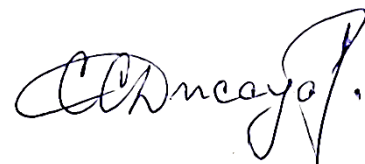


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Джауари Сталик Станиславович

**Изучение нейропротекторных свойств секрета мезенхимных
стромальных клеток на модели интрацеребральной посттравматической
гематомы (геморрагического инсульта)**

Специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена на кафедре биохимии и регенеративной биомедицины факультета
фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения
«Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Научные

руководители: **Карагяур Максим Николаевич** – кандидат биологических наук

Балабаньян Вадим Юрьевич – доктор фармацевтических наук,
доцент

Официальные

оппоненты:

Павлова Галина Валериевна – доктор биологических наук,
профессор РАН, Институт высшей нервной деятельности и
нейрофизиологии РАН, лаборатория нейрогенетики и генетики
развития, заведующая лабораторией

Калинина Татьяна Сергеевна – доктор биологических наук,
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и
перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
лаборатория фармакологии неврологических заболеваний, ведущий
научный сотрудник

Андреева Елена Ромуальдовна – доктор биологических наук,
доцент, ФГБУН «Государственный научный центр Российской
Федерации Институт медико-биологических проблем» РАН,
лаборатория клеточной физиологии, ведущий научный сотрудник

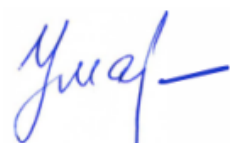
Защита диссертации состоится «13» мая 2024 года в 17:00 на заседании диссертационного
совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова
по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет,
аудитория М-1.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ
имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте Диссовет 2.0
<https://dissovet.msu.ru/dissertation/2954>

Автореферат разослан «12» апреля 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
МГУ.015.7 доктор биологических наук

 Б. А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

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 мультипотентные 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 (Caplan et al., 2011; Kalinina et al., 2011; Zachar et al., 2016). 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 ЖТ вносят решающий вклад в восстановление и регенерацию поврежденных тканей (Lopatina et al., 2011; Sagaradze, 2018). Показано, что прорегенеративные эффекты МСК в основном опосредованы компонентами их секрета (благодаря широкому спектру нейротрофических, ангиогенных и иммуномодулирующих компонентов в своем составе) (Efimenko et al., 2014; Oh et al., 2015). Применение клеточной терапии МСК имеет ряд ограничений, связанных в первую очередь с распределением клеток в различных органах при основных способах трансплантации клеток, а также выживаемости клеток и сохранении их секреторной активности при трансплантации. 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 воспаления (подавляя их), так и осуществлять нейротрофическую и ангиогенную поддержку ткани в очаге повреждения (Sagaradze, 2018). Кроме того, важно учесть потенцирующее влияние некоторых факторов в составе секрета. Наиболее перспективно применение бесклеточного препарата на основе секрета 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. Полученные в данной работе результаты демонстрируют эффективность использования секрета МСК для восстановления поврежденной нервной ткани при интрацеребральной посттравматической гематоме (геморрагическом инсульте), а также вносят вклад в определение механизма действия секрета МСК в данной патологии.

Цель исследования. Выявить нейропротекторный и нейротрофический эффекты секрета МСК при моделировании интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) и выяснить возможные механизмы, опосредующие обозначенные эффекты.

Задачи исследования.

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

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 проведенных исследований подтверждается патентом (Патент РФ №2803286 от 12 сентября 2023 г.).

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование позволяет оценить значимость роли МСК в регуляции процессов 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.

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования основана на анализе данных литературы, постановке цели и задач с последующей экспериментальной оценкой выдвинутых гипотез на животной экспериментальной модели, релевантно воспроизводящей патогенез интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта), а также подтверждением некоторых механизмов, опосредующих наблюдаемые эффекты. В ходе исследования были применены биохимические (ИФА), цитологические (выделение и культивирование клеток МСК ЖТ, получение образцов секрета данных клеток), физиологические (моделирование интрацеребральной посттравматической гематомы у крыс введением аутологичной крови в определенную зону головного мозга, неврологическая оценка животных после перенесенной операции), гистологические методы (окраска гематоксилином и эозином, иммуногистохимический анализ с флуоресцентной меткой) и статистические методы.

Основные 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 нейронных 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.

Степень достоверности полученных результатов. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SigmaPlot11.0 (Systat Software Inc., Эркрат, Германия). Результаты исследования доложены на российских и зарубежных конференциях и опубликованы в рецензируемых журналах.

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.

Апробация работы проведена на расширенном заседании кафедр биохимии и регенеративной биомедицины и фармакологии Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М. В. Ломоносова, состоявшемся 29 сентября 2023 г. по адресу Ломоносовский проспект 27 к.1, протокол № 05/09/23.

