurosurgery. – 2004. – T. 100. – №. 4. – C. 672-678.
148. Nampoothiri M. et al. Insulin blocks glutamate-induced neurotoxicity in differentiated SH-SY5Y neuronal cells //Behavioural Neurology. – 2014. – T. 2014.
149. Nicholls D. G. Mitochondria and calcium signaling //Cell calcium. – 2005. – T. 38. – №. 3-4. – C. 311-317.
150. Nombela-Arrieta C., Ritz J., Silberstein L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells //Nature reviews Molecular cell biology. – 2011. – T. 12. – №. 2. – C. 126-131.
151. Nosrati H. et al. Stem cell-based therapeutic strategies for corneal epithelium regeneration //Tissue and Cell. – 2021. – T. 68. – C. 101470.
152. Ohnishi M. et al. Involvement of thrombin and mitogen-activated protein kinase pathways in hemorrhagic brain injury //Experimental neurology. – 2007. – T. 206. – №. 1. – C. 43-52.
153. Okauchi M. et al. Deferoxamine treatment for intracerebral hemorrhage in aged rats: therapeutic time window and optimal duration //Stroke. – 2010. – T. 41. – №. 2. – C. 375-382.
154. Ong W. K., Chakraborty S., Sugii S. Adipose tissue: understanding the heterogeneity of stem cells for regenerative medicine //Biomolecules. – 2021. – T. 11. – №. 7. – C. 918.
155. Orellana J. A. et al. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels //Journal of neurochemistry. – 2011. – T. 118. – №. 5. – C. 826-840.
156. Otero L. et al. Intralesional administration of allogeneic bone marrow stromal cells reduces functional deficits after intracerebral hemorrhage //Histology and histopathology. – 2010.
157. Pan J. et al. Malibatol A regulates microglia M1/M2 polarization in experimental stroke in a PPAR $\gamma$ -dependent manner //Journal of neuroinflammation. – 2015. – T. 12. – №. 1. – C. 1-11.
158. Pearson V. L., Rothwell N. J., Toulmond S. Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1 $\beta$  protein in microglia and astrocytes: Correlation with the progression of cell death //Glia. – 1999. – T. 25. – №. 4. – C. 311-323.

159. Pendharkar A. V. et al. Biodistribution of neural stem cells after intravascular therapy for hypoxic–ischemia //Stroke. – 2010. – T. 41. – №. 9. – C. 2064-2070.
160. Pittenger M. F. et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress //NPJ Regenerative medicine. – 2019. – T. 4. – №. 1. – C. 22.
161. Ponomarev E. D., Veremeyko T., Weiner H. L. MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS //Glia. – 2013. – T. 61. – №. 1. – C. 91-103.
162. Popova A. P. et al. Autocrine production of TGF- $\beta$ 1 promotes myofibroblastic differentiation of neonatal lung mesenchymal stem cells //American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. – 2010. – T. 298. – №. 6. – C. L735-L743.
163. Qiu Y. et al. Immune cells in the BBB disruption after acute ischemic stroke: targets for immune therapy? //Frontiers in Immunology. – 2021. – T. 12. – C. 678744.
164. Ragni E. et al. Extracellular vesicle-shuttled mRNA in mesenchymal stem cell communication //Stem cells. – 2017. – T. 35. – №. 4. – C. 1093-1105.
165. Ren H. et al. Potential therapeutic targets for intracerebral hemorrhage-associated inflammation: an update //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2020. – T. 40. – №. 9. – C. 1752-1768.
166. Robbins P. D., Morelli A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles //Nature Reviews Immunology. – 2014. – T. 14. – №. 3. – C. 195-208.
167. Rodríguez-Yáñez M., Castillo J. Role of inflammatory markers in brain ischemia //Current opinion in neurology. – 2008. – T. 21. – №. 3. – C. 353-357.
168. Sagaradze G. et al. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: towards the clinical translation //International journal of molecular sciences. – 2019. – T. 20. – №. 7. – C. 1656.
169. Salgado A. J. et al. Tissue engineering and regenerative medicine: past, present, and future //International review of neurobiology. – 2013. – T. 108. – C. 1-33.