Публикация материалов исследования. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых аналитическими базами Scopus, WoS, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 и 1 патент РФ №2803286, 2023, приравненный по решению диссертационного совета к публикации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют пунктам 2, 6 специальности 1.5.5. – «Физиология человека и животных», пунктам 1, 3, 4 специальности 3.3.6. – «Фармакология, клиническая фармакология».

Личный вклад автора. Автору диссертационного исследования принадлежит ключевая роль в постановке целей и формулировке задач, планировании и проведении экспериментальной работы, анализе и обработке полученных данных, а также подготовке тезисов и публикаций по теме исследования.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, выводов, а также списка литературы, включающего 254 источника, из которых 252 на иностранных языках. Диссертационная работа изложена на 132 страницах компьютерного текста, содержит 4 таблиц, 29 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы и методы исследования *in vitro*.

Выделение МСК. 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, полученные из висцеральной жировой ткани, получали от половозрелых самцов крыс линии Вистар 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.

Получение секрета МСК. Секретом МСК человека, получали по ранее опубликованному протоколу (Sagaradze et al., 2019). Для этого субконфлюэнтные объединённые 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 (все от Gibco, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США). 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). 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 ± 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 – АВ1513Р, Merck (20 мкл; конц. антител = 5 мкг/мл); специфический ингибитор uPA – ВС 11 гидробромид, Tocris bioscience (20 мкл; конц. ингибитора = 16 мкМ).

Определение концентраций основных факторов, ответственных за нейропротекторные эффекты секрета МСК.

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.

Исследование прямой нейропротекторной активности секрета МСК на культуре клеток нейробластомы SH-SY5Y.

Для оценки прямой нейропротекторной активности секретов МСК мы использовали ранее опубликованную модель *in vitro* индуцированной глутаматом нейротоксичности (Hu et al., 2012; Nampoothiri 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). 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 планшеты 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.

Чтобы оценить способность 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/мл человеческого BDNF (BDNF) или секретом МСК (человеческий чМСК или крысиный кМСК). Для мониторинга роста нейритов SHSY5Y планшеты 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.

Исследование поляризации моноцитов и макрофагов периферической крови человека под действием секрета МСК.

Для оценки способности секрета МСК (чМСК1х) влиять на процессы активации/подавления клеток моноцитарно-макрофагального ряда гематогенного происхождения была использована модель поляризации моноцитов/макрофагов в M1- и M2-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 CO₂-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 γ 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 β 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 FACSCantoTM 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. Зубковой Е.С.

Модель патологии на животных (исследования *in vivo*).

Модель интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) у крысы.

Экспериментальные животные (самцы крыс линии Вистар массой 180 – 250 г) 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). 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 (внутрибрюшинно, раствором, содержащим 2% Золетил® 50 (VirBac, Испания) и 1,5% ксилазин (InterChemie, Нидерланды) в физиологическом растворе в дозе 1 мл/кг массы тела) 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. 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 ложнооперированные животные, которым была произведена незавершенная трепанация черепной коробки в указанной точке, однако мозговую 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").

Методы оценки нейропротекции в экспериментах *in vivo*.

Неврологическая оценка экспериментальных животных. 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.

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 1. 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.

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

Таблица 1. Показатели шкалы Stroke-index McGraw.

Определение объема очага повреждения методом магнитно-резонансной томографии. 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). МРТ исследование проводили в Центре коллективного пользования ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" МЗ РФ.

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 CO₂). Мозг удаляли, фиксировали в 4% растворе формальдегида и заливали в парафин. Срезы головного мозга, содержащие очаг повреждения, депарафинировали, антигены демаскировали. Полученные срезы окрашивали гематоксилин-эозином, крезильовым фиолетовым (окраска по Нисслю) или берлинской лазурью (окраска по Перлсу).

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. Басалова Н.А.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SigmaPlot11.0 (Systat Software, Inc., Экрат, 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 (тест Dunn's) 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 хи-квадрат 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование белково-пептидного состава секрета МСК.

Субстанция на основе секрета МСК (чМСК1х), 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), IL-13, 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 секрета 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 иммуностропным эффектом (цитокины, хемокины). Данная композиция обеспечивает сбалансированный эффект за счет наличия различных по природе и механизму действия факторов. Для ключевых факторов, предположительно вовлеченных в процессы регенерации нервной ткани, концентрации (полученные при помощи иммуноферментного анализа) приведены в таблице 2.

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

Таблица 2. Концентрации ключевых факторов секрета МСК, имеющих нейропротекторный эффект (до концентрации).

Оценка нейропротекторного эффекта секрета МСК на модели геморагического инсульта.

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. 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.

Выживаемость. Показатель выживаемость оценивался в течение 14 суток после моделирования ГИ. Результаты исследования (рис. 1) 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.

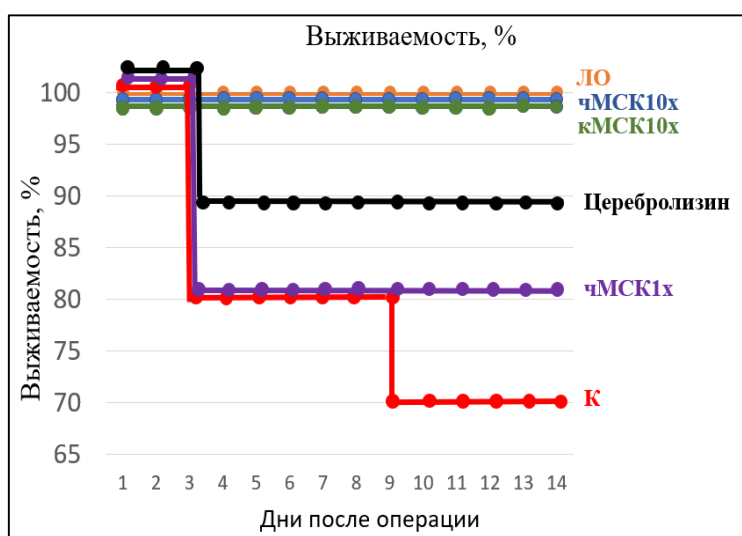


Рисунок 1. Динамика выживаемости крыс в эксперименте с интрацеребральным введением секрета МСК. N=10, наблюдение за крысами проводилось в течение 14 суток.

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). Данный эффект был доза-зависимым, так как в экспериментальной группе чМСК1х как на 3, так и на 10 сутки были животные с выраженными неврологическими расстройствами. Данные результаты неврологической оценки (чМСК1х) были схожи с результатами крыс из группы контроля (К), 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 (рис. 2).

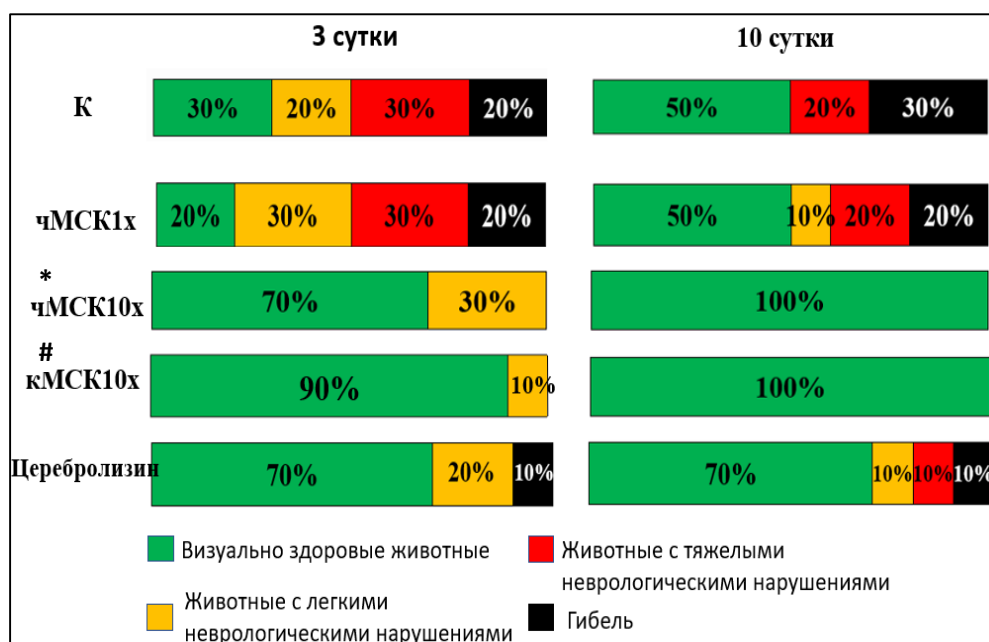


Рисунок 2. Результаты неврологической оценки животных в эксперименте с интрацеребральным введением секрета МСК на 3 и 10 сутки. ($N = 10$; * – $p = 0,006$; # – $p < 0,005$ в сравнении с группой контроля (К), двусторонний точный критерий Фишера)

MPT исследование. MPT 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. 3).