170. Sansing L. H. et al. Toll-like receptor 4 contributes to poor outcome after intracerebral hemorrhage //Annals of neurology. – 2011. – T. 70. – №. 4. – C. 646-656.
171. Satilmis B. et al. Adipose-derived stem cells in the treatment of hepatobiliary diseases and sepsis //World Journal of Clinical Cases. – 2022. – T. 10. – №. 14. – C. 4348.

172. Scott G. et al. Minocycline reduces chronic microglial activation after brain trauma but increases neurodegeneration //Brain. – 2018. – T. 141. – №. 2. – C. 459-471.
173. Sessarego N. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application //haematologica. – 2008. – T. 93. – №. 3. – C. 339-346.
174. Seyfried D. et al. Effects of intravenous administration of human bone marrow stromal cells after intracerebral hemorrhage in rats //Journal of neurosurgery. – 2006. – T. 104. – №. 2. – C. 313-318.
175. Shao Z., Tu S., Shao A. Pathophysiological mechanisms and potential therapeutic targets in intracerebral hemorrhage //Frontiers in pharmacology. – 2019. – T. 10. – C. 1079.
176. Shen H. et al. Role of exosomes derived from miR-133b modified MSCs in an experimental rat model of intracerebral hemorrhage //Journal of Molecular Neuroscience. – 2018. – T. 64. – C. 421-430.
177. Shen L. H. et al. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke //Neuroscience. – 2006. – T. 137. – №. 2. – C. 393-399.
178. Shen L. H. et al. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke //Stroke. – 2007. – T. 38. – №. 7. – C. 2150-2156.
179. Shinozuka K. et al. Stem cell transplantation for neuroprotection in stroke //Brain sciences. – 2013. – T. 3. – №. 1. – C. 239-261.
180. Skalnikova H. K. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome //Biochimie. – 2013. – T. 95. – №. 12. – C. 2196-2211.
181. Skidmore C. T., Andrefsky J. Spontaneous intracerebral hemorrhage: epidemiology, pathophysiology, and medical management //Neurosurgery Clinics. – 2002. – T. 13. – №. 3. – C. 281-288.
182. Sun J. et al. Intranasal delivery of hypoxia-preconditioned bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced regenerative effects after intracerebral hemorrhagic stroke in mice //Experimental neurology. – 2015. – T. 272. – C. 78-87.
183. Sun Z. et al. IGF-1R stimulation alters microglial polarization via TLR4/NF- $\kappa$ B pathway after cerebral hemorrhage in mice //Brain Research Bulletin. – 2020. – T. 164. – C. 221-234.
184. Teng H. K. et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin //Journal of Neuroscience. – 2005. – T. 25. – №. 22. – C. 5455-5463.
185. Tomasoni S. et al. Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells //Stem cells and development. – 2013. – T. 22. – №. 5. – C. 772-780.

186. Tsang K. S. et al. Phase I/II randomized controlled trial of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for chronic stroke //World Journal of Stem Cells. – 2017. – T. 9. – №. 8. – C. 133.
187. Van Asch C. J. J. et al. Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis //The Lancet Neurology. – 2010. – T. 9. – №. 2. – C. 167–176.
188. Vaquero J. et al. Cell therapy with bone marrow stromal cells after intracerebral hemorrhage: impact of platelet-rich plasma scaffolds //Cytotherapy. – 2013. – T. 15. – №. 1. – C. 33-43.
189. Varnum M. M., Ikezu T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain //Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis. – 2012. – T. 60. – C. 251-266.
190. Viswanathan S. et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature //Cytotherapy. – 2019. – T. 21. – №. 10. – C. 1019-1024.
191. Wagner K. R. et al. Heme and iron metabolism: role in cerebral hemorrhage //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2003. – T. 23. – №. 6. – C. 629-652.
192. Wahid F. et al. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2010. – T. 1803. – №. 11. – C. 1231-1243.
193. Walczak P. et al. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia //Stroke. – 2008. – T. 39. – №. 5. – C. 1569-1574.
194. Walker D. G., Lue L. F. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains //Alzheimer's research & therapy. – 2015. – T. 7. – №. 1. – C. 1-9.