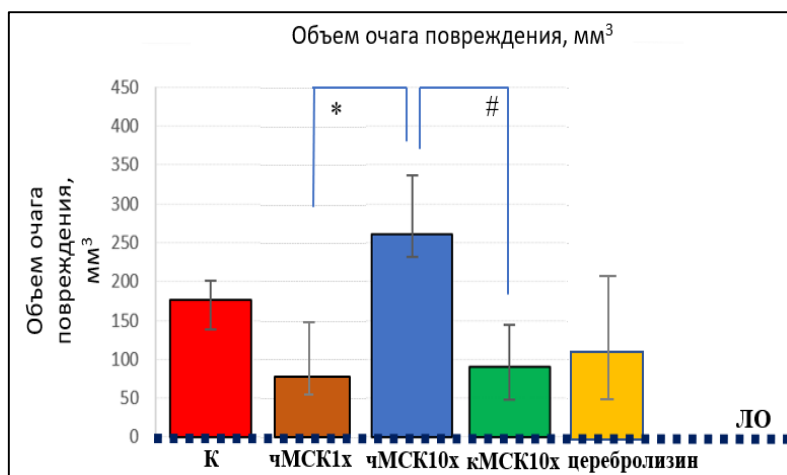


Рисунок 3. Сравнение объемов очага повреждения в эксперименте с интрацеребральным введением секрета МСК (МРТ, 11 сутки, $N \geq 8$, * - $p = 0,019$; # - $p = 0,004$). Данные представлены в виде медианы (25%; 75%). Синяя пунктирная линия – объем очага поражения головного мозга у ЛО животных.

Гистологический анализ. При гистологическом анализе нами 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). Более того, в группе кМСК10х разница с контрольной группой по данному показателю оказалась статистически значимой ($p = 0,023$).

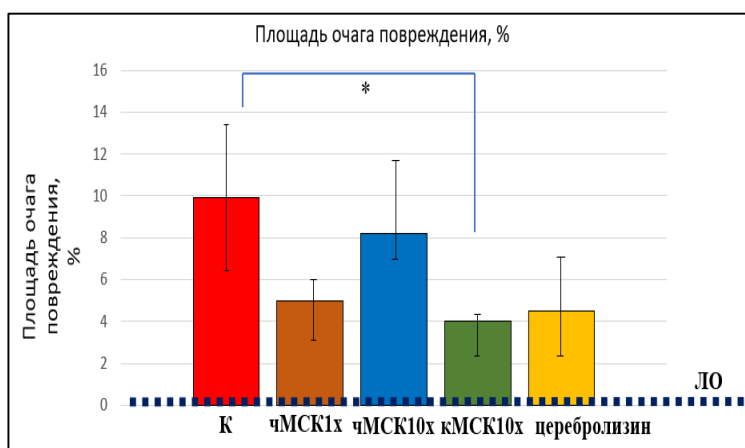


Рисунок 4. Сравнение площадей очага повреждения на срезах, окрашенных гематоксилин-эозином в эксперименте с интрацеребральным введением секрета МСК. Гистологический материал забирался на 14 сутки, $N \geq 4$, * - $p = 0,023$. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%).

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

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* индуцируемой глутаматом нейротоксичности на клетках нейробластомы SH-SY5Y (Nampoothiri et al., 2014; Nu 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 необходимое количество L-глутамата. А уже в контрольную группу (K-) не вносилось дополнительно никаких реактивов для мониторинга спонтанной гибели клеток в бессывороточной среде.

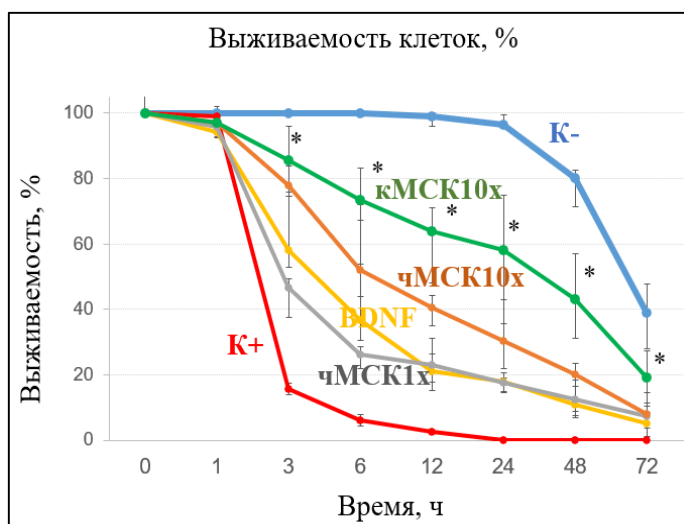


Рисунок 5. Результаты *in vitro* исследования прямой нейропротекторной активности секрета МСК. На диаграмме показана динамика выживаемости клеток нейробластомы SH-SY5Y в модели индуцируемой глутаматом нейротоксичности; N = 12; *- p < 0,001 в сравнении с группой контроля (K+, содержащая бессывороточную среду и глутамат).

Мы обнаружили, что секреты чМСК1х, чМСК10х, кМСК10х поддерживают выживание клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y в условиях индуцированной глутаматом нейротоксичности (рис. 5). 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 также с добавлением глутамата. 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=4, p < 0,05). 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.

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 (K), бессывороточную среду с 3,5 нг/мл человеческого BDNF или секретом МСК (человеческий чМСК1х и чМСК10х или крысиный кМСК10х). 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 сравнении с группой контроля (К) в отличие от группы BDNF.

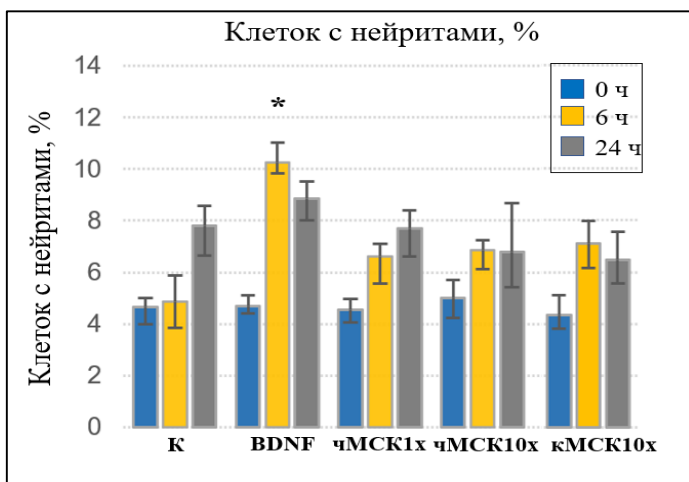


Рисунок 6. Сравнение роста нейритов клеток нейробластомы SH-SY5Y в экспериментальных группах. $N = 5$; *- $p < 0.005$ в сравнении с группой контроля (К). Данные представлены в виде медианы (25%; 75%).

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). Так, в группе без добавления секрета МСК 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 среднюю интенсивность окраски таких клеток 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. ($n=4$; $p < 0,05$).

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

Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга на маркер CD68 (маркер провоспалительных клеток М1-микроглии и лизосомальной активности) выявило достоверно более высокую 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 ($p = 0,034$; $n \geq 9$). Достоверной разницы в площади окрашивания на CD68 в остальных группах по сравнению с контрольной группой (К) не наблюдалось.

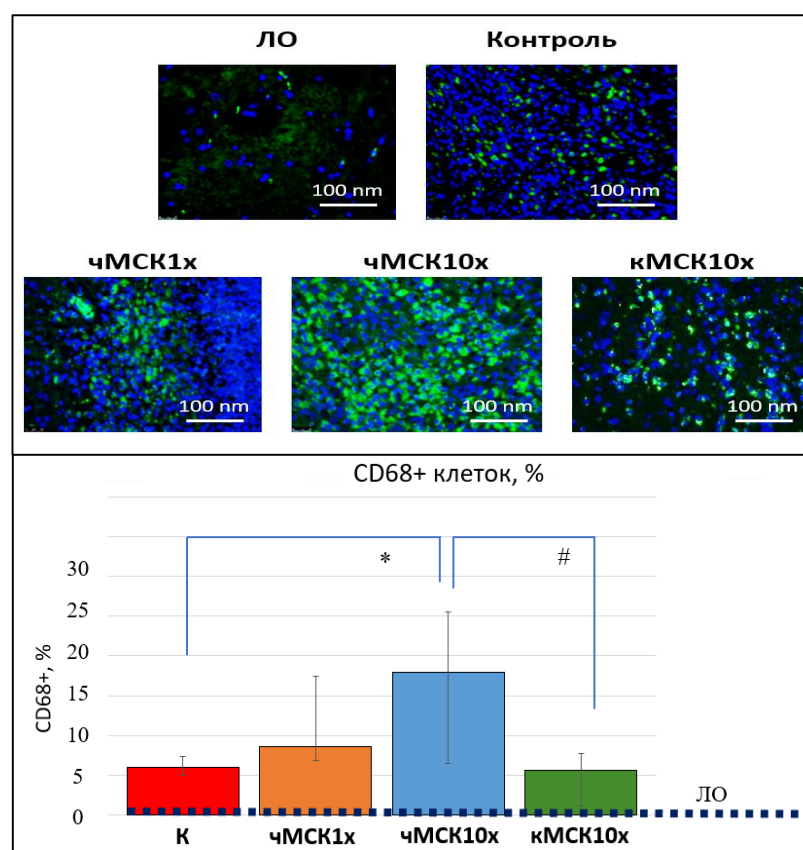


Рисунок 7. Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов головного мозга на маркер лизосомальной активности CD 68 (на 14 сутки). Вверху на фото: зеленое окрашивание соответствует окрашиванию CD68; синее окрашивание соответствует ядрам клеток. Внизу на диаграмме данные представлены в виде медианы (25%; 75%); * - $p = 0,034$; # - $p = 0,005$; $N \geq 9$. Данные представлены в виде медианы (25%; 75%).