195. Wan S. et al. Microglia activation and polarization after intracerebral hemorrhage in mice: the role of protease-activated receptor-1 //Translational stroke research. – 2016. – T. 7. – C. 478-487.
196. Wang C. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate neurological deficits and blood-brain barrier dysfunction after intracerebral hemorrhage in spontaneously hypertensive rats //International journal of clinical and experimental pathology. – 2015. – T. 8. – №. 5. – C. 4715.
197. Wang G. et al. Haematoma scavenging in intracerebral haemorrhage: from mechanisms to the clinic //Journal of cellular and molecular medicine. – 2018. – T. 22. – №. 2. – C. 768-777.

198. Wang G. et al. PPAR- $\gamma$  promotes hematoma clearance through haptoglobin-hemoglobin-CD163 in a rat model of intracerebral hemorrhage //Behavioural neurology. – 2018. – T. 2018.
199. Wang J. et al. Role of Nrf2 in protection against intracerebral hemorrhage injury in mice //Free Radical Biology and Medicine. – 2007. – T. 43. – №. 3. – C. 408-414.
200. Wang J., Tsirka S. E. Tuftsin fragment 1–3 is beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage //Stroke. – 2005. – T. 36. – №. 3. – C. 613-618.
201. Wang S. P. et al. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in rats with intracerebral hemorrhage: reduced apoptosis and enhanced neuroprotection //Molecular medicine reports. – 2012. – T. 6. – №. 4. – C. 848-854.
202. Wang Y. C. et al. Toll-like receptor 2/4 heterodimer mediates inflammatory injury in intracerebral hemorrhage //Annals of neurology. – 2014. – T. 75. – №. 6. – C. 876-889.
203. Wang Z. et al. Treatment of secondary brain injury by perturbing postsynaptic density protein-95-NMDA receptor interaction after intracerebral hemorrhage in rats //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2019. – T. 39. – №. 8. – C. 1588-1601.
204. Ward M. W. et al. Mitochondrial and plasma membrane potential of cultured cerebellar neurons during glutamate-induced necrosis, apoptosis, and tolerance //Journal of Neuroscience. – 2007. – T. 27. – №. 31. – C. 8238-8249.
205. Wei C. C. et al. Nicotinamide mononucleotide attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway //Scientific reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 717.
206. Weilinger N. L. et al. Metabotropic NMDA receptor signaling couples Src family kinases to pannexin-1 during excitotoxicity //Nature neuroscience. – 2016. – T. 19. – №. 3. – C. 432-442.
207. Werring D. J., Gregoire S. M., Cipolotti L. Cerebral microbleeds and vascular cognitive impairment //Journal of the neurological sciences. – 2010. – T. 299. – №. 1–2. – C. 131–135.
208. Wexler S. A. et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal ‘stem’cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not //British journal of haematology. – 2003. – T. 121. – №. 2. – C. 368-374.
209. Williams A. M. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes provide neuroprotection and improve long-term neurologic outcomes in a swine model of traumatic brain injury and hemorrhagic shock //Journal of neurotrauma. – 2019. – T. 36. – №. 1. – C. 54-60.
210. Wu B. et al. Ac-YVAD-CMK decreases blood–brain barrier degradation by inhibiting caspase-1 activation of interleukin-1 $\beta$  in intracerebral hemorrhage mouse model //Translational stroke research. – 2010. – T. 1. – C. 57-64.

211. Wu H. et al. Cerebroprotection by the neuronal PGE2 receptor EP2 after intracerebral hemorrhage in middle-aged mice //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2017. – T. 37. – №. 1. – C. 39-51.
212. Wu H. et al. PGE2 receptor agonist misoprostol protects brain against intracerebral hemorrhage in mice //Neurobiology of aging. – 2015. – T. 36. – №. 3. – C. 1439-1450.
213. Wu J. et al. Oxidative brain injury from extravasated erythrocytes after intracerebral hemorrhage //Brain research. – 2002. – T. 953. – №. 1-2. – C. 45-52.
214. Wu M. et al. VEGF regulates the blood-brain barrier through MMP-9 in a rat model of traumatic brain injury //Experimental and Therapeutic Medicine. – 2022. – T. 24. – №. 6. – C. 1-10.