Поскольку площадь, специфично окрашенная на CD68, в группе чМСК10х была значительно больше, чем в других группах, и коррелировала 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.

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 геморрагического 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 экспериментальных группах 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 исследования показывают, что в обеих экспериментальных группах с ингибированием как BDNF, так и uPA, секретом МСК в меньшей степени нивелирует неврологические дефициты, чем в группе кМСК10х, но лучше, чем в контрольной группе. МРТ исследование показало тенденцию к увеличению очагов поражения в группах с подавлением BDNF и uPA. Что свидетельствует о вкладе данных факторов в составе секрета МСК в реализацию нейропротекции после геморрагического инсульта.

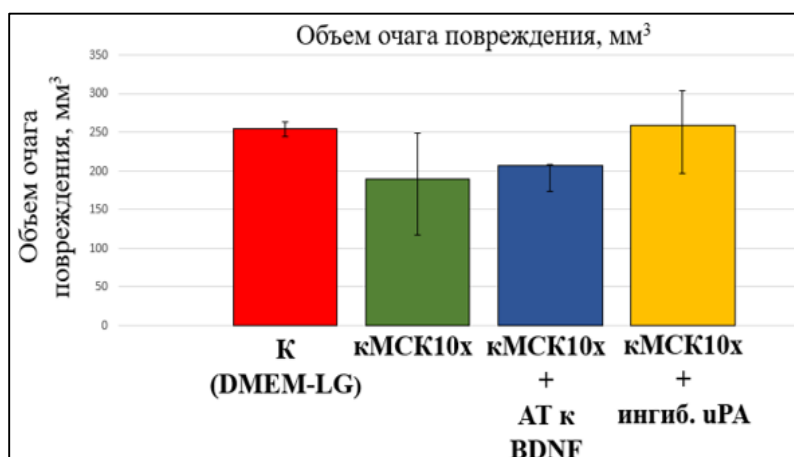


Рисунок 8. Сравнение объёмов очага повреждения (MPT, 11 сутки, $N = 5$). Данные представлены в виде медианы (25%; 75%).

Определение основных параметров введения бесклеточного препарата секрета МСК в модели геморрагического инсульта.

На данном этапе исследования нами был проведен анализ нейропротекторной 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 MPT и гистологическому анализу срезов в месте повреждения ткани мозга) нами был избран для дальнейших испытаний внутривенный способ введения секрета МСК (рис. 9, 10). 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.

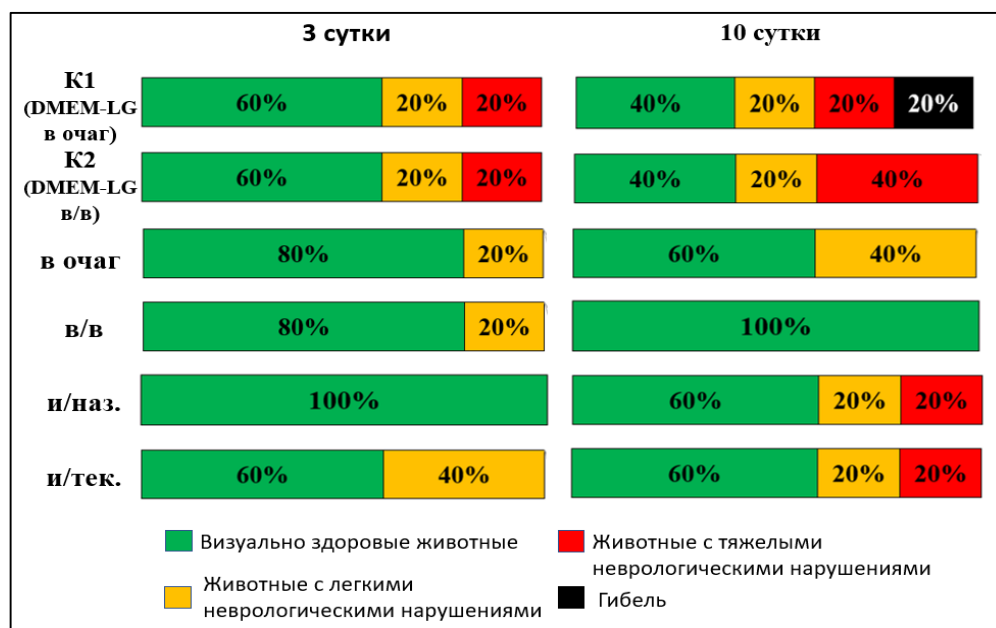


Рисунок 9. Оценка неврологических дефицитов у животных при различных путях введения секрета МСК на 3 и 10 сутки.

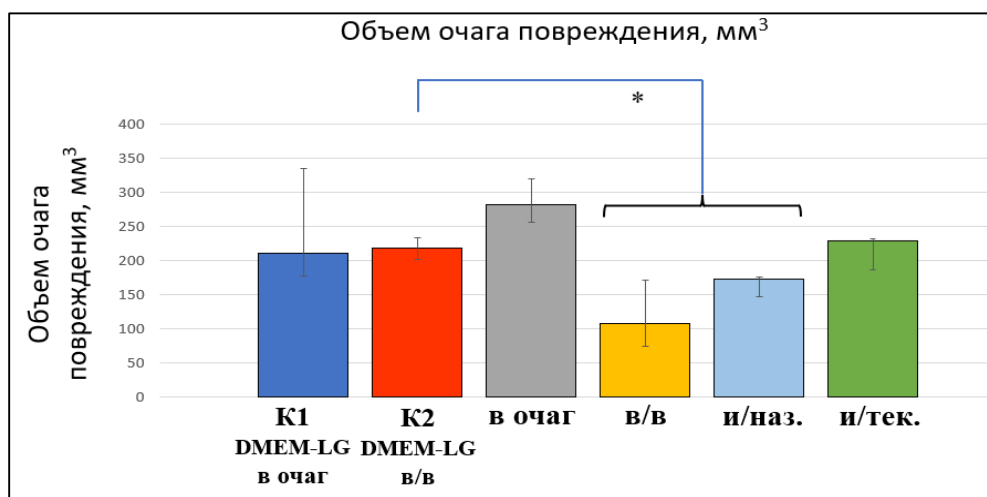


Рисунок 10. Объем очага повреждения при различных путях введения секрета МСК (MPT, 11 сутки, N = 5; *- p < 0,05). Данные представлены в виде медианы (25%; 75%).

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 (рис. 11).

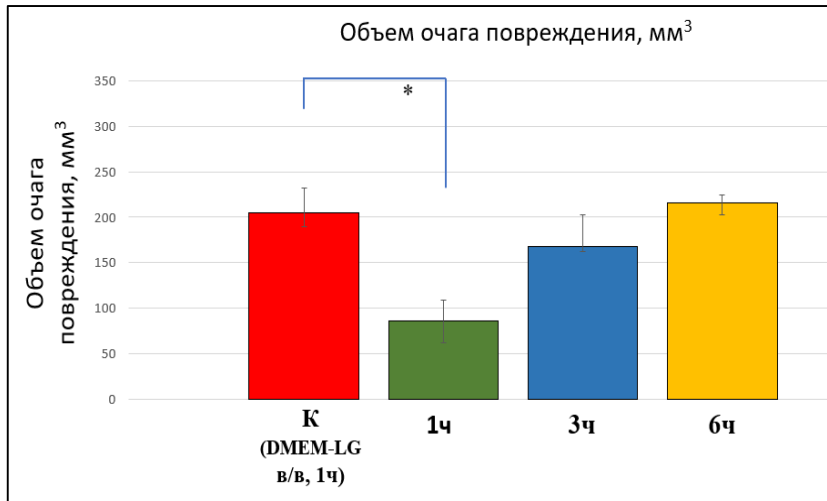


Рисунок 11. Сравнение объемов очага повреждения при различных временных интервалах введения секрета МСК от момента индукции ГИ (МРТ, 11 сутки, $N = 5$; * - $p < 0,05$). Данные представлены в виде медианы (25%; 75%).

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 секретом 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 (рис. 12) и гистологии.

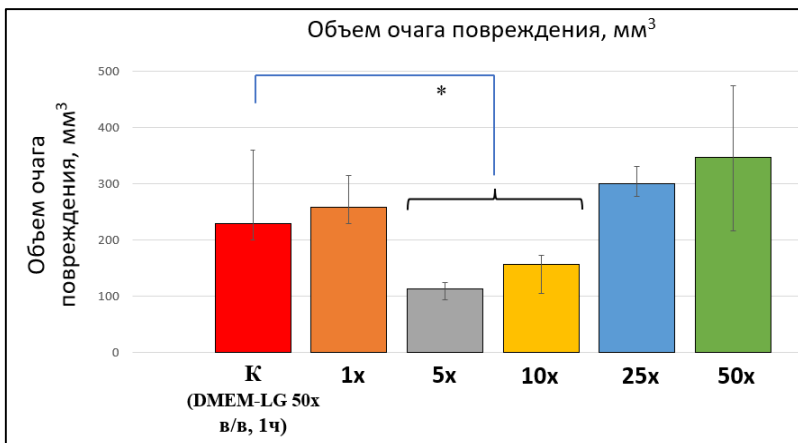


Рисунок 12. Сравнение объемов очага повреждения при различных временных интервалах введения секрета МСК от момента индукции ГИ (МРТ, 11 сутки, $N = 5$; * - $p < 0,05$). Данные представлены в виде медианы (25%; 75%).