215. Wu S. et al. Edoxaban improves functional and structural outcomes in animal models of focal cerebral ischemia: a systematic review //International Journal of Stroke. – 2014. – T. 9. – №. 1. – C. 101-106.
216. Xi G., Keep R. F., Hoff J. T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage //The Lancet Neurology. – 2006. – T. 5. – №. 1. – C. 53–63.
217. Xi G., Reiser G., Keep R. F. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? //Journal of neurochemistry. – 2003. – T. 84. – №. 1. – C. 3-9.
218. Xia C. Y. et al. Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment //International immunopharmacology. – 2015. – T. 25. – №. 2. – C. 377-382.
219. Xie J. et al. Intracerebral and intravenous transplantation represents a favorable approach for application of human umbilical cord mesenchymal stromal cells in intracerebral hemorrhage rats //Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research. – 2016. – T. 22. – C. 3552.
220. Xiong L. et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells can alleviate early brain injury after subarachnoid hemorrhage through miRNA129-5p-HMGB1 pathway //Stem Cells and Development. – 2020. – T. 29. – №. 4. – C. 212-221.
221. Xiong X. Y., Liu L., Yang Q. W. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke //Progress in neurobiology. – 2016. – T. 142. – C. 23-44.
222. Xue M., Del Bigio M. R. Comparison of brain cell death and inflammatory reaction in three models of intracerebral hemorrhage in adult rats //Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2003. – T. 12. – №. 3. – C. 152-159.
223. Xue M., Del Bigio M. R. Intracortical hemorrhage injury in rats: relationship between blood fractions and brain cell death //Stroke. – 2000. – T. 31. – №. 7. – C. 1721-1727.

224. Yáñez-Mó M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions //Journal of extracellular vesicles. – 2015. – T. 4. – №. 1. – C. 27066.
225. Yang C. et al. Neuroprotective effects of bone marrow stem cells overexpressing glial cell line-derived neurotrophic factor on rats with intracerebral hemorrhage and neurons exposed to hypoxia/reoxygenation //Neurosurgery. – 2011. – T. 68. – №. 3. – C. 691-704.
226. Yang J. et al. Edoxaban for acute stroke: meta-analyses of data from randomized controlled trials //Developmental neurorehabilitation. – 2015. – T. 18. – №. 5. – C. 330-335.
227. Yari H. et al. Emerging role of mesenchymal stromal cells (MSCs)-derived exosome in neurodegeneration-associated conditions: a groundbreaking cell-free approach //Stem cell research & therapy. – 2022. – T. 13. – №. 1. – C. 423.
228. Yeatts S. D. et al. High Dose Deferoxamine in Intracerebral Hemorrhage (Hi-Def) Trial: Rationale, Design, and Methods //Neurocritical care. – 2013. – T. 19. – C. 257-266.
229. Zachar L., Bačenková D., Rosocha J. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment //Journal of inflammation research. – 2016. – C. 231-240.
230. Zahra K. et al. A combined approach to intracerebral hemorrhage: intravenous mesenchymal stem cell therapy with minimally invasive hematoma evacuation //Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2020. – T. 29. – №. 8. – C. 104931.
231. Zeng J. et al. Isoliquiritigenin alleviates early brain injury after experimental intracerebral hemorrhage via suppressing ROS-and/or NF- $\kappa$ B-mediated NLRP3 inflammasome activation by promoting Nrf2 antioxidant pathway //Journal of neuroinflammation. – 2017. – T. 14. – C. 1-19.
232. Zeng L. et al. Deferoxamine therapy for intracerebral hemorrhage: a systematic review //PloS one. – 2018. – T. 13. – №. 3. – C. e0193615.
233. Zhang H. et al. Differentiation and neurological benefit of the mesenchymal stem cells transplanted into the rat brain following intracerebral hemorrhage //Neurological research. – 2006. – T. 28. – №. 1. – C. 104-112.
234. Zhang L. et al. Stem cell therapy in liver regeneration: Focus on mesenchymal stem cells and induced pluripotent stem cells //Pharmacology & Therapeutics. – 2022. – T. 232. – C. 108004.
235. Zhang Q. et al. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation combined with minimally invasive hematoma aspiration on intracerebral hemorrhage in rats //American Journal of Translational Research. – 2015. – T. 7. – №. 11. – C. 2176.

236. Zhang R. Effect of autologous bone mesenchymal stem cell transplantation on neurological function in rehabilitation period of multifocal cerebral hemorrhage //J. Hainan Med. Univ. – 2016. – T. 22. – C. 142-145.
237. Zhang X. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue //Journal of cellular biochemistry. – 2011. – T. 112. – №. 4. – C. 1206-1218.
238. Zhang Y. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells stereotactic transplantation alleviate brain edema from intracerebral hemorrhage //Journal of Cellular Biochemistry. – 2019. – T. 120. – №. 9. – C. 14372-14382.
239. Zhang Y. et al. Gap junctions and hemichannels composed of connexins and pannexins mediate the secondary brain injury following intracerebral hemorrhage //Biology. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 27.
240. Zhang Y. et al. Oxidative stress following intracerebral hemorrhage: from molecular mechanisms to therapeutic targets //Frontiers in Immunology. – 2022. – T. 13.
241. Zhang Y., Mignone J., MacLellan W. R. Cardiac regeneration and stem cells //Physiological reviews. – 2015. – T. 95. – №. 4. – C. 1189-1204.
242. Zhang Z. et al. Microglial polarization and inflammatory mediators after intracerebral hemorrhage //Molecular neurobiology. – 2017. – T. 54. – C. 1874-1886.
243. Zhao F., Liu Z. Beneficial effects of edaravone on the expression of serum matrix metalloproteinase-9 after cerebral hemorrhage //Neurosciences Journal. – 2014. – T. 19. – №. 2. – C. 106-110.
244. Zhao H. et al. HucMSCs-derived miR-206-knockdown exosomes contribute to neuroprotection in subarachnoid hemorrhage induced early brain injury by targeting BDNF //Neuroscience. – 2019. – T. 417. – C. 11-23.
245. Zhao X. et al. Cytoprotective role of haptoglobin in brain after experimental intracerebral hemorrhage. – Springer Vienna, 2011. – C. 107-112.
246. Zhao X. et al. Hematoma resolution as a target for intracerebral hemorrhage treatment: role for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in microglia/macrophages //Annals of neurology. – 2007. – T. 61. – №. 4. – C. 352-362.
247. Zhao X. et al. Neuroprotective role of haptoglobin after intracerebral hemorrhage //Journal of Neuroscience. – 2009. – T. 29. – №. 50. – C. 15819-15827.
248. Zhao X. et al. Transcription factor Nrf2 protects the brain from damage produced by intracerebral hemorrhage //Stroke. – 2007. – T. 38. – №. 12. – C. 3280-3286.

249. Zhao X. R., Gonzales N., Aronowski J. Pleiotropic Role of PPAR  $\gamma$  in Intracerebral Hemorrhage: An Intricate System Involving Nrf2, RXR, and NF- $\kappa$ B //CNS neuroscience & therapeutics. – 2015. – T. 21. – №. 4. – C. 357-366.
250. Zheng H. et al. Mechanism and therapy of brain edema after intracerebral hemorrhage //Cerebrovascular diseases. – 2016. – T. 42. – №. 3-4. – C. 155-169.
251. Zheng H. et al. Mesenchymal stem cell therapy in stroke: a systematic review of literature in pre-clinical and clinical research //Cell transplantation. – 2018. – T. 27. – №. 12. – C. 1723–1730.
252. Zheng W. et al. Therapeutic benefits of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow after global cerebral ischemia //Brain research. – 2010. – T. 1310. – C. 8-16.
253. Zhou H. et al. Transplantation of human amniotic mesenchymal stem cells promotes neurological recovery in an intracerebral hemorrhage rat model //Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2016. – T. 475. – №. 2. – C. 202-208.
254. Zhu H. et al. Role and mechanisms of cytokines in the secondary brain injury after intracerebral hemorrhage //Progress in neurobiology. – 2019. – T. 178. – C. 101610.