Предположительно, данный эффект может объясняться концентрацией 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 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 нейральных клеток в условиях глутамат-индуцируемой токсичности. Секретом МСК не оказывал влияния на нейритогенез.
5. Секретом МСК эффективно препятствует поляризации клеток моноцитов/макрофагов в провоспалительный M1-фенотип и стимулирует поляризацию клеток моноцитов/макрофагов в противовоспалительный M2-фенотип, что свидетельствует о наличии у секрета МСК противовоспалительных свойств.
6. Продемонстрировано наличие нейропротекторного эффекта секрета МСК при внутривенном и интраназальном введении крысам с интрацеребральной посттравматической гематомой. При этом наибольшая эффективность секрета МСК наблюдалась при внутривенном введении крысам спустя 1 час после индукции патологии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальностям 1.5.5 - физиология человека и животных и 3.3.6 - фармакология, клиническая фармакология:

1. Karagyaur M., **Dzhauari S.**, Basalova N., Aleksandrushkina N., Sagaradze G., Danilova N., Malkov P., Popov V., Skryabina M., Efimenko A., Tkachuk V. MSC secretome as a promising tool for neuroprotection and neuroregeneration in a model of intracerebral hemorrhage //Pharmaceutics. – 2021. – Т. 13. – №. 12. – С. 2031 – 2046 (Scopus, Web of Science; квантиль Q1; IF=5.4) (0,872/0,43)*
2. **Dzhauari S.**, Litvinova S., Aleksandrushkina N., Abakumov M., Danilova N., Malkov P., Balabanyan V., Bezuglova T., Balayants V., Mnikhovich M., Gulyaev M., Skryabina M., Popov V., Stambolsky D., Tkachuk V., Karagyaur M. Urokinase-type plasminogen activator enhances the neuroprotective activity of brain-derived neurotrophic factor in a model of intracerebral hemorrhage //Biomedicines. – 2022. – Т. 10. – №. 6. – С. 1346 – 1357 (Scopus; квантиль Q1; IF=4.7) (0,64/0,42)*
3. **Dzhauari S.**, Basalova N., Primak A., Balabanyan V., Efimenko A., Skryabina M., Popov V., Velichko A., Bozov K., Акoпyан Z., Malkov P., Stambolsky D., Tkachuk V., Karagyaur M. The Secretome of Mesenchymal Stromal Cells in Treating Intracerebral Hemorrhage: The First Step to Bedside //Pharmaceutics. – 2023. – Т. 15. – №. 6. – С. 1608–1624 (Scopus, Web of Science; квантиль Q1; IF=5.4) (0,93/0,7)*
4. Басалова Н.А., **Джауари С.С.**, Юршев Ю.А., Примак А.Л., Ефименко А.Ю., Ткачук В.А., Карагяур М.Н. State-of-the-art: применение внеклеточных везикул и препаратов на их основе для нейропротекции и стимуляции регенерации ткани головного мозга // Нейрохимия. — 2023. — Т. 40, № 4. — С. 367–380 (RSCI Web of Science; IF=0.534) (0,758/0,42)*

* – Объем в усл. печ. л./вклад автора в усл. печ. л.

Патенты:

Патент РФ №2803286 Композиция для нейропротекции и стимуляции нейрорегенерации головного мозга после повреждения, средство на ее основе, способ его получения и применения / Ткачук В. А., Акоюн Ж. А., Садовничий В. А., Карагяур М. Н., **Джауари С. С.**, Ефименко А. Ю., Басалова Н. А., Попов В. С., Тарасова Е. В., Александрюшкина Н. А., Скрыбина М. Н., Примак А. Л., Григорьева О. А., Калинина Н. И., Сысоева В. Ю. – 12.09.2023 г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТ – антитела

ВМК – внутримозговое кровоизлияние

ГИ – геморрагический инсульт

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ИПГ – интрацеребральная посттравматическая гематома

ИФА – иммуноферментный анализ

кМСК – мезенхимные стволовые клетки крысы

чМСК – мезенхимные стволовые клетки человека

МСК – мезенхимные стволовые клетки

МСК-ЖТ – мезенхимные стволовые клетки жировой ткани

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

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

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

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

TGF- α , TGF- β – transforming growth factor- α , - β , трансформирующий фактор роста - α , - β

uPA – urokinase plasminogen activator, урокиназный активатор плазминогена

VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов