

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н. И. Пирогова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Черкашова Эльвира Андреевна

**«ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ
ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ОСТРОЙ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО
МОЗГА У КРЫС ПО ДАННЫМ МРТ И ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ»**

Специальность:

3.1.24 Неврология (медицинские науки)

3.3.3 Патологическая физиология (медико-биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, доцент

Губский Леонид Васильевич

Доктор биологических наук, профессор

Ярыгин Константин Никитич

Москва 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ	8
Актуальность	8
Степень разработанности темы исследования.....	11
Цель исследования	12
Задачи исследования.....	12
Научная новизна.....	13
Теоретическая и научно-практическая значимость.....	14
Методология и методы исследования.....	14
Основные положения, выносимые на защиту.....	15
Степень достоверности, апробация, внедрение и публикации	16
Личный вклад автора	18
Объем и структура диссертации.....	18
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
Мезенхимальные стволовые клетки.....	19
Характеристика мезенхимальных стволовых клеток.....	20
1.2 Источники получения мезенхимальных стволовых клеток	22
1.3 Механизмы действия МСК	23
1.3.1 Дифференцировка МСК	23
1.3.2 Трансдифференцировка МСК <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	24
1.3.3 Паракринное действие МСК.....	26
1.3.4. Влияние на глиальную реакцию.....	28
1.3.5 Иммуномодулирующее действие МСК.....	29
1.4 Трансплантация МСК на моделях экспериментального инсульта	32
1.5 Трансплантация МСК в клинических испытаниях.....	34
Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки	35
2.1 Пути получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ..	36

2.2	Плюрипотентность ИПСК.....	37
2.3	Трансплантация ИПСК на моделях экспериментального инсульта.....	38
2.4	Перспективы клеточной терапии ИПСК в клинической практике.....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ		43
	Лабораторные животные	43
	Клеточная культура.....	44
	Мезенхимальные стволовые клетки плаценты человека	44
	Нейрональные прогениторные клетки, полученные из индуцированных плюрипотентных клеток.....	46
	Протокол экспериментального исследования эффективности клеточной терапии на модели инфаркта головного мозга у крыс	48
	Моделирование острой фокальной ишемии головного мозга.....	51
	Внутривенное введение	53
	Магнитно-резонансная томография	53
	Морфометрия очага инфаркта мозга.....	55
	Оценка терапевтической эффективности клеточной терапии	55
	Шкала оценки неврологического дефицита mNSS	56
	Гистологическое исследование.....	59
	Флуоресцентная и конфокальная микроскопия.....	60
	Статистическая обработка результатов	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....		62
	Оценка терапевтической эффективности клеточной терапии на модели экспериментального инфаркта головного мозга.....	62
1.	Оценка и сравнение терапевтической эффективности внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга.....	62
1.1	Оценка выживаемости лабораторных животных	63
1.2	Оценка динамики изменения массы тела лабораторных животных	64

1.3 Оценка динамики изменения неврологического статуса лабораторных животных.....	65
1.4 Оценка динамики изменения объема очага ишемии головного мозга лабораторных животных	68
2. Оценка и сравнение терапевтической эффективности внутривенной трансплантации нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток человека, в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга.....	75
2.1 Оценка выживаемости лабораторных животных	75
2.2 Оценка динамики изменения массы тела лабораторных животных	76
2.4 Оценка динамики изменения объема очага ишемии головного мозга лабораторных животных	78
3. Сравнение терапевтической эффективности внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в дозе 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга	82
3.1 Оценка выживаемости лабораторных животных	82
3.2 Оценка динамики изменения неврологического статуса лабораторных животных.....	83
4. Распределение клеток после внутривенной трансплантации.....	86
4.1 Распределение МСК после внутривенной трансплантации	86
4.2 Распределение ИПСК-НПК при внутривенной трансплантации	104
5. Оценка активности глиальной реакции в полушарии инфаркта у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга.....	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
ВЫВОДЫ.....	122
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВСА — внутренняя сонная артерия;

ГСК – гематопозитические стволовые клетки;

ГЭБ – гемато-энцефалический барьер;

ИДО – идоламин-2,3-диоксигеназа;

ИЛ – интерлейкин;

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки;

НПК – нейральные прогениторные клетки;

НСА — наружная сонная артерия;

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения;

ОСА – общая сонная артерия;

СК – стволовые клетки;

СМА – средняя мозговая артерия;

МРТ – магниторезонансная томография;

МРС – магнитно-резонансная спектроскопия;

МСК – мезенхимальные стволовые клетки;

T2-ВИ – T2 взвешенное изображение;

BDNF: англ. – brain-derived neurotrophic factor – нейротрофический фактор мозга;

bFGF: англ. – basic fibroblast growth factor – основной фактор роста фибробластов;

BMP: англ. – bone morphogenetic proteins - костный морфогенетический белок;

c-Myc: англ. – транскрипционный фактор;

CXCR4: англ. – C-X-C chemokine receptor type 4 – CXС мрецептор хемокина 4 типа;

FDR: англ. – false discovery rate- средняя доля ложных отклонений гипотез (среди всех отклонений);

GDNF: англ. – glial cell-derived neurotrophic factor – нейротрофический фактор глиальной клеточной линии;

GFAP: англ. – glial fibrillary acidic protein - глиальный фибриллярный кислый белок;

GFP: англ. – green fluorescent protein – зеленый флюоресцентный белок;

HGF: англ. – hepatocyte growth factor – фактор роста гепатоцитов;

HLA-DR: англ. – рецептор главного комплекса гистосовместимости;

ISCT: англ. – International Society for Cellular Therapy - Международное общество клеточной терапии;

Klf4: англ. – Kruppel-like factor 4 – транскрипционный фактор;

LIF: англ. – leukemia inhibitory factor - лейкемия-ингибирующий фактор;

MAP-2: англ. – microtubule-associated protein 2 – белок, связанный с микротрубочками 2;

MBP: англ. – Myelin basic protein – основной белок миелина;

MHC: англ. – major histocompatibility complex - главный комплекс гистосовместимости;

mNSS: англ. – Modified Neurological Severity Scores - шкала для оценки тяжести неврологического дефицита;

MUSE-cells: англ. – multilineage-differentiating stressenduring – мультипотентные стрессоустойчивые клетки;

NeuN: англ. – neuronal nuclear antigen – нейрональный ядерный антиген;

NF-200: англ. – neurofilament protein 200 – нейрофиламентный протеин-200

NGF: англ. – nerve growth factor – фактор роста нервов;

NK: англ. – natural killers – натуральные киллеры;

Oct4: англ. – Octamer-4 – транскрипционный фактор;

p27 Kip1: англ. – cyclin-dependent kinase inhibitor – циклин-зависимый ингибитор киназы;

PBS: англ. – Phosphate buffered saline – фосфатно-солевой буферный раствор;

PD1: англ. – Programmed cell death 1 – белок запрограммированной клеточной смерти;

PDGF-BB: англ. – Platelet-derived growth factor BB – тромбоцитарный фактор роста BB;

SDF-1: англ. – stromal cell-derived factor-1 стромальный фактор роста -1;

SCF: англ. – Stem cell factor – фактор стволовых клеток;

Sox2: англ. – SRY-Box Transcription Factor 2 – транскрипционный фактор;

TCSC: англ. – tissue committed stem cells – клетки зародышевого листка;

TGF- β : англ. – Transforming growth factor beta – трансформирующий фактор роста бета;

TNF- α : англ. – Tumor Necrotic Factor alpha – фактор некроза опухоли альфа;

TOAST: англ. – Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment – клиническое исследование 10172 по терапии ишемического инсульта в остром периоде;

tPA: англ. – tissue Plasminogen Activator, – тканевой активатор плазминогена;

VEGF: англ. – vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия сосудов;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Ишемический инсульт является второй по частоте встречаемости причиной смерти и долгосрочной инвалидизации среди взрослого населения развитых стран [233]. В большинстве случаев ишемическое повреждение головного мозга возникает вследствие остро возникшего снижения или полного прекращения кровоснабжения вещества мозга. В основе патогенеза формирования очага поражения лежит быстротечный каскад клеточных и молекулярных механизмов: ацидоз, эксайтотоксичность, окислительный стресс, биоэнергетическая недостаточность и воспаление, что приводит к некротической или апоптотической гибели клеток [4]. Восстановление структурной целостности, а также функциональной активности ткани головного мозга считается фундаментальной основой процесса клинического восстановления организма. Множество научных исследований было посвящено изучению процессов патогенеза инфаркта мозга с целью определения возможностей этио- и патогенетической терапии [6]. Однако, существенным препятствием на пути создания универсальной и успешной терапевтической стратегии является ограниченное время жизнеспособности ткани головного мозга в условиях ишемии. Системное введение рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (tPA) и механическая эндоваскулярная тромбэкстракция в настоящее время являются единственными доказанными эффективными методами лечения острого инсульта. При этом данные методы терапии имеют ограничения по времени их применения. Согласно международным рекомендациям Европейской организации по борьбе с инсультом (European Stroke Organization) с целью реперфузии, а также минимизации рисков геморрагических осложнений, введение tPA возможно в течение 4,5 часов после начала ишемии [37], в то время как тромбэкстракция выполняется не позже 24 часов [29,139]. Стоит отметить, что согласно данным недавних исследований WAKE-UP (NCT01525290) [234] и EXTEND (NCT01580839) [156], терапевтическое окно

может быть безопасно продлено до 9 ч от начала инсульта в случае tPA. Несмотря на достижения в изучении терапевтических методик, направленных на причину возникновения ишемического инсульта, на данный момент не разработана тактика воздействия на другие звенья патогенеза данного заболевания, которая имела бы достаточную доказательную базу [5,158]. Поиск новых стратегий воздействия на вещество головного мозга в условиях ишемии остается актуальным направлением изучения для научного сообщества [3]. Исследования последних десятилетий показали, что одним из эффективных направлений лечения заболеваний нервной системы, в т.ч. ишемического инсульта, является регенеративная терапия стволовыми клетками [19,195]. Основным свойством стволовых клеток является плюрипотентность – способность дифференцироваться во все типы клеток, кроме клеток внезародышевых органов [11,15]. На заре изучения возможностей клинического применения стволовых клеток данное свойство рассматривалось, как основное преимущество клеточной терапии, лежащее в основе заместительного механизма их действия [10]. Данная гипотеза предполагала возможность миграции трансплантированных клеток в зону повреждения головного мозга и их дифференцировку в функционально зрелые нервные клетки. Однако, результаты многих научных исследований показали, что применение недифференцированных плюрипотентных стволовых клеток в эксперименте может приводить к образованию тератокарцином [111], что ограничивает переход исследований на клиническую фазу. В то же время применение более зрелых клеток, обладающих ограниченным потенциалом к дифференцировке, на животных моделях неврологических заболеваний демонстрировало терапевтический эффект, при этом не приводило к онкогенезу. Наиболее изученным типом стволовых клеток, применяемым как на доклинической, так и на клинической стадии исследований, являются мезенхимальные стволовые (стромальные) клетки (МСК) [14,125,38]. Во множестве научных работ, посвященных изучению влияния данного типа клеток на различных моделях

экспериментального инсульта, была доказана их безопасность и клиническая эффективность, были также изучены особенности миграции и влияния клеток при различных путях их введения у лабораторных животных [20]. Также выявленные такие свойства мезенхимальных стволовых клеток, как возможность к трансдифференцировке в клетки нейронального типа [169,28,167], низкая иммуногенность [26], противовоспалительное и иммуномодулирующее действие [81], позволяют рассматривать данный тип клеток как наиболее перспективный к применению в терапии ишемического инсульта.

В последние десятилетия приобрело популярность новое направление исследования клеточной терапии с применением клеток, прошедших предварительную обработку с использованием новой технологии дедифференцировки до состояния стволовости (такие клетки носят название индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, ИПСК), а затем направленной дифференцировки до нейрональных прогениторных клеток, что повышает тропность трансплантата к нервной ткани. По данным проведенных исследований, несмотря на прошедшую стадию плюрипотентности, применение данного типа клеток не приводило к тератогенезу, как в случае с недифференцированными ИПСК [111]. Однако, поскольку данная технология вирусной обработки трансплантата является относительно новой, имеется ограниченное количество данных об особенностях механизмов действия и клинической эффективности данного типа клеток.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных терапии ишемического инсульта вышеописанными типами стволовых и прогениторных клеток, остается неясным вопрос о механизмах их действия, зависимости клинической эффективности их применения от дозы трансплантата, а также выявления возможных различий применения мезенхимальных стволовых клеток в сравнении с нейрональными прогениторными клетками, полученными из индуцированных

плюрипотентных стволовых клеток, в условиях острой фокальной ишемии головного мозга у лабораторных животных.

Степень разработанности темы исследования

На протяжении последних 30 лет свойства МСК, механизмы их действия и терапевтическая эффективность применения МСК на различных моделях инфаркта головного мозга у лабораторных животных широко изучались. Неоднократно было показано, что трансплантация МСК в остром периоде ишемического повреждения вещества головного мозга приводит к регрессу неврологического дефицита по данным шкал, оценивающих неврологический статус у грызунов, а также различных поведенческих тестов и диагностических методик [133,154]. В некоторых работах также был показан регресс объема ишемического очага у животных, получавших регенеративную клеточную терапию [96]. При этом выраженность терапевтического эффекта клеточной трансплантации была различной в зависимости от пути введения МСК [227]. Неоднократно показанная эффективность внутримозговой и внутриартериальной трансплантации объясняется более адресной доставкой введенных клеток к очагу поражения в головном мозге. Однако, ограничением для обоих методов является инвазивность, требующая дополнительного хирургического вмешательства при трансплантации [89]. А при внутриартериальном введении также существует высокий риск клеточной эмболии, что также ограничивает применение данного способа трансплантации в клинической практике [89]. Подобных ограничений лишен внутривенный путь введения. Несмотря на то, что при внутривенной трансплантации через периферическую вену клетки задерживаются в паренхиматозных органах [75], и попадают в головной мозг в меньшем количестве, чем при вышеописанных способах трансплантации, доказана терапевтическая эффективность такого способа применения клеточной терапии МСК [221,86]. При этом клинические эффекты наблюдались при внутривенной трансплантации МСК в широком диапазоне доз [129]: повышалась выживаемость грызунов, отмечалось более быстрое и

эффективное восстановление неврологических функций, а также в некоторых исследованиях при внутривенном введении МСК уменьшался объем ишемического очага в головном мозге. Несмотря на показанные преимущества клеточной терапии МСК, оптимальная доза клеток для внутривенной трансплантации не была подобрана. А также количество исследований по оценке и сравнению терапевтической эффективности различных доз МСК крайне ограничено.

В большинстве исследований, посвященных изучению механизмов действия МСК, лежащих в основе восстановления неврологических функций животных с экспериментальным инфарктом мозга, основную роль отводят паракринному влиянию трансплантированных клеток на организм реципиента. Как было показано, уменьшению неврологического дефицита животных способствует активизация нейропластичности вещества головного мозга, усиление ангиогенеза, уменьшение выраженности воспалительной реакции, а также активизация нейрогенеза за счет собственных стволовых клеток организма реципиента. Однако, несмотря на имеющиеся данные о свойствах МСК, до сих пор остаются неизвестными в полной мере особенности распределения трансплантированных клеток, а также их влияния на церебральные изменения при ишемическом инсульте при внутривенной трансплантации.

Цель исследования

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на церебральные изменения при острой фокальной ишемии головного мозга у крыс по данным МРТ и гистологического исследования.

Задачи исследования

1. Оценить и сравнить терапевтическую эффективность внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга;

2. Оценить и сравнить терапевтическую эффективность внутривенной трансплантации нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга;

3. Сравнить терапевтическую эффективность внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в дозе 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга;

4. Изучить прижизненное распределение мезенхимальных стволовых клеток в головном мозге при их внутривенной трансплантации крысам с моделью острой фокальной ишемии головного мозга по данным магнитно-резонансного исследования;

5. Изучить особенности распределения трансплантированных внутривенно мезенхимальных стволовых клеток в головном мозге крыс с острой фокальной ишемией головного мозга по данным гистологического исследования.

6. Оценить влияние внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на активность глиальной реакции в полушарии инфаркта в рамках изучения механизма действия клеточной терапии у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга по данным иммуногистохимического исследования.

Научная новизна

Проведено комплексное изучение и сопоставление терапевтической эффективности клеточной терапии МСК в различных дозировках при внутривенной трансплантации крысам с моделью экспериментального инфаркта головного мозга. Была исследована и сопоставлена терапевтическая эффективность различных дозировок ИПСК-НПК после внутривенной трансплантации крысам с моделью острой фокальной ишемии

мозга. На основании полученных результатов исследования были выявлены оптимальные дозировки клеток МСК и ИПСК-НПК и была сопоставлена эффективность их применения после внутривенной трансплантации крысам с инфарктом головного мозга. Проведено исследование влияния трансплантации МСК на активность глиальной реакции вещества головного мозга, в рамках изучения механизмов действия МСК в остром периоде ишемического инсульта у животных. Были получены новые данные о распределении МСК в головном мозге у крыс с церебральным инфарктом при внутривенной трансплантации.

Теоретическая и научно-практическая значимость

Полученные результаты способствуют лучшему пониманию механизмов действия, распределения и миграции МСК при трансплантации в условиях ишемического инсульта. Полученные данные об оптимально эффективной дозировке трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток создадут основу для разработки клеточного препарата при переходе к клиническим испытаниям.

Методология и методы исследования

Работа выполнена на базе Центра Коллективного Пользования "Медицинские и биотехнологические нанотехнологии" ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова и при финансовой поддержке гранта Министерства Образования и Науки Российской Федерации № 2020-1902-01-349 «Нанобиотехнологии в диагностике и терапии социально значимых заболеваний». В ходе работы были применены микрохирургические операции по воспроизведению экспериментального инфаркта головного мозга путем эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии монофиламентом. При помощи магнитно-резонансной томографии производилась оценка объема ишемического очага головного мозга в динамике, выявление геморрагических трансформаций, а также обеспечение прижизненной визуализации меченных микрочастицами суперпарамагнитного оксида железа мезенхимальных стволовых клеток во

время внутривенной трансплантации. МР-исследование проводилось на высокопольном МР-томографе для малых лабораторных животных с напряженностью магнитного поля 7 Тесла и с использованием комбинаций современных импульсных последовательностей. Для верификации данных МРТ, а также для изучения активности глиальной реакции вещества головного мозга проводилось гистологическое и иммуногистохимическое исследование с последующей флуоресцентной и конфокальной микроскопией полученных гистологических срезов. Оценка восстановления неврологических функций проводилась при помощи шкалы для оценки неврологического статуса у лабораторных животных. Полученные данные были обработаны с использованием методов статистического анализа и компьютерной обработки (Microsoft Office 2019, IBM SPSS Statistics 23.0).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Было показано положительное терапевтическое влияние внутривенной трансплантации МСК на ускорение функционального восстановления лабораторных крыс, оцененное при помощи шкалы оценки неврологического статуса у лабораторных грызунов (mNSS), после моделирования острой фокальной ишемии головного мозга. Был выявлен дозозависимый эффект внутривенной инфузии МСК: положительное влияние на регресс неврологического дефицита было показано при внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 клеток с 14 суток, и более выраженное влияние на скорость и выраженность восстановления неврологических функций -при трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток.
2. Была продемонстрирована терапевтическая эффективность внутривенной трансплантации ИПСК-НПК на течение экспериментального инсульта у лабораторных крыс по показателю выживаемости лабораторных животных – при трансплантации 5×10^5 и 2×10^6 клеток, и регресса неврологического дефицита, оцененного по шкале mNSS – при трансплантации 2×10^6 клеток.
3. Внутривенная трансплантация МСК и ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток оказывает равное по эффективности терапевтическое воздействие на течение

экспериментального инсульта у крыс по показателю регресса неврологического дефицита, при этом введение ИПСК-НПК также значительно улучшало выживаемость лабораторных животных после моделирования инфаркта головного мозга.

4. При внутривенной трансплантации МСК через 24 часа после воспроизведения экспериментального инсульта распределение клеток носит диффузный характер, что было продемонстрировано при помощи МР исследования головного мозга лабораторных крыс в режиме реального времени во время клеточной инфузии. Единичные скопления меченых МСК начинают визуализироваться с 7-й минуты от начала введения клеток, накапливаются в течение 1 часа, затем отмечается постепенное исчезновение гипоинтенсивного сигнала от меченых МСК в церебральных структурах. Через 24 часа после трансплантации меченые клетки в головном мозге не визуализируются по данным МРТ.

5. По данным гистологического исследования единичные меченые МСК в образцах головного мозга лабораторных крыс с экспериментальным инфарктом головного мозга визуализируются через 2 часа после внутривенной клеточной трансплантации. При этом через 24 часа после внутривенного введения меченые клетки не детектируются по данным конфокальной микроскопии. При исследовании образцов ткани паренхиматозных органов наибольшее количество меченых МСК выявляется в ткани легких, а также клетки визуализируются в ткани печени, почек и селезенки.

6. По данным иммуногистохимического исследования на 7-е сутки после внутривенной трансплантации МСК отмечается значимое уменьшение активности глиальной реакции в области коры полушария инфаркта у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга.

Степень достоверности, апробация, внедрение и публикации

Высокая степень достоверности полученных результатов и выводов достигалась благодаря достаточному количеству экспериментальных данных,

использованию сертифицированного научного оборудования, а также адекватной статистической обработке данных. Экспериментальная работа была одобрена этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России - протокол №114 от 30.01.2012 года, университетской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова – протокол №13/2020 от 08.10.2020 года и протокол №24/2021 от 10.12.2021 года.

Апробация результатов диссертации прошла на заседании кафедры Неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России №10 от 17.05.2022 года.

Результаты, полученные в ходе диссертационной работы были доложены, обсуждены и одобрены на международных конференциях: 4th European Stroke Organisation (Готенбург, Швеция, май 2018 года), STERP INTERNATIONAL CONFERENCE “Translational Research in Cell Therapy” (Москва, апрель 2018 года), 11th World Stroke Congress (Монреаль, Канада, октябрь 2018 года), XVII Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Российская Федерация, июнь 2021 года), XVIII Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Российская Федерация, июнь 2022 года).

Материалы исследования использованы в программе учебных занятий элективного курса «Современные клеточные технологии в биологии, медицине и нейрохимии» для студентов медико-биологического и иностранного факультетов ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Также полученные в ходе исследования данные использованы в научно-исследовательской работе отдела ультразвуковой и функциональной диагностики ФГБУ «ФЦМН» ФМБА России и в работе центра коллективного пользования "Медицинские и биотехнологические нанотехнологии" ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из которых 5 - в изданиях, рецензируемых ВАК, 3 научных статьи - в научных журналах, индексируемых в базе данных SCOPUS, а также 5 тезисов докладов на международных конференциях.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в поиске и анализе научно-исследовательской литературы по проблематике диссертационной работы, разработке дизайна и организации методологических подходов к реализации исследования. Автор самостоятельно выполнил эксперимент в полном объеме, который заключался в выполнении оперативных вмешательств на лабораторных животных, проведении МР-исследований и поведенческих тестов. Также автор принимал участие в подготовке материала для гистологических исследований. При непосредственном участии автора производилась интерпретация данных, полученных на основании методов нейровизуализации и гистологии, а также статистическая обработка результатов экспериментальной работы, написание текста диссертационной работы, подготовка научных статей и докладов.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 155 машинописных страницах, содержит 2 таблицы, 46 рисунков; состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 234 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Мезенхимальные стволовые клетки

Мезенхимальные стволовые клетки или мультипотентные мезенхимные стромальные клетки – это клетки-предшественники, образующиеся из мезенхимы в ходе эмбрионального развития, и дающие начало различным типам соединительной ткани: костной, хрящевой, жировой и другим.

В первой половине XX в. гистологом А.А. Максимовым впервые была сформулирована теория о наличии во взрослом организме клеточного резерва для регенерации соединительных тканей, согласно которой во взрослом организме сохраняются недифференцированные клетки эмбриональной мезенхимы, служащие источником пополнения фибробластов и других клеточных элементов соединительных тканей [7,141,13]. Несколько десятилетий спустя А.Я. Фриденштейн впервые экспериментально подтвердил присутствие клеток в строме костного мозга и других кроветворных органов, способных к росту с образованием колоний фибробластоподобных клеток, названных колониеобразующими единицами фибробластов (КОЕ-Ф) [80,79,18,16]. Была показана способность этих клеток к самоподдержанию как *in vitro*, а также при трансплантации *in vivo*, с последующей дифференцировкой в хрящевую и костную ткани [80]. При этом в эксперименте на животных было показано, что трансплантация даже единичной клональной колонии может приводить к дифференцировке в нескольких направлениях, что свидетельствует о мультипотентности КОЕ-Ф. В 90-х годах зарубежными учеными была предложена концепция мезенхимных стволовых клеток [45]. Для прояснения терминологии Международное общество клеточной терапии (ISCT, Ванкувер, Канада) рекомендовало обозначать популяции фибробластоподобных клеток с множественными потенциями к дифференцировке термином «мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки» или «мезенхимальные стволовые клетки» (МСК).

За последние три десятилетия было проведено множество исследований, посвященных изучению свойств МСК, фундаментальных аспектов их жизнедеятельности и потенций к пролиферации и дифференцировке.

Характеристика мезенхимальных стволовых клеток

Существует минимальный набор критериев мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, определенный Комитетом по мезенхимальным и тканевым стволовым клеткам Международного общества клеточной терапии [70]:

1. Адгезивность к пластику при культивировании в стандартных условиях;

Способность прикрепляться к культуральному пластику свойственна всем МСК и является необходимым условием пролиферации *in vitro*. Однако, адгезивные свойства разных популяций МСК неодинаковы [23].

2. Экспрессия специфических поверхностных антигенов;

Поскольку на данный момент не выявлен универсальный маркер, позволяющий идентифицировать МСК, согласно критериям ISCT, обязательным условием является одновременная экспрессия совокупности поверхностных антигенов CD73, CD 90, CD 105. При этом ни одна из этих молекул не является строго специфичной для МСК. Поскольку экспрессия данных антигенов встречается у других клеток, прежде всего кроветворных, для идентификации МСК необходимо исключить наличие примеси таких клеток. Для этого в выделенной культуре клеток не должны определяться следующие маркеры, свойственные кроветворным клеткам: CD 45, CD 34, CD 14 или CD 11b , CD79 α или CD 19, HLA-DR.

3. Способность дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и хондробласты *in vitro*.

Одновременное соблюдение всех трех условий позволяет отнести исследуемую популяцию клеток к категории МСК.

Несмотря на утвержденные четкие критерии определения МСК, сохраняются некоторые вопросы о происхождении и функциональных возможностях данного типа клеток. Некоторые авторы предполагают, что перициты или адвентициальные клетки микроциркуляторного русла являются МСК [45], так как сходятся во многих характеристиках: перициты близки к МСК по набору экспрессируемых генов, обладают сходной с ними чувствительностью к факторам роста, способны к самоподдержанию и могут дифференцироваться *in vitro* в остеобласты, хондроциты, адипоциты, миоциты и гладкомышечные клетки, а также формировать очаги эктопического остеогенеза *in vivo*. Так по данным Crisan et al. перициты, обнаруженные в сосудистых стенках различных органов с помощью определенных маркеров, после длительного культивирования, были сходны с МСК по экспрессии генов, потенциалу к дифференцировке *in vitro* и остеогенезу *in vivo* [43,61,160]. Косвенным подтверждением данной теории является то, что присутствие МСК во многих исследованиях было показано в непосредственной близости от кровеносных сосудов, в том числе в адвентиции артерий, кровоснабжающих различные органы [59]. Однако, МСК обнаруживаются вблизи стенок артерий и вен, в то время как перициты определяются периваскулярно сосудам микроциркуляторного русла [94]. Также в периваскулярном пространстве помимо МСК могут присутствовать и другие тканеспецифические клетки-предшественники в соответствующих органах. Также на данный момент не доказано, что перициты обладают широким потенциалом к дифференцировке [45], что не дает права приравнять понятия МСК и перицитов в полной мере. Наравне с этим, неизвестно, способны ли МСК *in vivo* выполнять все функции перицитов, включая стабилизацию капилляров, фагоцитоз, а также регуляцию проницаемости и тонуса кровеносных сосудов. Таким образом, вероятнее всего, не все перициты являются МСК [45], несмотря на имеющиеся сходства этих типов клеток, а в периэндотелиальном пространстве представлены гетерогенные по составу клетки [203]. Локализация МСК в

перизндотелиальном пространстве свидетельствует о том, что эндотелий является важным компонентом ниши этих клеток, способным регулировать их функциональную активность [183]. Исходя из данной теории подразумевается присутствие в организме двух типов МСК [106]: циркулирующие в крови МСК костномозгового происхождения, участвующие в процессах репарации поврежденных тканей, и резидентные МСК, локализованные в периваскулярных пространствах во всех органах, регулирующие физиологическое обновление тканей. Однако, несмотря на описанное присутствие популяций резидуальных МСК во многих органах, каковы особенности взаимодействия их с аутогенными стволовыми клетками еще предстоит выяснить.

1.2 Источники получения мезенхимальных стволовых клеток

Клетки со свойствами МСК были впервые обнаружены в костном мозге [79], а затем практически во всех тканях взрослого организма [192]: селезенке, печени, почке, легких, костном мозге, в скелетных мышцах, вилочковой железе, поджелудочной железе, в стенках крупных и мелких сосудов, трабекулярной кости [223], надкостнице [140], синовиальной мембране [36], головном мозге [104,25], эндометрии [151], коже [168], жировой ткани [232], пульпе зуба [88,171], а также во внезародышевых тканях: плаценте [179], пуповинной крови [60,212,126] Костный мозг, как источник МСК, наиболее ценен ввиду содержания большого количества исследуемых клеток. Однако, более простым и менее травматичным по способу получения источником МСК в настоящее время является жировая ткань, пульпа зуба и плацента. Согласно имеющимся данным, выделенные из разных тканей МСК отличаются по потенции к формированию колоний, экспрессии генов и дифференцировке. Существует гипотеза, согласно которой, в ходе эмбриогенеза МСК последовательно мигрируют из одного кроветворного органа в другой, создавая подходящее для дифференцировки кроветворных клеток микроокружение. Эта гипотеза основана на факте обнаружения КОЕ-Ф в пуповинной крови, ткани печени, селезенки и костном

мозге на стадии эмбриогенеза, при этом прослеживается корреляция количества КОЕ-Ф с началом гемопоэза в различных кроветворных органах. Однако, постоянное присутствие МСК в периферической крови взрослого организма в настоящее время не доказано. Данные различных исследований, посвященных данной тематике, противоречивы. Есть исследования, показавшие, что происходит повышенный выброс МСК в кровь в условиях патологии [178], что вероятно, указывает на влияние МСК на ход регенеративных процессов или же непосредственное участие в них [2,160].

1.3 Механизмы действия МСК

Исторически стволовые клетки ввиду своей плюрипотентности рассматривались, как субстрат для заместительной терапии заболеваний, сопровождающихся необратимым повреждением тканей. Однако, было выяснено в испытаниях на животных, что неограниченная способность к дифференцировке имеет оборотную сторону в виде возможного тератогенеза. В связи с этим вектор исследований в области клеточной биологии сменился на поиск оптимального типа стволовых клеток, которые обладали бы ограниченным, но достаточно широким потенциалом к дифференцировке. По результатам исследований *in vitro* и *in vivo* способность МСК к пролиферации и дифференцировке определяет перспективность их применения в клеточной терапии.

1.3.1 Дифференцировка МСК

Согласно критериям ISCT, одним из обязательных условий характеристики МСК является способность исследуемых клеток дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и хондробласты *in vitro*. В ходе изучения свойств МСК многими учеными также была подтверждена возможность такой дифференцировки *in vivo* [31,93,127]. Однако имеются данные, подтверждающие возможность трансдифференцировки МСК, то есть способности дифференцироваться в клетки другого зародышевого листка [160]: эндотелиоциты [104,117], клетки различных типов мышечной ткани [148,200], в том числе кардиомиоциты [138], гепатоциты [34,193], и клетки

нервной ткани [169,28,167]. Несмотря на способности к дифференцировке в различные типы тканей, не было получено данных о способности МСК давать рост опухолям ни в эксперименте, ни в клинических исследованиях [113,48]. Безопасность, а также наличие потенциала к дифференцировке позволяет рассматривать клеточную терапию МСК, как перспективный метод лечения заболеваний, связанных с повреждением различных тканей и органов. Однако, несмотря на большой пласт информации, посвященных изучению данного свойства МСК, ряд авторов ставит под сомнение обширность диапазона дифференцировки МСК *in vitro* и *in vivo*, в связи с чем, на данный момент исследования в области биологии данного типа клеток не теряют своей актуальности.

1.3.2 Трансдифференцировка МСК *in vitro* и *in vivo*

В течение многих лет было принято считать, что костный мозг содержит стволовые клетки, предрасположенные к ограниченной дифференцировке - только в клетки данного зародышевого листка (tissue committed stem cells (TCSC)). Однако, по данным исследования Kucia M. и соавторов [121,120] в костном мозге содержится популяция клеток CXCR4 +, которые экспрессируют маркеры TCSC нервной ткани (бета-III-тубулин, нестин, NeuN и GFAP), а также образуют нейросферы *in vitro*. При этом ученые выяснили, что данный тип клеток TCSC мобилизуется в периферическую кровь после инсульта и мигрирует под действием определенных рецепторов и хемокинов (SDF-1 и CXCR4, HGF и c-Met, LIF и LIF-R) в область поврежденной нервной ткани. Тот же механизм хоуминга в направлении очага повреждения посредством взаимодействия SDF-1 и CXCR4, а также HGF и c-met описан и для МСК [194,82]. Во многих предшествующих работах была продемонстрирована способность МСК дифференцироваться в астроциты [219] и олигодендроцитарные линии, такие как NG2-позитивные клетки [189] *in vitro*, а также выявлен потенциал дифференцировки в нейрональную линию клеток [30,57,220]. Особый интерес представляет вопрос возможной трансдифференцировки МСК в

клетки нервной ткани в эксперименте. Некоторые авторы показали способность МСК дифференцироваться в нейроноподобные клетки *in vivo* [54,90]. По данным некоторых авторов, МСК могут дифференцироваться в нейроны в условиях воздействия факторов, выделяемых клетками микроокружения, в которое они попадают. Так в исследовании Zhi-Jian Wei et al. [217] было показано, что МСК костного мозга под воздействием секрета шванновских клеток приобретают нейроноподобную форму и отростки, а также происходят качественные изменения в микро РНК, опосредующие возможность трансдифференцировки в нейроноподобные клетки.

В 2000 году впервые в эксперименте *in vivo* была продемонстрирована способность донорских МСК дифференцироваться в клетки, экспрессирующие белки, характерные для нейронов (NeuN, бета-тубулин III класса и другие) [42,146]. Однако, в то же время в исследованиях других авторов подобный результат не достигался, что дало повод усомниться в воспроизводимости и стабильности описанного явления [47,210].

В некоторых работах было продемонстрировано, что трансплантированные МСК проникают в эндотелиальную оболочку растущих капилляров и периэндотелиальное пространство вновь образованных кровеносных сосудов, тем самым стабилизируя их [205]. Также было предположено, что возможность трансдифференцировки МСК костного мозга в нейроны зависит от взаимодействия трансплантата с окружающими тканями реципиента [218,24] или же специфической предварительной подготовки трансплантата [55].

Существует гипотеза, согласно которой к трансдифференцировке в клетки других зародышевых листков способны не все МСК, а только малый процент. Такие клетки получили название «мультипотентные стрессоустойчивые клетки» (Multilineage-differentiating stressenduring, MUSE) [211,68]. Такой тип клеток экспрессирует маркеры плюрипотентности и образует производные всех трех зародышевых листков. Однако по

сравнению с другими плюрипотентными клетками (эмбриональными и индуцированными), Muse-клетки не способны формировать тератомы.

Несмотря на то, что факт трансдифференцировки *in vivo* подвергается сомнениям [160,187], терапевтическая эффективность трансплантации МСК животным с различными заболеваниями нервной системы, в том числе ишемическим инсультом, доказана во множестве исследований [54,52,101,224]. При этом во многих исследованиях, посвященных изучению особенностей влияния системной трансплантации МСК на модели экспериментального инсульта показано, что малое количество введенных системно МСК попадает в область очага инфаркта мозга, успешно приживается в нем и обнаруживается по прошествии длительного времени [22,162]. Известно, что при внутривенной и внутриартериальной трансплантации подавляющее большинство МСК попадает в легкие в течение первых 48 ч. [84,213]. А по данным Li с соавторов, около 4% клеток остается в мозге крысы через 14 дней после инъекции в хвостовую вену [130].

В большинстве публикаций авторы утверждают, что МСК стимулирует нейрогенез, основываясь на данных иммуногистохимии: после трансплантации МСК отмечалась повышенная экспрессия белков нейрогенеза, в том числе нейронального ядерного антигена (neuronal nuclear antigen, NeuN), антител к структурному белку микротрубочек (microtubule-associated protein 2, MAP-2), глиального фибриллярного кислого белка (glial fibrillary acidic protein, GFAP). В то же время есть научные работы, показавшие, что только небольшой процент (<10%) трансплантированных МСК дифференцируются и самостоятельно экспрессируют нейрональные маркеры [69,63].

1.3.3 Паракринное действие МСК

На сегодняшний день существует много исследований, в которых доказано положительное влияние трансплантации МСК животным с моделями различных неврологических заболеваний, а также в некоторых

исследованиях на людях с патологией нервной системы [12]. В связи с тем, что предположение о заместительном механизме действия МСК остается дискуссионным, сформировалась гипотеза паракринного механизма действия МСК [129].

Когда А.Я. Фриденштейном впервые были обнаружены фибробластоподобные стволовые клетки (впоследствии названные мезенхимальными стволовыми клетками) стромы костного мозга было высказано предположение, что данный тип клеток участвует в жизнедеятельности кроветворных стволовых клеток паракринным путем [17]. По данным ряда авторов, МСК при котрансплантации с гемопоэтическими стволовыми клетками выделяют цитокины, способствующие приживлению (SDF1-стромальный фактор 1), пролиферации и дифференцировке ГСК (гранулоцитарный и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, фактор стволовых клеток (SCF), интерлейкин-6) [1,145].

Учитывая множество научных данных, указывающих на ограниченные возможности МСК к трансдифференцировке в нейрональном направлении в эксперименте, вероятнее всего, терапевтическое действие МСК заключается в комплексе воздействий на патологические процессы в очаге ишемического повреждения вещества мозга, также осуществляемых паракринным путем. В научных исследованиях неоднократно было показано, что МСК секретируют широкий спектр хемокинов, цитокинов, факторов роста и внеклеточных везикул. В настоящее время научные разработки в сфере клеточной терапии сконцентрированы на изучении составляющих секрета МСК и особенностей их влияния на патологически измененную ткань [106,74]. В научных исследованиях под руководством Ткачук В.А. было установлено, что стромальные клетки, полученные из жировой ткани, в т.ч. МСК, продуцируют ангиогенные и нейротрофические факторы роста, включая VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), bFGF (основной фактор роста фибробластов), HGF (фактор роста гепатоцитов), ангиопоэтин, NGF (фактор

роста нервов), BDNF (нейротрофический фактор мозга) и GDNF (нейротрофический фактор глиальной клеточной линии) [181]. При трансплантации выделяемые факторы ангиогенного роста стимулируют деление эндотелиальных клеток, их миграцию и образование кровеносных сосудов, а также способствуют мобилизации эндотелиальных прогениторных клеток из костного мозга, которые также участвуют в неоангиогенезе [115,87]. В то же время нейротрофические факторы, продуцируемые МСК, стимулируют рост и обновление нервных окончаний [44,135]. Помимо участия в регенерации поврежденной ткани, трансплантированные МСК продуцируют следующие факторы, необходимые для функционального созревания кровеносных сосудов и их стабилизации: bFGF (основной фактор роста фибробластов), PDGF-BB (тромбоцитарный фактор роста BB) и TGF- β (трансформирующий фактор роста бета) [181,72,180]. PDGF-BB способствует разветвлению растущих кровеносных сосудов и миграцию перицитов, гладких мышечных клеток и мезенхимальных клеток; в то время как TGF- β стимулирует дифференцировку гладкомышечных клеток и продукцию компонентов внеклеточного матрикса сосудистой стенки [188]. При этом по данным Рубиной и соавторов (2009 год), в условиях гипоксии происходит значительное увеличение количества продуцируемых МСК веществ [181,8]. Таким образом, трансплантация МСК в условиях ишемического повреждения нервной ткани может способствовать активному нейро- и ангиогенезу.

1.3.4. Влияние на глиальную реакцию

В условиях ишемии в веществе головного мозга происходят патофизиологические процессы, направленные на поддержание жизнеспособности ткани. Происходящее морфофункциональное ремоделирование нервной ткани заключается в каскаде реакций, которые в том числе направлены на предотвращение нейродегенерации. Одним из показателей выраженности ишемического повреждения головного мозга является активность глиальной реакции астроцитов – активации синтеза

глиофибрилярного кислого белка (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP). Согласно данным некоторых исследований, повышение концентрации GFAP в сыворотке крови является маркером повреждения центральной нервной системы, как при ишемическом [76,77], так и при геморрагическом инсульте [78], а по данным некоторых работ, является предиктором неблагоприятного исхода заболевания [176,173].

Основная функция нейроглии заключается в защите и поддержке функции нейронов. В условиях патологии защитная реакция нейроглии состоит в восстановлении гомеостаза нервной ткани, но при выраженном повреждении происходит чрезмерная реакция астроцитов, которая может способствовать усугублению патологического процесса [209], а также может ингибировать механизмы адаптивной нейронной пластичности, лежащие в основе восстановления функции нервной ткани [143]. В экспериментальных работах на моделях инфаркта головного мозга у лабораторных животных было показано, что терапия мезенхимальными стволовыми клетками модулирует реактивный астроглиоз: наблюдается снижение активности глиальной реакции в пораженной полушарии головного мозга, о чем свидетельствует уменьшение выраженности экспрессии гена, кодирующего синтез GFAP по данным иммуногистохимического исследования [190,86].

1.3.5 Иммуномодулирующее действие МСК

Некоторые авторы предполагают другие механизмы действия трансплантированных клеток на процессы, происходящие в зоне повреждения нервной ткани. Так по данным Qiang Fu и соавт. [81] на модели травмы спинного мозга клеточная терапия МСК периферической крови приводила к уменьшению выраженности неврологического дефицита у крыс. Однако, несмотря на значительное повышение уровня экспрессии генов, отвечающих за синтез белков нейрогенеза в поврежденной нервной ткани (MBP, NF-200 и MAP-2) через 2 часа после трансплантации МСК периферической крови, не было выявлено большого количества дифференцированных донорских МСК. В то же время наблюдалось

выраженное иммуномодулирующее действие в виде подавления экспрессии Th17-релевантных генов и стимуляции экспрессии Treg-релевантных генов, что привело к подавлению воспалительных и стимуляции противовоспалительных процессов, происходящих в зоне повреждения нервной ткани.

Имуномодулирующее действие МСК в большей степени было изучено на животных моделях аутоиммунных заболеваний, а также на примере клинических многоцентровых исследований влияния клеточной терапии при онкогематологических, аутоиммунных и других заболеваниях у людей [9,122]. Так было показано, что МСК обладают низкой иммуногенностью [26], так как характеризуются низким уровнем экспрессии главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) I класса и отсутствием экспрессии МНС II класса, что объясняет отсутствие реакции «трансплантат-хозяин» в организме реципиента [228]. По некоторым данным МСК не способны вызывать T-клеточный ответ в связи с невозможностью активации цитотоксических лимфоцитов, и при этом действие МСК приводит к снижению уровня активированных T-клеток. Кроме того, трансплантированные клетки участвуют в селекции T-клеток реципиента, опосредуя развитие иммунологической толерантности клеток хозяина к трансплантату. По данным авторов, исследовавших комбинированную клеточную терапию у пациентов с онкогематологическими заболеваниями, совместное введение МСК и ГСК вело к значительному уменьшению количества случаев отторжения трансплантата по сравнению с группой клеточной терапии только ГСК [124,229].

При исследовании влияния МСК на активность T-клеток, было выявлено, что при их межмембранном взаимодействии снижается экспрессия белка, регулирующего смену фаз клеточного цикла – циклина D2; усиливается экспрессия ингибитора клеточного цикла-белка p27 Kip1; а также активируется экспрессия T-клетками белка запрограммированной

клеточной смерти PD1, что в совокупности приводит к снижению уровня пролиферации и активизации Т-клеток. Помимо непосредственного межклеточного воздействия на Т-клетки, МСК секретируют ряд медиаторов, супрессирующих Т-клетки [208]: TGF-бета (трансформирующий фактор роста бета), HGF (фактор роста гепатоцитов), интерлейкин-10, оксид азота, галектин-1 и галектин-3а, также простагландин E2 (PGE2), TNF- α , интерферон гамма, которые также снижают уровень пролиферации Т-клеток и натуральных киллеров (NK-клеток). Присутствие МСК уменьшает уровень экспрессии рецепторов к интерлейкину-2, который определяет активацию Т-клеток. Также при взаимодействии с активированными Т-лимфоцитами МСК выделяют индуктор апоптоза ИДО(идоламин-2,3-диоксигеназа), который способствует погашению реакции активации Т-клеток на трансплантат. Также согласно данным некоторых авторов [137], МСК могут влиять на процесс дифференцировки Т-клеток в направлении CD4+CD25+(Т-регуляторов), в результате чего происходит подавление пролиферации цитотоксических Т-лимфоцитов. Данный механизм действия может противодействовать возникновению реакции трансплантат против хозяина [175,137,99]. Взаимодействие МСК с антиген-презентирующими клетками приводит к смене набора секретируемых интерлейкинов, в связи с чем происходит подавление уровня активности провоспалительной системы (снижается уровень экспрессии ИЛ-12 и TNF α) и стимуляция противовоспалительной реакции организма хозяина (повышается экспрессия цитокина ИЛ-10). Наряду с влиянием на Т-клетки, NK-клетки и антиген-презентирующие клетки, в присутствии МСК происходит также подавление пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов, а также ограничение процесса адгезии В-клеток к эндотелию венул лимфатических узлов. Таким образом, трансплантированные МСК оказывают общее многофакторное супрессирующее действие на иммунный ответ реципиента.

1.4 Трансплантация МСК на моделях экспериментального инсульта

Во множестве публикаций неоднократно была показана терапевтическая эффективность трансплантации МСК лабораторным животным с разными моделями ишемического инсульта. В более ранних работах демонстрировалось действие клеточной терапии на основе изменений показателей поведенческих тестов [54]. В более поздних исследованиях проводились попытки прояснить механизмы действия МСК на очаг ишемии путем выявления молекулярных изменений в тканях организма: прежде всего определения повышенной экспрессии биомаркеров нейро- и ангиогенеза, а также механизмов иммуномодулирующего и паракринного действия. Несмотря на достижения ученых в области изучения особенностей взаимодействия трансплантата с тканями реципиента, нет ясности относительно механизмов непосредственного влияния МСК на клинические проявления и изменения в очаге ишемии. В большинстве работ терапевтическая эффективность трансплантации МСК объясняется усилением нейрогенеза, зафиксированного данными иммуногистохимии, при этом уменьшение объема очага ишемии головного мозга наблюдается не во всех исследованиях [86]. Также представляет интерес для изучения вопрос наиболее безопасного и эффективного пути трансплантации МСК. Наименее популярные пути введения: интраназальный и интратекальный (или эндолюмбальный), недостаточно изучены на модели ишемического инсульта [216]. Во многих публикациях описывают преимущества интрацеребрального пути введения [53,92], основываясь на возможности более адресного и локального воздействия на очаг инфаркта мозга трансплантированных клеток в большей концентрации, чем при системном введении. Однако, ограничения, связанные с травматичностью краниотомии, делают этот пусть наименее пригодным в клинической практике. Наиболее распространен системный путь инфузии стволовых клеток: внутриартериальный и внутривенный. Во многих исследованиях оба метода продемонстрировали терапевтическую эффективность в условиях острой фокальной ишемии

головного мозга у лабораторных животных. Внутриартериальное введение позволяет напрямую доставить клетки в церебральные артерии близко к зоне поражения головного мозга, однако, сопутствующая опасность эмболических осложнений требует тщательного подбора и соблюдения оптимальных параметров трансплантации (диаметр клеток, доза, скорость введения) [91]. Несмотря на доказанную терапевтическую эффективность обоих путей системной трансплантации, по данным некоторых исследователей [109] внутривенное введение предпочтительнее в связи с отсутствием риска эмболии и травматизации сосудов и ткани головного мозга при введении [27]. Недостатками внутривенной трансплантации считается низкая биодоступность введенных клеток: при введении в периферическую вену клетки преимущественно фильтруются паренхиматозными органами [75,73,105] и попадают в головной мозг в единичном количестве, а по данным некоторых исследований не обнаруживаются в нем вовсе [197]. Однако, в то же время, при внутриартериальном введении оказавшиеся в пораженном полушарии в большом количестве трансплантированные клетки задерживаются там только в течение первых часов после трансплантации. А через 24ч после при внутриартериальной инфузии МСК в области очага инфаркта сохраняется не больше 21% от введенного количества клеток [131], и накопление их происходит преимущественно в селезенке [112]. Результаты подобных наблюдений, а также неоднократно доказанная эффективность системного введения МСК, позволяют предположить наличие альтернативных механизмов действия трансплантированных клеток, не зависящих от непосредственного нахождения клеток в зоне повреждения головного мозга. Учитывая относительную безопасность венозного доступа и доказанную терапевтическую эффективность на экспериментальной модели ишемии головного мозга, такой путь трансплантации является наиболее предпочтительным.

По данным многих научных исследований, внутривенное введение МСК приводило к восстановлению неврологических функций у

лабораторных животных с моделью острой фокальной ишемии головного мозга [128,184]. По данным разных авторов, клиническое восстановление животных с моделью экспериментального инфаркта головного мозга наблюдалось при внутривенной трансплантации широкого диапазона дозировок клеток: от 1×10^6 до 1×10^7 клеток [98,191,133,231,154,165]. Однако, имеется ограниченное количество публикаций, посвященных подбору оптимальной дозы клеток и сравнению оказанного терапевтического эффекта при их применении. Так, по данным Wu и соавт., внутривенная трансплантация крысам МСК как в дозе 1×10^6 , так и дозе 3×10^6 клеток через 2 часа после моделирования ишемии головного мозга приводила к значимому регрессу неврологического дефицита [221]. При этом не было обнаружено значимой разницы в восстановлении неврологического статуса животных при сравнении групп с различными дозировками.

1.5 Трансплантация МСК в клинических испытаниях

Безопасность и клиническая эффективность внутривенной трансплантации МСК была также показана во многих исследованиях на людях, перенесших инсульт. При этом клинический эффект наблюдался при инфузии различных дозировок МСК. Так в работе Nonpou [97] описаны 12 случаев внутривенной инфузии МСК у пациентов с инсультом в различных дозировках от $0,6$ до $1,6 \times 10^8$ клеток. Эффективность применения 1×10^8 МСК при инсульте также подтверждает работа Bang [35]. В исследовании Lee пациентам вводили 5×10^7 клеток, что также приводило к регрессу неврологического дефицита. При этом при повторном исследовании через 5 лет после клеточной трансплантации не было выявлено побочных действий трансплантата, что подтвердило безопасность клеточной терапии [125]. Неопределенность в вопросе подбора оптимальной дозировки клеточного препарата ограничивает возможность перехода на клинический этап изучения эффективности клеточной терапии ишемического инсульта. В связи с этим, исследование эффективности различных доз МСК при внутривенной трансплантации на модели экспериментального инфаркта головного мозга у

лабораторных животных остается актуальной задачей для фундаментальной неврологии и патологической физиологии.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки

По данным научных публикаций, эффективность применения плюрипотентных стволовых клеток (эмбриональных и индуцированных плюрипотентных СК) была неоднократно продемонстрирована в экспериментах на моделях различных неврологических заболеваний у лабораторных животных [152]. Однако, применение фетальных стволовых клеток не перспективно, поскольку сталкивается с этическими ограничениями. В то же время существуют стволовые клетки, также обладающие свойством плюрипотентностью и сопутствующими достоинствами, но имеющие искусственное происхождение, а значит, не ограниченные этическими соображениями в исследованиях и перспективах применения.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) — это тип плюрипотентных клеток, которые получают путем репрограммирования дифференцированных клеток животных и человека (фибробластов, меланоцитов, кератиноцитов, клеток пульпы зуба, жировой ткани, пуповинной крови и других).

Плюрипотентные стволовые клетки обладают способностью к дифференцировке во все известные виды соматических клеток, что является неоспоримым преимуществом для использования их в регенеративной медицине. Эмбриональные СК плюрипотентны, однако, их получение из эмбриона человека поднимает ряд этических вопросов, которые ограничивают их практическое применение. В 1962 году в исследованиях Джона Гордона по клонированию многоклеточного организма с помощью переноса ядра соматической клетки в яйцеклетку была впервые продемонстрирована возможность клеточного репрограммирования [147]. В 2006 году учеными Такахаши и Яманака [199] впервые были получены ИПСК путем обработки дифференцированных клеток кожи коктейлем

репрограммирующих факторов: Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc , получивших название «факторов Яманака». Ученые Гордон и Яманака были удостоены Нобелевской премии за открытие возможности репрограммирования зрелых соматических клеток до состояния плюрипотентности [95]. С открытия возможности индукции плюрипотентности начался новый этап развития клеточной биологии и генетики, открывающий новые перспективы для клеточной терапии.

2.1 Пути получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Получение ИПСК обычно состоит из нескольких этапов:

1. забор донорского материала и получение первичной культуры;
2. репрограммирование;
3. характеристика и наращивание ИПСК.

На первом этапе из донорского материала получают чистую культуру клеток. Затем при помощи различных транскрипционных факторов индуцируют плюрипотентность. Репрограммирование соматической клетки заключается в эктопической экспрессии в ней набора основных транскрипционных факторов. В основном используется коктейль «факторов Яманака»: Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc, но в некоторых случаях могут применяться и другие факторы (Nanog, Lin28 и SV40LT и др.) [226]. Трансформированные клетки культивируют на фидерных слоях (фибробласты/кератиноциты) или используют искусственный матрикс в соответствующих условиях среды. После завершения репрограммирования получают колонии ИПСК и характеризуют их, используя морфологические и физико-химические методы. Способы доставки факторов репрограммирования можно разделить на вирус-опосредованную трансдукцию и невирусную трансфекцию. Также методы могут быть разделены на интегративные (с использованием ретро-, лентивирусы, транспозоны) и неинтегративные (использующие аденовирус, вирус Сендай, мРНК, микроРНК, эписомные векторы, рекомбинантные белки) [204].

2.2 Плурипотентность ИПСК

Несмотря на то, что технология создания индуцированных плурипотентных стволовых клеток появилась не так давно, в научном сообществе имеется достаточное количество данных о свойствах данного типа клеток, преимуществах и недостатках их трансплантации животным моделям. Так, было показано, что после трансплантации в головной и спинной мозг ИПСК способны дифференцироваться в нейрональном и глиальном направлениях. Однако, в виду своей плурипотентности такая трансплантация может приводить к образованию тератом [111,136]. Поэтому, как и в случае применения эмбриональных плурипотентных стволовых клеток, для исследования терапевтической эффективности на моделях различных заболеваний у животных от применения недифференцированных ИПСК было решено отказаться. В лабораторных условиях *in vitro* из ИПСК возможно получить практически все типы соматических клеток, используя рекомбинантные белки и малые молекулы для изменения активности сигнальных путей (BMP, Notch, Wnt, TGF β и др.) [83]. Для исследования эффективности клеточной терапии неврологических заболеваний наилучшим выбором являются предварительно дифференцированные в нейрональном направлении ИПСК. В этом случае изначально из ИПСК получают нейральные стволовые клетки (ИПСК-НСК). Чаще всего для такой дифференцировки используют протоколы, включающие образование эмбрионидных телец с обработкой ретиноевой кислотой, или ингибируя сигнальные пути с помощью рекомбинантного белка Noggin (BMP) и малых молекул LDN 193189 (BMP) и SB-431542(TGF-beta) [107]. Также путем дифференцировки возможно получение из ИПСК зрелых типов клеток, включая специфические подтипы: мотонейроны [41], гранулярные мозжечковые нейроны [155], дофаминергические, серотонинергические и другие типы корковых нейронов, а также астроциты и олигодендроциты [144].

2.3 Трансплантация ИПСК на моделях экспериментального инсульта

В большинстве исследований на животных моделях инфаркта головного мозга трансплантировали предифференцированные в нейрональном и глиальном направлении ИПСК [49,102]. Наиболее часто применяется внутримозговое введение клеток в паренхиму мозга [206,226,71]. Однако, несмотря на более адресную доставку максимального количества клеток непосредственно в очаг ишемии, этот путь трансплантации ограничивает инвазивность, что в перспективе делает его применение в клинической практике маловероятным. В то же время системные способы трансплантации являются менее инвазивными, но при этом не менее эффективными. Несмотря на то, при внутриартериальном [58] и внутривенном [56,196,215] введении нейрональных стволовых/прогениторных клеток, полученных из фетальной и эмбриональной ткани был продемонстрирован терапевтический эффект, в случае НСК-ИПСК нам не удалось найти информацию о подобных исследованиях.

При внутримозговой трансплантации практически во всех исследованиях наблюдалось улучшение состояния животных- улучшались показатели неврологического статуса. При этом восстановление неврологических функций наблюдалось при трансплантации как в остром, так и в отсроченном периодах [116,39,32].

В некоторых исследованиях было показано, что после внутримозгового введения ИПСК-НСК грызунам с экспериментальным инфарктом головного мозга трансплантированные клетки сохраняли жизнеспособность от 2 до 10 недель и начинали экспрессировать маркеры незрелых (nestin, doublecortin, β III tubulin) или даже зрелых нейронов (NeuN, MAP2, HuD и другие) [164,116]. При этом клетки, прошедшие *in vitro* предифференцировку в предшественники кортикальных нейронов, после трансплантации активнее дифференцировались до зрелого состояния и образовывали нейронные связи с клетками реципиента [206]. Помимо этого, наблюдалась интеграция ИПСК-

ИПСК в нейронные сети реципиента: образование новых синапсов, а также межнейронных связей, в том числе между таламусом и бледным шаром [164] или даже с корой противоположного полушария [164,206]. Процесс образования зрелых нейронов занимал не менее 2-х месяцев, в то время как положительный терапевтический эффект отмечался намного раньше этого срока. В связи с этим можно предположить, что основную роль в функциональном восстановлении, как и в случае с МСК, играет не заместительный, а паракринный эффект ИПСК-ИПК. Рассматривались различные механизмы паракринного действия клеток: стимуляция ангиогенеза [50], активация нейропластичности за счет усиления эндогенного нейрогенеза [49], иммуномодулирующее противовоспалительное действие [71]. Вероятно, трансплантированные клетки также могут выделять трофические факторы и молекулы, которые повышают выживаемость нейронов и глии реципиента, оказывая нейропротективный эффект [116].

2.4 Перспективы клеточной терапии ИПСК в клинической практике

Применение ИПСК в клинической практике может иметь определенные ограничения ввиду их иммунокомпетентности: экспрессии главного комплекса иммуногистосовместимости I и II класса, что потребует профилактических мер по коррекции возможной реакции иммунной системы реципиента в случае аллотрансплантации. Для предотвращения развития подобной реакции потребуются применение иммуносупрессии или применение аутологичных клеточных препаратов, заготовленных из собственных клеток реципиента. По данным Jensen и соавт., для получения аутологичной хорошо охарактеризованной культуры ИПСК, прошедшей предварительную дифференцировку в нейрональном направлении, в достаточном для трансплантации количестве необходимо не менее 7 недель [102]. Такой срок приготовления персонализированного клеточного препарата не пригоден для лечения острой неврологической патологии. Кроме того, на данный момент нет достаточного количества данных об особенностях характеристик ИПСК, полученных от пациентов различного

возраста, и состояния здоровья. Необходимость дальнейших исследований в данной области отодвигает идею технологии создания клеточного препарата из аутологичных ИПСК на долгосрочную перспективу. Более целесообразным представляется создание банка ИПСК для аллогенной трансплантации, которая будет возможна при совместимости по человеческим лейкоцитарным антигенам (HLA-типировании). Вероятно также потребуются дополнительная иммуносупрессия [150]. Работа над созданием подобных клеточных банков уже начата в Японии [64]. По планам разработчиков, к окончанию их организации ожидается получение порядка 60 линий ИПСК, подходящих по HLA-гаплотипам для всего населения Японии. Помимо банка стволовых клеток перспективным направлением является создание “универсальных” ИПСК, позволяющих избежать иммунного ответа, опосредованного Т-клетками и натуральными киллерами [40]. Данный подход предполагает инактивацию генов главного комплекса гистосовместимости класса I и II и гиперэкспрессию CD47 [214]. По результатам исследований, такой способ предварительной обработки трансплантированных клеток позволит избежать иммунной реакции против введенных клеток даже при полном не соответствии организма реципиента и трансплантата по МНС и не потребует использования иммуносупрессии [67]. Помимо вынужденной время- затратности и дороговизны технологий по производству ИПСК существует ряд нерешенных вопросов безопасности трансплантации данного типа клеток, которые ограничивают переход к клиническим испытаниям. Прежде всего это связано с механизмами получения ИПСК с помощью интегративных методов и использованием потенциально онкогенного транскрипционного фактора c-Myc. Также при трансплантации полученных из ИПСК клеток существует риск неполной элиминации недифференцированных ИПСК, что гипотетически может привести к образованию тератокарцином. В связи с этим ведется разработка способов повышения безопасности трансплантации. В частности, есть данные о методике, основанной на технологии внедрения

“самоубийственных генов”. Так модификация ИПСК для экспрессии гена HSV-ТК (Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase), повышающей специфическую чувствительность к ганцикловиру, позволяет эффективно элиминировать недифференцированные ИПСК с помощью добавления небольших доз данного препарата [198].

На настоящий момент не проведено полноценных клинических исследований с использованием технологии ИПСК. Однако, в Японии описаны единичные клинические наблюдения, при которых трансплантировали полученные из ИПСК клетки сетчатки при макулярной дегенерации [65] и дофаминергические нейроны при болезни Паркинсона [66]. Был зафиксирован положительный терапевтический эффект и предварительно подтверждена безопасность клеточной терапии ИПСК.

Учитывая новизну технологии получения, недостаточное количество информации о клеточных свойствах, существующие нерешенные вопросы безопасности применения данного типа клеток, актуальным является дальнейшее изучение особенностей влияния на организм реципиента трансплантации ИПСК, подбор доз и выявление побочных реакций трансплантации на экспериментальных моделях заболеваний, в том числе нервной системы, у лабораторных животных.

Таким образом, отсутствие онкогенной и иммуногенной активности мезенхимальных стволовых клеток, потенциальная способность к трансдифференцировке в различные ткани, в том числе в нейрональную, значительное разнообразие секретируемых трофических факторов делают трансплантацию МСК перспективным направлением терапии различных заболеваний нервной системы, в том числе ишемического инсульта. Однако, несмотря на длительное изучение научным сообществом свойств данного типа стволовых клеток и особенностей взаимодействия трансплантированных МСК с тканями реципиента, по мере появления новых методов исследования в области клеточных технологий, возникают новые задачи для изучения.

Так, например, нет единого мнения о механизмах действия МСК на процессы, происходящие в веществе головного мозга в условиях ишемии. Остается актуальным направлением изучение особенностей миграции и распределения введенных системно МСК на животных моделях экспериментального инфаркта головного мозга. Представляет интерес сравнение терапевтической эффективности трансплантации различных доз МСК при экспериментальном инсульте и сопоставление оказываемого эффекта на функциональное восстановление животных, перенесших инсульт, по сравнению с применением другого типа клеток, полученного при помощи относительно нового метода (ИПСК-НПК).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

Эксперимент проводился на половозрелых самцах крыс линии Wistar весом 250-300 грамм (ООО «Аль Конди») n=115. В исследовании использовались самцы крыс, чтобы нивелировать нейропротективное действие эстрогенов на течение ишемии головного мозга [142]. Все манипуляции с лабораторными животными были одобрены этическим комитетом (протокол №114 от 30.01.2012г.) и университетской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных (протоколы № 13/2020 от 8 октября 2020г, №24/2021 от 10.12.2021 года) ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, и выполнялись в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента от 22.09.2010г. Все животные по прибытии в виварий проходили карантин в течение 14 дней, во время которого содержались в клетках по 5 голов при соблюдении цикла освещения день-ночь (12/12 часов), при постоянно поддерживаемой температуре воздуха в помещении 24° С, при неограниченном доступе к воде и стандартному брикетированному корму. После моделирования инфаркта головного мозга животные содержались отдельно в течение 7 суток, по 1 крысе в клетке во избежание травматизации и для лучшего восстановления после наркоза и операции. Во время всех оперативных вмешательств, а также магнитно-резонансного исследования головного мозга, крысы находились под действием общей ингаляционной анестезии изофлураном (Aerран, Baxter HealthCare Corporation, United States), которая проводилась с использованием аппарата для ингаляционной анестезии для лабораторных животных (E-Z-7000 Classic System, E-Z-Anesthesia® Systems, United States). Во время индукции анестезии применялась смесь 3,0-3,5% изофлурана с 97-96,5% атмосферного воздуха, а поддерживающая концентрация ингаляционного анестетика составляла 2-2,5% в газо-воздушной смеси. При оценке с помощью МРТ распределения трансплантированных меченных микрочастицами суперпарамагнитного оксида железа МСК в головном мозге

крыс применялись сходные концентрации изофлурана в смеси с чистым кислородом (кислородный концентратор Jiangsu Yuyue Medical Equipment and Supply Co. Ltd. 7F-10L, 1011101). Температура тела животных в состоянии общего наркоза и до полного выхода из анестезии поддерживалась в пределах 37-38°C. Для минимизации болевых ощущений области хирургического доступа дополнительно анестезировались раствором бупивакаина, а также при выявлении признаков болевого синдрома производилось дополнительное обезболивание животных раствором мелоксикама. Во время операции для предотвращения пересыхания слизистых оболочек производилось закапывание капель искусственной слезы в конъюнктивальные мешки глаз крыс. Во избежание дегидратации в острейшем периоде инсульта проводилось дополнительное введение 1мл физиологического раствора внутривентриально. По окончании срока исследования, а также для проведения гистологического исследования в динамике, крысы выводились из исследования путем ингаляционной анестезии летальной дозой изофлурана и затем дополнительной внутривентриальной инъекцией летальной дозы тилетамина («золетила»).

Клеточная культура

Мезенхимальные стволовые клетки плаценты человека

Клеточная культура была предоставлена лабораторией клеточной биологии ФГБНУ Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича под руководством д.б.н., член-корреспондента РАН, профессора Ярыгина К. Н.

В исследовании для трансплантации лабораторным животным использовались мезенхимальные стволовые клетки (МСК), выделенные из плаценты здоровой женщины (участок амниона и хориона) на сроке гестации 38-40 нед. Биологический материал получали после подписания информированного согласия на забор клеточного материала роженицы. Фрагменты плаценты промывали раствором Хенкса (PanEko) и после мягкого механического пипетирования инкубировали с 0.1% раствором коллагеназы I

(Gibco) в течение 30 мин при 37°C. Полученную суспензию центрифугировали (300g, 10 мин), супернатант отбирали, осадок ресуспензировали в ростовой среде. Клетки культивировали в течение 3 сут в ростовой среде DMEM/F-12 с добавлением 2 mM глутамина, 100 Ед/мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина (Gibco) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FSB, HyClone) при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в культуральных флаконах с площадью ростовой поверхности 75 см²; неадгезивные клетки удаляли путем замены среды. При достижении 80% плотности монослоя, клетки переводили в суспензию с использованием раствора 0.25% трипсина с версеном (1:1) и пересевали в культуральные флаконы площадью 75 см² в соотношении 1:3. При помощи проточной цитофлуориметрии подтверждали экспрессию типичных для МСК CD-маркеров: CD34-, CD45-, HLA-DR-, CD105+, CD29+, CD73+, CD90+. Для трансплантации использовались клеточные культуры, не старше 4-5 пассажа. Для отделения клеток от пластика использовали 0.25% трипсина с версеном (1:1). После подсчета клеток полученную суспензию переносили в изопропиленовую пробирку объемом 50 мл и дважды промывали физиологическим раствором. Для трансплантации готовили клеточную суспензию в концентрациях 5x10⁵ и 2x10⁶ МСК в 1 мл физиологического раствора. Процент жизнеспособных клеток в препарате контролировали с помощью окрашивания трипановым синим. Для введения животным использовали образцы с долей жизнеспособных клеток не менее 80%. После подсчета клеток полученную суспензию переносили в изопропиленовую пробирку объемом 50 мл и дважды промывали физиологическим раствором. Процент жизнеспособных клеток в препарате контролировали с помощью окрашивания трипановым синим. Для введения животным использовали образцы с долей жизнеспособных клеток не менее 80%. непосредственно перед экспериментом охарактеризованные клетки культивировали в питательной среде DMEM-F12 с добавлением с 2 mM L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина и 10% фетальной телячьей

сыворотки (все реагенты от Gibco) и выдерживали в условиях инкубатора (37 °C, 5% CO₂) до достижения необходимого количества. Для трансплантации готовили клеточную суспензию в концентрациях 5×10^5 и 2×10^6 МСК в 1 мл физиологического раствора.

Для проведения гистологического исследования перед трансплантацией клетки нагружали двойной меткой, состоящей из микрочастиц суперпарамагнитного оксида железа (SPIO) (MC03F Bangs Laboratories, средний диаметр $0,50 \pm 0,99$ мкм) и флуоресцентного красителя Dragon Green ($\lambda_{ex} = 480$ нм, $\lambda_{em} = 520$ нм), а также красного липофильного мембранного флуоресцентного красителя PKH26 (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) как описано ранее [153]. При двойной метке жизнеспособность клеток составляла более 90%, что подтверждалось тестом с азокрасителем на автоматическом счетчике клеток (Invitrogen Countess I) непосредственно перед введением.

Нейрональные прогениторные клетки, полученные из индуцированных плюрипотентных клеток

Клеточная культура была предоставлена лабораторией генетики стволовых клеток ФГБНУ «Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова» под руководством д.б.н., профессора Гольдштейна Д.В.

Нейрональные прогениторные клетки (ИПСК-НПК) были получены путем направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека согласно ранее разработанному протоколу [157] (ИПСК). Культуру ИПСК выращивали в чашках Петри, обработанных раствором матригеля (Matrigel BD; BD Biosciences). ИПСК снимали раствором версена (PanEko) и высевали плотностью 40 тыс. клеток/см² в среде Essential 8 Medium (Gibco) в присутствии 5 мкМ ингибитора ROCK (Stemcell Technologies). Дифференцировка ИПСК в нейральном направлении происходила в 2 этапа. На первом этапе ИПСК с плотностью монослоя 80-90% культивировали в течение 14 сут в среде, содержащей DMEM/F-12

(PanEko), 1% добавки N2 (Gibco), 1 мМ глутамин (PanEko), 50 Ед/мл пенициллина-стрептомицина (PanEko), 10 мкМ SB431542 (Stemcell Technologies), 2 мкМ дорсоморфина (Stemcell Technologies); среду меняли каждые сутки до получения розеткоподобных структур. На втором этапе полученную культуру плотностью 250-400 тыс. клеток/см² высевали на чашки Петри и культивировали в течение 17 сут в среде следующего состава: DMEM/F-12, 2% добавки B27 (Gibco), 1 мМ глутамин (PanEko), 50 Ед/мл пенициллина-стрептомицина (PanEko), 10 нг/мл FGF-2 (PeproTech), 1 мкМ пурморфина (Stemcell Technologies); среду меняли каждые 2 сут. Дифференцировку клеток подтверждали путем иммуноцитохимического анализа с использованием антител к нейральным маркерам. Клетки фиксировали 4%-ым раствором параформальдегида в течение 5 мин при 4°C, промывали и инкубировали в FSB с 0.25%-ным раствором Тритона X-100 и 1% бычьего сывороточного альбумина в течение 30 мин, после чего в течение 60 минут обрабатывали первичными антителами к белкам Nestin, Sox2, Pax6 и tubulin-III β (Abcam). Затем клетки повторно промывали раствором FSB и инкубировали со вторичными антивидовыми антителами, мечеными флюорохромами (Invitrogen), в темноте в течение 60 мин. Ядра дополнительно окрашивали раствором DAPI (0.1 мкг/мл) в FSB. Для анализа использовали люминесцентный инвертированный микроскоп "AxioObserver Z1 (Carl Zeiss) с камерой "AxioCam MRc 5 (D)". Полученные культуры ИПСК-НПК специфично окрашивались соответствующими антителами. Клетки снимали с помощью раствора Версена, центрифугировали 1800 об/мин в течение 5 минут, супернатант отбирали, а осадок промывали раствором Хенкса (Панэко, РФ). Для введения использовали суспензии клеток (5x10⁵ и 2x10⁶ ИПСК-НПК в 1 мл физиологического раствора).

С целью исследования гистологическими методами распределения ИПСК-НПК в головном мозге при внутривенной трансплантации производилось окрашивание клеточного материала флуоресцентным липофильным мембранным красителем РКН 26 по следующей методике:

после центрифугирования со скоростью 3000 оборотов в минуту в течение 2х минут клеточной суспензии с 9мл смеси раствора Хэнкса и антибиотика (цефазолин или пенициллин-стрептомицин) в дозе 50 мкг/мл производили удаление супернатанта. Затем к осадку добавляли 250 мкл растворителя С и ресуспендировали клетки. Затем перед окрашиванием производили заготовку раствора РКН26, для чего 1 мкл стока (раствор красного цвета) разводили в 250 мкл растворителя С. Затем приготовленный краситель РКН26 добавляли к 250 мкл клеточной суспензии и перемешивали. Клетки инкубировали с красителем в течение 5 минут. После остановки реакции при помощи добавления 50мкл сыворотки клетки инкубировали еще 1 минуту. Затем в пробирку добавляли 2 мл раствора Хэнкса с антибиотиком и центрифугировали. После отделения супернатанта, клеточный осадок повторно промывали раствором Хэнкса с антибиотиком и центрифугировали. Осадок клеток разводили в 5 мкл физиологического раствора.

Протокол экспериментального исследования эффективности клеточной терапии на модели инфаркта головного мозга у крыс

В работе проводилось изучение терапевтической эффективности клеточной терапии различными типами стволовых/прогениторных клеток при острой фокальной ишемии головного мозга у крыс. Всем животным (n=115) проводилось моделирование экспериментального инфаркта головного мозга и спустя 24 часа – внутривенная клеточная трансплантация. Оценка состояния животных проводилась непосредственно перед воспроизведением экспериментального инсульта для исключения из исследования крыс с врожденными аномалиями развития, затем перед клеточной инфузией, и далее в динамике - на 7-е, 14-е, 30-е и 60-е сутки после трансплантации. Состояние животных оценивали с помощью измерения массы тела животных, показателей неврологического статуса, а также измерения объема очага ишемии головного мозга по данным МР-

исследования. По истечении срока наблюдения животные выводились из эксперимента. Протокол дизайна исследования представлен в Таб.1

В ходе исследования терапевтической эффективности трансплантации стволовых/прогениторных клеток у лабораторных крыс с моделью экспериментального инфаркта головного мозга было выделено 3 этапа:

1. Оценка и сравнительный анализ терапевтической эффективности внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга. После воспроизведения экспериментального инфаркта головного мозга все животные случайным образом разделялись на следующие исследовательские группы: 1) группа с введением 5×10^5 МСК (n=25); 2) группа с введением 2×10^6 МСК (n=30); 3) группа контроля с введением 1мл физиологического раствора (n=21). Срок наблюдения составлял 60 суток.

В каждой группе с клеточной терапией МСК части животных проводилась внутривенная трансплантация меченных микрочастицами оксида железа и флуоресцентными метками МСК для изучения распределения в головном мозге клеток по данным МР-исследования и последующей верификации данных гистологическим методом. Количество животных в данных группах составляло: 7 крыс – для группы с введением 5×10^5 меченых МСК, и 14 крыс - для группы с введением 2×10^6 клеток. Вывод из эксперимента животных для оценки распределения меченых МСК в головном мозге производился спустя 2 часа, 24 часа и 7 суток после трансплантации.

С целью оценки влияния внутривенной трансплантации МСК на активность глиальной реакции инфаркта полушария головного мозга на 7-е сутки после трансплантации 5 крыс из группы с клеточной терапией МСК в дозе 2×10^6 клеток и 5 крыс из группы контроля были выведены из эксперимента для проведения иммуногистохимического исследования.

2. Оценка и сравнительный анализ терапевтической эффективности внутривенной трансплантации ИПСК-НПК в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга. После моделирования ишемического инсульта все животные случайным образом разделялись на следующие исследовательские группы: 1) группа с введением 5×10^5 ИПСК-НПК ($n=21$); 2) группа с введением 2×10^6 ИПСК-НПК ($n=18$); 3) группа контроля с введением 1мл физиологического раствора ($n=21$). Срок наблюдения составлял 60 суток. Из общего количества животных в каждой исследовательской группе части животных трансплантировали меченные флуоресцентным красителем клетки для оценки распределения в головном мозге ИПСК-НПК через 2 часа, 24 часа и 7 суток после трансплантации по данным гистологического исследования. С этой целью были сформированы следующие группы: (1) крысы с введением 5×10^5 меченых ИПСК-НПК ($n=6$); (2) крысы с введением 2×10^6 меченых ИПСК-НПК ($n=9$).
3. Сравнительный анализ терапевтической эффективности максимальных дозировок МСК и ИПСК при внутривенной трансплантации крысам с острой фокальной ишемией головного мозга. Было проведено сравнение терапевтической эффективности применения клеточной терапии в следующих исследуемых групп: 1) группа с введением 2×10^6 МСК ($n=30$); 2) группа с введением 2×10^6 ИПСК-НПК ($n=18$). Срок наблюдения составлял 60 суток.

Таблица 1. Протокол исследования терапевтической эффективности клеточной терапии на модели инфаркта головного мозга у крыс

Время	14 суток	До СМАО	СМАО	Через 24ч	Введение клеток	7 суток	14 суток	30 суток	60 суток
Процедура/ Параметры оценки	Карантин	Оценка	Операция	Оценка	Операция	Оценка	Оценка	Оценка	Выве дение из экспе римен та
Масса, г	-	+	-	+	-	+	+	+	
mNSS, баллы	-	+	-	+	-	+	+	+	
MPT	-	+	-	+	-	+	+	+	

Моделирование острой фокальной ишемии головного мозга

Воспроизведение модели острой фокальной ишемии головного мозга производили путем транзиторной эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии монофиламентом по методу Koizumi в модификации Longa [134]. Все хирургические вмешательства проводились под общим ингаляционным наркозом изофлураном в смеси с воздухом (в концентрации 3% для индукции и 1,5-2,5% для поддержания анестезии). В области операционной раны производилась местная инфилтративная анестезия 1-2% раствором бупивакаина. С целью премедикации перед операцией проводили внутрибрюшинную инъекцию 0,01 мл атропина сульфата, чтобы нивелировать рефлексы с блуждающего нерва. Далее производилось сбривание шерсти и дезинфекция кожных покровов раствором 70% этанола, после чего кожу рассекали на протяжении 10-12мм по передней срединной линии в области передней поверхности шеи. Мышцы шеи и другие мягкие ткани тупым способом отодвигались в стороны до визуализации бифуркации правой общей сонной артерии и фиксировались ретрактором. Тупым способом, соблюдая предосторожности для минимизации травматизации блуждающего нерва и сосудистых стенок выделялись следующие сосуды: ствол общей сонной артерии (ОСА), область бифуркации ОСА,

проксимальные отделы внутренней (ВСА) и наружной сонных артерий (НСА). С целью минимизации вагальных реакций, развития острого респираторного дистресс-синдрома, а также для дополнительного обезболивания блуждающий нерв обрабатывали 0,1-0,2 мл 0.5% раствора бупивакаина. Далее на ОСА, на расстоянии 5-7мм от бифуркации, и на проксимальный отдел ВСА накладывали сосудистые клипсы. На расстоянии 4-5 мм от бифуркации на проксимальном отделе НСА затягивались две шелковые лигатуры. Верхнюю щитовидную и затылочную артерии (ветви НСА) коагулировали. Далее ствол НСА рассекался между двумя лигатурами, после чего дистальный отрезок НСА коагулировали с целью предотвращения кровотечения. Через проксимальный отрезок НСА в просвет ВСА вводился нейлоновый монофиламент с силиконовым наконечником (Dossil corporation, диаметр 0.19 мм, длина 30 мм; диаметр с покрытием 0,37+/-0,02 мм; длина покрытия 3-4 мм), при этом клипсу с ВСА снимали. Монофиламент продвигали внутри сосуда до ощущения минимального сопротивления, которое соответствует месту отхождения средней мозговой артерии от ВСА, после чего замеряли длину свободного конца монофиламента (10-12мм), затягивали лигатуру на проксимальном отрезке НСА. С этого момента производился отсчет времени ишемии, которое составляло 90 минут. Далее снимали клипсу с ОСА, производили контроль гемостаза, снимали ретрактор и ушивали операционную рану простым узловым швом. На протяжении 85 минут животные находились в клетке с подогреваемым дном (37°C), где восстанавливались после наркоза. За 5 минут до окончания срока окклюзии животных вводили в общий наркоз вышеописанным способом. После обработки области хирургического вмешательства антисептиком, снимали швы, устанавливали ретрактор и обнажали ОСА, на ствол которой накладывали сосудистую клипсу. Затем извлекали монофиламент, коагулировали проксимальный отрезок НСА. Далее удаляли клипсу с ОСА и после проведения контроля гемостаза рану ушивали узловым швом. Затем с целью профилактики инфицирования

кожные покровы в области операционной раны обрабатывали мазью «Левомеколь» и внутримышечно вводили 0,2 мл гентамицина. После операции производили внутрибрюшинную инъекцию 2мл физиологического раствора во избежание гиповолемии в первые часы после операции, когда активность животного будет ограничена в связи с тяжестью состояния. Затем крыс помещали в подогретую клетку, где животные восстанавливались от действия наркоза.

Внутривенное введение

В исследуемых группах клеточный препарат или физиологический раствор (в группе контроля) вводили также через 24 ч после моделирования инфаркта головного мозга под аналогичной анестезией и премедикацией, как было описано ранее. В правой подвздошной области операционное поле обрабатывали антисептиками и обкалывали 0,1-0,2 мл 0.5% раствором бупивакаина. Разрез производили по среднеключичной линии длиной 10-12мм. Бедренную вену, не допуская травматизации, изолировали от окружающих тканей, затем на нее накладывали две шелковые лигатуры 5-0, между которыми стенку вены надрезали и вводили сосудистый катетер ("Dossol corporation"), с помощью которого проводили инфузию клеток или физиологического раствора. Клетки вводили при помощи микроинжектора со скоростью 250 мкл/мин во избежание эмболии сосудов мелкого диаметра. Затем рану ушивали, обрабатывали антибактериальным средством и животное выводили из наркоза.

Магнитно-резонансная томография

Оценку объема очага инфаркта головного мозга животных проводили на МР-томографе для малых лабораторных животных "ClinScan" ("Bruker BioSpin") с индукцией магнитного поля 7 Тл. Использовалась ингаляционная анестезия лабораторных животных изофлураном (1,5-2% + 98% атмосферного воздуха). Для оценки распределения в головном мозге трансплантированных меченных микрочастицами оксида железа МСК использовался ингаляционный наркоз 1,5-2,0% изофлураном в смеси с

чистым кислородом для повышения концентрации оксигемоглобина в крови, что позволило четче детектировать меченые клетки в веществе головного мозга на изображениях, взвешенных по магнитной восприимчивости. Оценка объема очага ишемии головного мозга в динамике с помощью МРТ проводилась в те же сроки, что и оценка терапевтической эффективности клеточной терапии. Проводилось МР-исследование с получением диффузионно-взвешенных изображений с расчетом карт измеряемого коэффициента диффузии (TR/TE=9000/33 мс, b-факторы=0 и 1000 с/мм², размер воксела 0,35*0,35*1,0 мм) для выявления зон инфаркта мозга на ранних сроках, T2-взвешенных изображений (TurboSpinEcho, Turbo Factor=10, TR/TE=5230/46 мс, размер воксела 0,117*0,13*0,7 мм) для оценки объема очага инфаркта мозга и изображений, взвешенных по магнитной восприимчивости (SWI) (3D Gradient Echo, TR/TE=33/17 мс, угол возбуждения 15°, размер воксела 0,117*0,117*0,5 мм) для выявления геморрагических осложнений и детекции в головном мозге трансплантированных МСК, меченных микрочастицами оксида железа.

Примеры полученных МР-изображений головного мозга на T2-взвешенных изображениях, диффузионно-взвешенных изображениях и изображениях взвешенных по магнитной восприимчивости (SWI) через 24 часа после моделирования экспериментального инфаркта мозга представлены на Рис. 1.

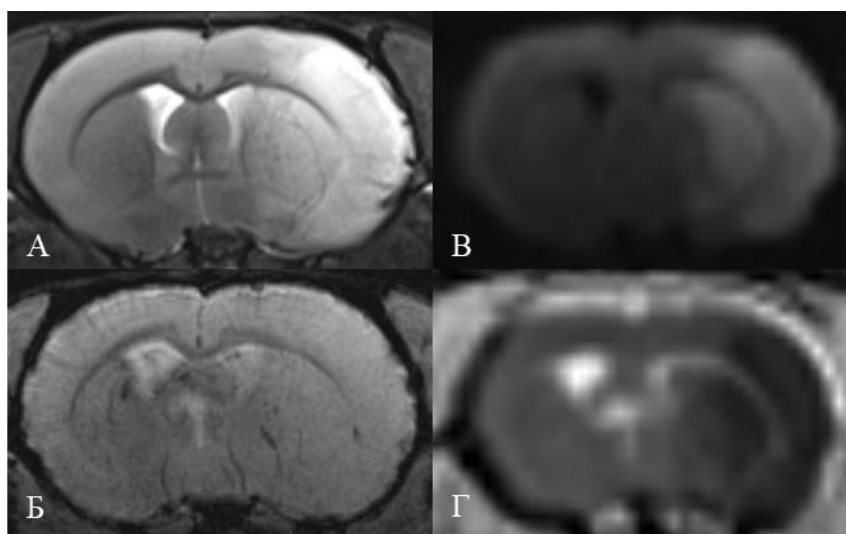


Рис 1. Примеры МР-изображений головного мозга крыс через 24 часа после моделирования острой фокальной ишемии головного мозга. Представлены А -Т2-взвешенное изображение, Б - SWI-изображение, взвешенное по магнитной восприимчивости, В,Г - диффузионно-взвешенное изображение с картой измеряемого коэффициента диффузии. С целью прижизненной визуализации меченных микрочастицами оксида железа МСК в головном мозге лабораторных животных при внутривенной трансплантации применялся метод динамического МР-сканирования с получением изображений взвешенных по магнитной восприимчивости (на основе импульсной последовательности SWI TR/TE/FA=50/19,1/15 толщиной 0,5 мм) и временем одной фазы 7 минут.

Морфометрия очага инфаркта мозга

Оценку объема очага ишемии головного мозга в динамике проводили с использованием программного пакета ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) по Т2-ВИ на 1-е, 7-е, 14-е, 30-е, 60-е сутки после трансплантации (в группах клеточной терапии) или введения физиологического раствора (в группах контроля). Объем зоны инфаркта рассчитывался по формуле $V = (S_1 + \dots + S_n) * (h + d)$, где S_1 — площадь первого среза (мм^2), S_n — площадь среза n (мм^2), h — толщина среза (мм); d — межсрезовый промежуток (мм).

Оценка терапевтической эффективности клеточной терапии

Оценка терапевтической эффективности клеточной терапии проводилась с учетом показателя выживаемости животных, массы тела, оценки тяжести неврологического дефицита в динамике: на 1-е сутки после воспроизведения модели инфаркта головного мозга и на 7-е, 14-е, 30-е и 60-е сутки после клеточной трансплантации.

При выборе тестов для оценки неврологического дефицита учитывалась совокупность таких качеств, как полноценный охват функций нервной системы, которые могут быть утрачены при воспроизведении

данной модели инфаркта головного мозга, а также простота исполнения и наглядность результатов. По указанным критериям был выбран метод оценки неврологического статуса у крыс с использованием стандартной шкалы для оценки тяжести неврологического дефицита у лабораторных грызунов Modified Neurological Severity Scores (mNSS) [185].

Шкала оценки неврологического дефицита mNSS

Шкала mNSS включает оценку моторных нарушений (силу мышц конечностей, выраженность пареза, мышечный тонус), чувствительности (поверхностной и глубокой), координаторной функции, а также учитывает наличие экстрапирамидных расстройств и утраты безусловных рефлексов. Отличается от оригинальной шкалы Neurological severity scores отсутствием тестов с применением электрического тока в качестве раздражителя [224]. При оценке за выполненное действие, предусмотренное шкалой, присваивается 0 баллов. В то время, как выявление какой-либо дисфункции при выполнении задания оценивается в 1 балл. Двигательная функция оценивается по возможности идти прямо на горизонтальной поверхности, а также по способности животного двигать головой, контралатеральными по отношению к очагу инфаркта конечностями. Чувствительность оценивается по тестам, направленным на выявление зрительного восприятия и по тестам на тактильную и проприоцептивную перцепцию. Функция координации движений оценивается по способности балансировать и удерживаться на балке цилиндрической формы (Рис. 2). Также шкала подразумевает выявление миоклоний, миодистонии, судорог, а также утрату рефлексов с роговицы, с ушной раковины и стартл-рефлекса, связанную со степенью тяжести ишемического поражения. 1-6 баллов оценивается как легкий неврологический дефицит; 7-12 – средний; 13-18 – тяжелый. Максимальное количество баллов – 18 характеризуется тяжелым состоянием животного и сопровождается утратой всех вышеперечисленных функций. Протокол оценки неврологического дефицита с использованием шкалы mNSS представлен в Таб. 2.

Таблица 2. Шкала оценки неврологического дефицита лабораторных грызунов (mNSS).

Тест	Балл
Поднятие за хвост: норма – 0, максимальный балл - 3	3
Сгибание передней лапы	1
Сгибание задней лапы	1
Отклонение головы больше чем на 10° от вертикальной оси в течение 30 сек	1
Размещение на полу: норма – 0, максимальный балл - 3	3
Идет прямо	0
Не идет прямо	1
Крутится в сторону паретичных конечностей	2
Падает на сторону паретичных конечностей	3
Сенсорный тест: норма – 0, максимальный балл - 2	2
Тест размещения (зрительный и тактильный контроль)	1
Проприоцептивный тест (глубокая чувствительность, надавливание лапой на край стола для стимуляции мышц конечности)	1
Баланс (тест на брус): норма – 0, максимальный балл - 6	6

Балансирует в устойчивой позе	0
Обхватывает стороны бруса	1
Обхватывает брус и одна конечность падает с бруса	2
Обхватывает и две конечности падают или крутятся на брус (дольше 60сек)	3
Пытается балансировать на брус, но падает (дольше 40сек)	4
Пытается балансировать на брус, но падает (дольше 20сек)	5
Падает без попыток балансировать или висит на брус (дольше 20сек)	6
Отсутствие рефлексов или патологические движения: норма – 0, максимальный балл - 4	4
Рефлекс с наружного слухового прохода (встряхивание головы при прикосновении к слуховому проходу)	1
Роговичный рефлекс (мигание глаза при прикосновении к роговице)	1
Старт-рефлекс (двигательный ответ на резкий громкий звук)	1
Судороги, миоклонус, миодистония	1
Максимальный балл	18



Рис. 2. Тест баланса на бруске цилиндрической формы (показатель шкалы оценки неврологического статуса лабораторных животных).

Гистологическое исследование

В исследовании распределения введенных внутривенно меченых МСК и ИПСК-НПК в головном мозге лабораторных животных с моделью острой фокальной церебральной ишемии, крыс выводили из эксперимента на следующих сроках: через 2 часа, через 24 часа и через 7 суток после клеточной инфузии. После ингаляции летальной дозы изофлурана и внутрибрюшинной инъекции тилетамина, проводили транскардиальную перфузию 4% раствором параформальдегида на 1-кратном фосфатном буфере (PBS) с рН 7.4. Затем проводили декапитацию, после чего мозг извлекали и сутки выдерживали в растворе 4% параформальдегида на PBS при температуре +4°C. Затем при помощи вибротома (Thermo scientific, micron НМ 650v) изготавливали фронтальные срезы мозга толщиной 50 мкм. Сначала препараты обесцвечивались с использованием 2% водного раствора желтой кровяной соли и 2% водного раствора соляной кислоты в течение 10 минут. Затем проводили ополаскивание в дистиллированной воде, после чего подкрашивали препараты в растворе нейтрального красного и после проведения через спирты и ксилол заключали в среду DPX (Sigma-Aldrich®).

Затем срезы трижды промывали в PBS в течение 10 минут с последующей инкубацией со вторичными антителами (1: 500, анти-мышинный IgG Alexa fluor® 647) в течение 2 часов при комнатной температуре. Клеточные ядра докрашивали путем выдерживания в растворе DAPI (2 мкг/ мл, Sigma) в течение 10 минут при комнатной температуре. После этого производили выделение исследуемых участков вещества мозга и оценку степени флуоресценции при помощи конфокального микроскопа.

Для оценки глиальной реакции мозга реципиента проводили иммуногистохимическое исследование через 7 суток после введения МСК. Животных выводили из эксперимента и готовили препарат мозга по вышеописанной методике. Затем получали фронтальные срезы толщиной 40 мкм с помощью вибротома. Для проведения иммуногистохимического исследования срезы мозга 1 ч инкубировали в блок-растворе: 0.3% Triton X-100, 5% нормальная сыворотка козы (Sigma-Aldrich), PBS (0.01 M pH 7.4). Затем 24 ч инкубировали в блок-растворе и первичных кроличьих антител anti-GFAP antibody (1:500; Abcam). Срезы отмывали в PBS (0.01 M pH 7.4) и инкубировали в 0.3% Triton X-100, PBS (0.01 M pH 7.4) и вторичных козых антител к иммуноглобулинам кролика (1:500; Alexa Fluor 594; Sigma-Aldrich). Срезы отмывали в PBS (0.01 M pH 7.4), докрашивали ядра раствором DAPI (2 мкг/мл; Sigma) и заключали под покровное стекло в глицерин.

Флуоресцентная и конфокальная микроскопия

Микрофотографии препаратов были получены с помощью цифрового флуоресцентного микроскопа Keyence BZ-9000E и лазерного сканирующего конфокального микроскопа Nikon A1R MP+.

Для проведения оценки экспрессии GFAP предварительно окрашенные и смонтированные на предметные стекла препараты сканировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Полученные изображения обрабатывали с помощью специализированного программного

обеспечения NIS Elements AR (Nikon Japan). Зону сканирования в области коры очага инфаркта (650x650 мкм) делили на регионы интереса по 220x220мкм. Внутри каждого региона измеряли интенсивность флуоресценции интересующих каналов с помощью профилей интенсивности, из которых брали среднее значение со стандартным отклонением.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы "SPSS Statistics 23.0". Уровень значимости для всех экспериментов составлял $p < 0,05$. Выживаемость животных оценивали методом Каплана—Мейера с использованием log-rank теста (с FDR поправкой на множественные сравнения) для попарного сравнения групп. Оценку терапевтической эффективности трансплантации МСК и ИПСК-НПК по динамике изменения массы тела животных и неврологического дефицита, а также изменения объема очага ишемии головного мозга в динамике проводили с помощью общей линейной модели с повторными измерениями, с учетом поправки на множественное сравнение. Оценка экспрессии GFAP производилась методом факторного дисперсионного анализа с группировкой (Nested Factorial ANOVA), с учётом данных каждого измерения у каждого экспериментального животного в контрольной группе и группе с применением клеточной терапии МСК в дозе 2×10^6 клеток.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка терапевтической эффективности клеточной терапии на модели экспериментального инфаркта головного мозга

На первом этапе нашей работы производилась оценка эффективности клеточной терапии разными типами стволовых/прогениторных клеток, имеющими различное происхождение, в двух дозировках на модели острой фокальной ишемии головного мозга у лабораторных животных при внутривенной трансплантации. Через 24 часа после моделирования инсульта производилась оценка состояния животных и объем очага ишемии головного мозга по данным МРТ, после чего производилась внутривенная трансплантация клеточного материала. Выбор времени клеточной инфузии был основан на данных об эффективности расширения «терапевтического окна» реперфузионной терапии [159,172], что в том числе связано с нарушением гематоэнцефалического барьера в условиях ишемии [103], и делает более вероятной оказание эффекта трансплантированных клеток за счет выделения паракринных факторов в веществе головного мозга. В течение срока наблюдения, который составлял 60 суток с момента клеточной трансплантации, производилась оценка выживаемости животных, а также сравнение в динамике изменения массы тела животных, неврологического дефицита и объема очага ишемии головного мозга.

1. Оценка и сравнение терапевтической эффективности внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга

Изучение действия МСК при инфаркте головного мозга ведется длительное время, что объясняет большое количество информации о безопасности и положительном влиянии внутривенной трансплантации МСК на восстановление неврологических функций как у животных, так и у людей [98,174,129]. Накоплен большой опыт об эффектах внутривенного применения МСК на моделях экспериментального инсульта в широком

диапазоне доз: от 1×10^6 до 1×10^7 клеток [129]. Представляет интерес выявление и оценка эффективности применения минимальной дозировки МСК, а также изучение дозозависимости терапевтического эффекта внутривенной трансплантации МСК лабораторным животным с острой фокальной ишемией головного мозга, что обуславливает выбор терапевтических дозировок МСК в настоящем исследовании.

1.1 Оценка выживаемости лабораторных животных

Выживаемость лабораторных животных во всех экспериментальных группах была оценена при помощи метода Каплана-Мейера. Срок наблюдения составлял 60 суток, после чего животные выводились из эксперимента. Кривые выживаемости представлены на Рис. 3.

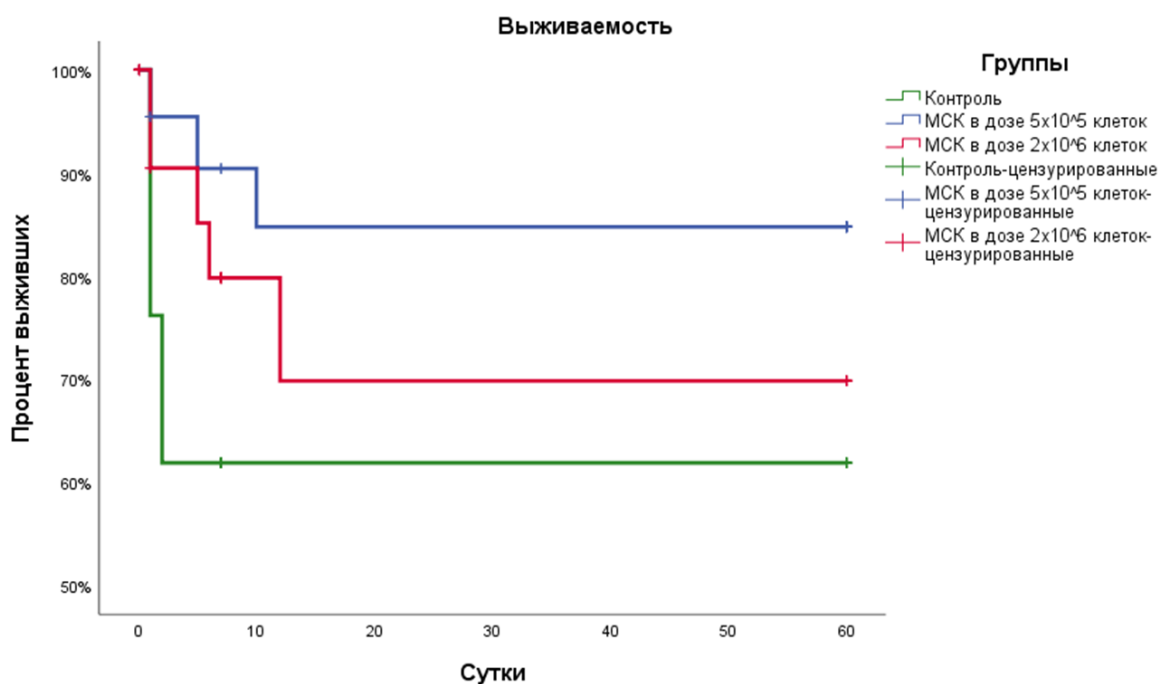


Рис. 3. Кривые выживаемости Каплана-Мейера для исследуемых групп животных на протяжении 60 суток. Животные, выведенные раньше, для проведения гистологического и иммуногистохимического исследования, отмечены как цензурированные данные. Достоверных отличий при сравнении трех групп выявлено не было.

За время наблюдения гибель животных во всех группах отмечалась в течение первых двух недель после моделирования инсульта. Наибольшее количество летальных исходов происходило в первые трое суток, что обусловлено процессом формирования очага инфаркта головного мозга, а также присоединением и развитием сопутствующего вазогенного отека вещества мозга и появлением геморрагической трансформации, отягощавшей состояние животных.

Сравнение групп с помощью log-rank теста с FDR-поправкой на множественные сравнения показало, что достоверных различий между группами не выявлено. Таким образом, можно заключить, что внутривенная трансплантация МСК в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток не оказывает влияния на выживаемость лабораторных крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга.

1.2 Оценка динамики изменения массы тела лабораторных животных

При сравнении трех групп в ходе эксперимента отмечалось постепенное нарастание массы животных после клеточной трансплантации. При сравнении нормированной к первым суткам массы крыс в трех группах методом общей линейной модели с повторными измерениями достоверных отличий в динамике изменения массы животных выявлено не было. Кривые изменения массы крыс в исследуемых группах представлены на Рис. 4.

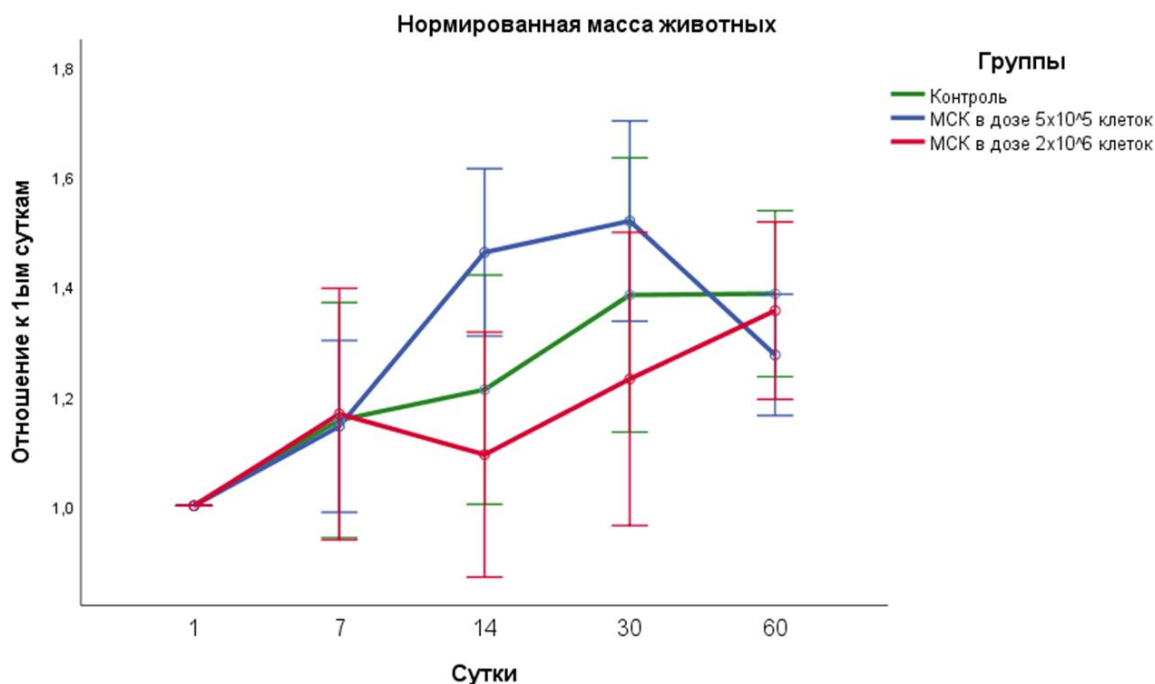


Рис. 4. График динамики изменения нормированной к первым суткам массы животных на протяжении 60 суток. Представлены средние значения и планки доверительного интервала на каждую контрольную точку: 1-е, 7-е, 14-е, 30-е и 60-е сутки после трансплантации. Достоверных отличий при сравнении трех групп выявлено не было.

Согласно полученным данным, внутривенная трансплантация МСК ни в дозировке 5×10^5 клеток, ни в дозе 2×10^6 клеток не влияет на изменение массы лабораторных животных в течение 60 суток после моделирования инфаркта головного мозга, однако, наблюдается постепенное её увеличение во всех исследуемых группах.

1.3 Оценка динамики изменения неврологического статуса лабораторных животных

Согласно дизайну исследования, перед моделированием ишемического инсульта всем животным была проведена оценка неврологического статуса по шкале mNSS. При этом животные, имевшие какой-либо неврологический дефицит, из исследования были исключены. Далее производилась оценка

неврологического дефицита перед клеточной трансплантацией на 7-е, 14-е, 30-е и 60-е сутки после клеточной инфузии.

При анализе методом общей линейной модели с повторными измерениями динамики изменения функции нервной системы по шкале mNSS (Рис. 5) выявлялись достоверные отличия при сравнении всех трех групп ($p < 0,05$). При этом имелись достоверные отличия в динамике при сравнении групп с различными концентрациями между собой, а также в сравнении каждой из них с группой контроля. При попарной оценке с использованием доверительных интервалов на 7-е сутки после трансплантации достоверно значимое различие отмечалось в группе с введением 2×10^6 МСК по сравнению с двумя другими группами ($p < 0,05$). В то время как на 14-е сутки значимые отличия отмечались при сравнении групп с клеточной терапией разными дозами с группой контроля, а также между собой ($p < 0,05$). Полученные результаты демонстрируют отсроченное начало терапевтического действия МСК в дозе 5×10^5 клеток: эффект от введения этой дозы МСК наступал на 14-е сутки. В то же время терапевтический эффект клеточной терапии 2×10^6 клеток отмечался, начиная с 7-х суток. На 30-е сутки достоверные отличия от контроля отмечались в обеих группах с клеточной терапией. А к 60-м суткам терапевтический эффект 5×10^5 МСК нивелировался, и значимые отличия отмечались при сравнении группы с 2×10^6 МСК и двух других групп.

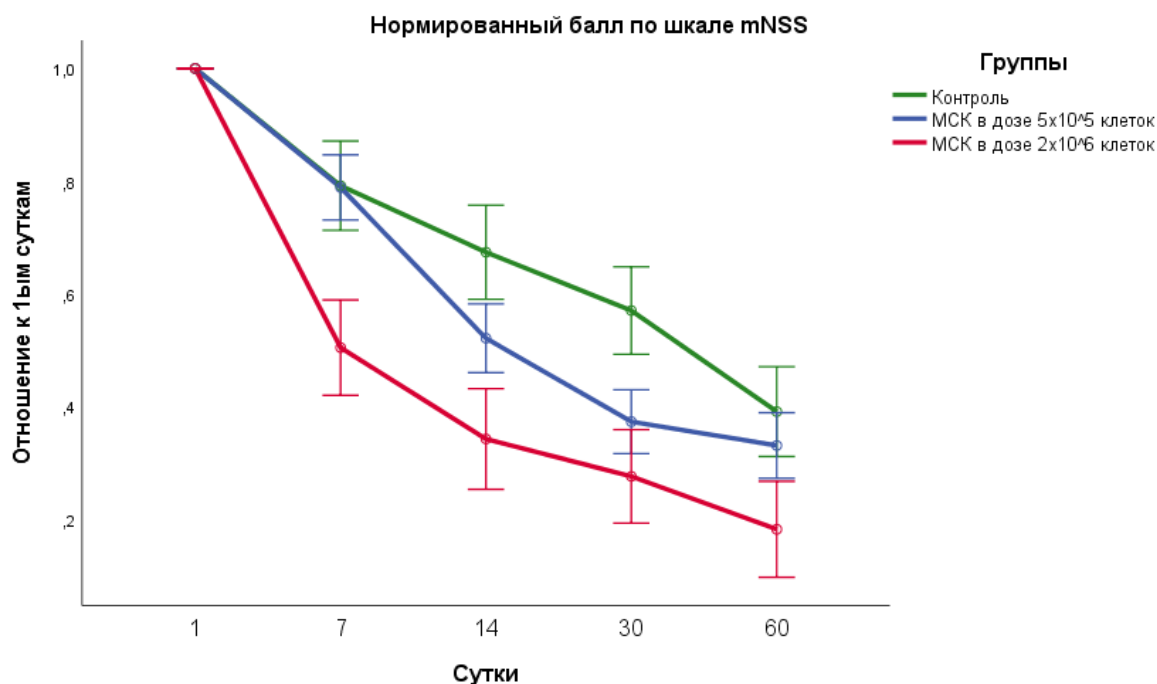


Рис. 5. График динамики изменения нормированного (к первым суткам) неврологического дефицита, оцененного по шкале mNSS, на протяжении 60 суток. Представлены средние значения и планки доверительного интервала.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют терапевтическую эффективность внутривенного применения клеточной терапии МСК в обеих концентрациях. Однако, при введении в минимальной концентрации (5×10^5 клеток) терапевтический эффект наблюдался, начиная с 14-х суток и длился менее 2-х месяцев. В то время как введение 2×10^6 МСК приводило к более быстрому, выраженному и пролонгированному воздействию на неврологический статус животных. Соответственно внутривенное применение МСК способствует более быстрому и эффективному восстановлению функции нервной системы у исследуемых крыс с моделью экспериментального инсульта. При этом терапевтическая эффективность трансплантации МСК у животных в условиях острой фокальной ишемии головного мозга носит дозозависимый характер.

1.4 Оценка динамики изменения объема очага ишемии головного мозга лабораторных животных

Во всех группах в течение первых 7 суток объем очага уменьшался быстрее, чем в более поздние сроки (Рис. 6).

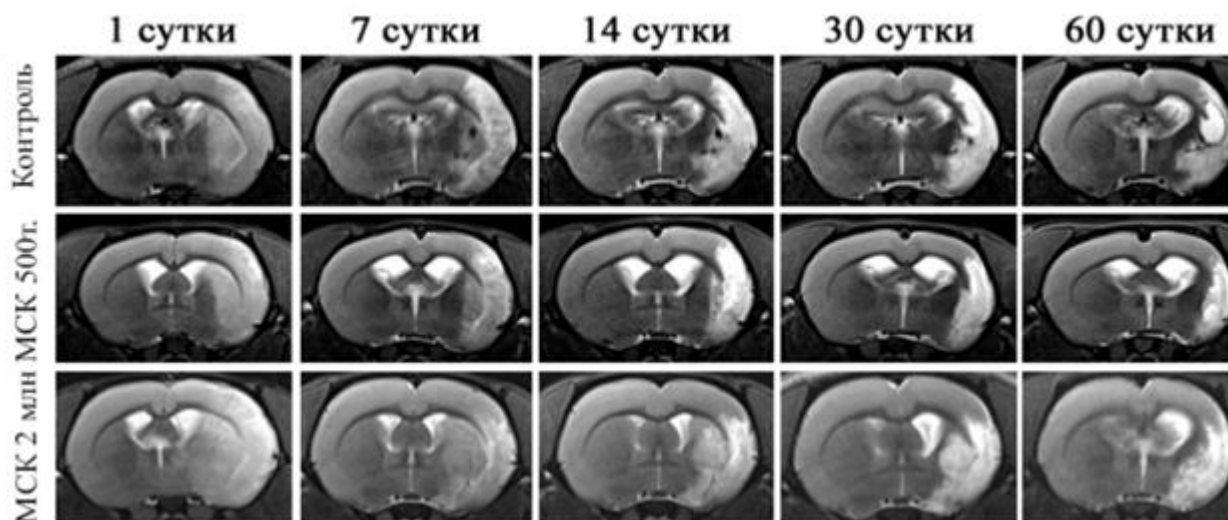


Рис. 6. Динамика изменения очага ишемии головного мозга на примере T2-изображений, полученных при МР-исследовании головного мозга крыс до (1-е сутки) и после (7-е, 14-е, 30-е, 60-е сутки) внутривенной трансплантации различных доз МСК или физиологического раствора (группа контроля), в контрольных точках.

Динамика изменения нормированного к первым суткам объема очага ишемии головного мозга по данным МРТ для животных всех исследуемых групп была оценена методом общей линейной модели с повторными измерениями (Рис. 7).

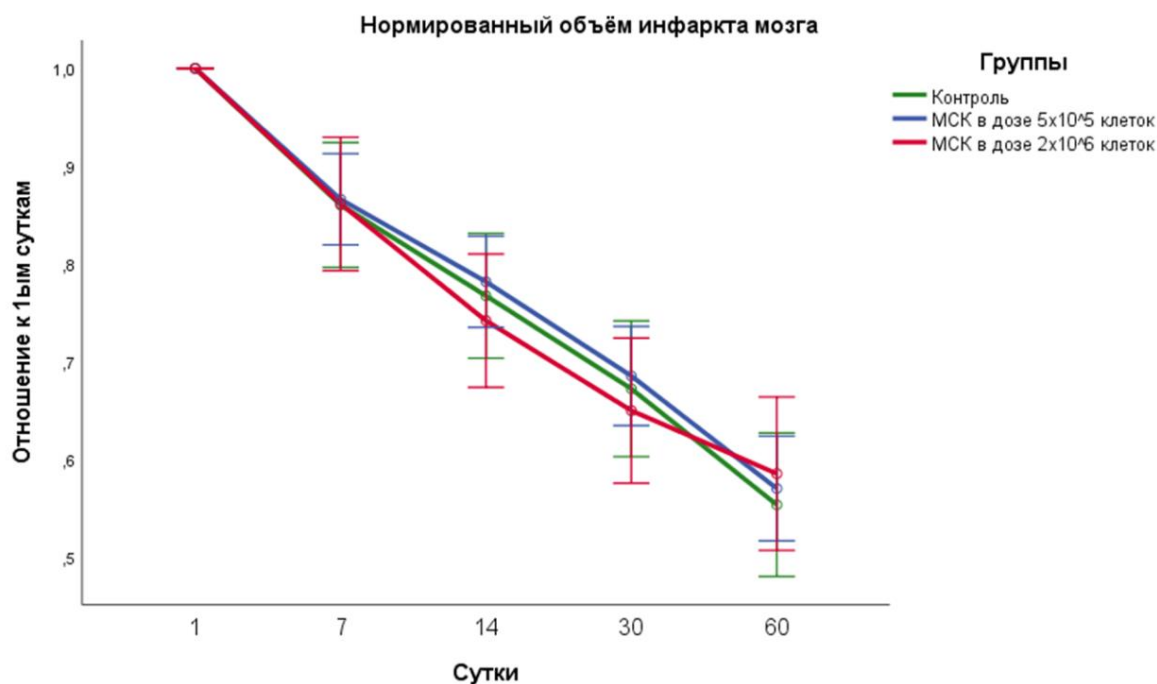


Рис. 7. График динамики изменения нормированного к первым суткам объема очага ишемии головного мозга по данным МРТ на протяжении 60 суток. Представлены средние значения и планки доверительного интервала. При сравнении трех исследуемых групп по тренду изменения объема очага ишемии головного мозга крыс статистически значимых различий выявлено не было.

Результаты настоящего исследования демонстрируют терапевтическую эффективность внутривенной трансплантации МСК крысам с моделью острой фокальной ишемии головного мозга. При этом, согласно полученным данным, инфузия МСК в дозах 5×10^5 и 2×10^6 клеток достоверно уменьшает степень выраженности неврологического дефицита у лабораторных животных по сравнению с группой контроля, но не оказывает значимого влияния на выживаемость, изменение массы тела животных и динамику изменения объема очага ишемии головного мозга, что согласуется с данными других исследователей [197]. Результаты исследования продемонстрировали, что внутривенная трансплантация МСК имеет дозозависимый эффект: с увеличением дозы вводимых клеток до 2×10^6 возросла скорость и степень восстановления неврологических функций у крыс с моделью

экспериментального инфаркта головного мозга. Но следует отметить, что увеличение дозировки не оказало значимого влияния на выживаемость лабораторных животных, а также на динамику изменения объема инфаркта мозга.

История изучения эффектов, оказываемых МСК при внутривенном способе введения лабораторным животным с разными моделями ишемического инсульта насчитывает не одно десятилетие. С начала 21 века в большинстве исследований используется модель острой фокальной ишемии головного мозга путем транзиторной (или перманентной) окклюзии средней мозговой артерии монофиламентом. Накоплен большой опыт в изучении эффектов оказываемых МСК на вещество головного мозга в условиях ишемии, а также предприняты многочисленные попытки объяснить природу этого влияния разными механизмами действия данного типа стволовых клеток: секреция нейротрофических факторов, приводящих к стимуляции ангиогенеза и эндогенного нейрогенеза, активизация нейропластичности, подавление апоптоза клеток головного мозга, иммуномодулирующее и противовоспалительное действие и другие механизмы [207,149,114,100,132]. Однако не существует единого мнения о превалирующем механизме действия МСК, равно как и не определена оптимальная доза трансплантированных клеток, способная проявить максимально выраженное терапевтическое воздействие на организм реципиента, применение которой не было бы связано с рисками осложнений, и изготовление которой при этом не сопровождалось бы чрезмерными трудозатратами.

Подбор дозы МСК в исследованиях обусловлен выбранным путем трансплантации. При внутривенном введении применяется широкий диапазон дозировок [123]. По данным научной литературы, минимальная исследуемая концентрация составляет 1×10^6 клеток. Так в ряде исследований доказана терапевтическая эффективность внутривенного введения МСК различного происхождения (из жировой ткани, костного мозга) в данной дозе крысам с экспериментальным инсультом по показателю регресса

неврологического дефицита [231,86,154,165], а также по влиянию на процессы, происходящие в веществе головного мозга, оцененные методом иммуногистохимии и магнитно-резонансной спектроскопии. Так, например, было показано положительное влияние клеточной трансплантации МСК, полученных из жировой ткани, после индукции ишемии головного мозга крысам с гипергликемией по сравнению с группой таких же крыс, не получавших клеточную терапию [86]. В группе с клеточной терапией отмечалось достоверно более выраженное восстановление функционального состояния животных по данным поведенческих тестов, и по иммуногистохимическому анализу вещества головного мозга - по показателю глиальной реакции (антитела к глиальному фибриллярному белку (GFAP) и антитела к кальций-связывающему белку (Iba-1). Однако, не наблюдалось разницы в уменьшении объема очага инфаркта головного мозга по данным МРТ, что согласуется с данными нашего исследования. В эксперименте Namioka [154] также не наблюдалось влияния на изменение объема зоны ишемии головного мозга трансплантации такой же дозировки МСК, полученных из костного мозга, в хроническом периоде ишемического инсульта у крыс (через 8 недель после воспроизведения модели). Функциональное восстановление животных, получавших клеточную терапию, авторы связывают с восстановлением гематоэнцефалического барьера под влиянием трансплантированных МСК.

В исследовании Zheng 2010 года, внутривенная трансплантация $1,0 \times 10^6$ МСК из красного костного мозга человека через 5 часов после моделирования экспериментального инсульта приводила к органическому и функциональному восстановлению [231]. Результат оценивали через 5 часов после трансплантации и через 1, 3 и 7 дней при помощи магнитно-резонансной спектроскопии, гистологии и когнитивно-функционального тестирования. Внутривенное введение МСК снижало соотношение лактат/креатин (показатель внутриклеточного ацидоза) через 24 и 72 часа после введения, а также подавляло фрагментацию ядерной ДНК, и

отсроченную гибель нейронов (преимущественно в области CA1 гиппокампа), что приводило к функциональному восстановлению по сравнению с контрольной группой. Иммуноферментный анализ (ИФА) гиппокампа также выявил увеличение нейротрофического фактора мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) в головном мозге крыс в группе, получавшей МСК. Нейротрофины играют важную роль в функционировании нервной системы, участвуя в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировке, процессах выживания и гибели нейронов, а также в механизмах нейрональной пластичности [166]. BDNF защищает нейроны гиппокампа от глутамат-индуцированной апоптотической гибели клеток [110] и способствует выживанию клеток головного мозга [46].

В то же время в исследовании Kranz и соавт. [119] спонтанно-гипертензивным крысам проводили сравнение эффективности однократной трансплантации 1×10^6 МСК плаценты человека (материнской и фетальной части) через 24 часа после индукции ишемии и двукратного введения МСК в той же дозировке (через 8 и 24 часа). Срок наблюдения составлял 60 суток. По показателю динамики регресса неврологического дефицита, оцененного тестом сужающейся дорожки и по шкале mNSS, было выявлено достоверно более выраженное влияние двукратной трансплантации. При этом применение МСК однократно не влияло на динамику регресса объема очага ишемии, оцененного по МРТ, в то время как на 60-е сутки исследования только в группе с двукратной трансплантацией МСК из материнской части плаценты было выявлено достоверно значимое влияние на уменьшение зоны ишемии при сравнении с контролем. Также в данной исследуемой группе наблюдалось более выраженное влияние клеточной терапии на активность глиальной реакции в зоне, примыкающей к очагу ишемии, по данным иммуногистохимического исследования с антителами к глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP) при сравнении с контролем. Авторы предполагают, что в эффективности двойного введения МСК основную роль играет большая дозировка клеток, трансплантированных животным, а также

особенные адгезивные свойства МСК материнской части плаценты, отличные от МСК других источников, а также вносит свой вклад проведение клеточной инфузии в пределах более широкого терапевтического окна.

В исследованиях с применением более высоких доз МСК также наблюдались позитивные терапевтические эффекты [62,149]. При отсроченной (на 8й неделе инсульта) трансплантации МСК костного мозга в дозе 3×10^6 клеток отмечалось более выраженное функциональное восстановление животных по данным поведенческих тестов, а к 2-3 неделе после клеточной инфузии наблюдалось нарастание плотности сосудов в зоне ишемии по данным МРТ, что также подтверждалось данными количественной ПЦР (повышалась экспрессия факторов ангиогенеза и трансформирующий фактор роста бета) и гистологическим исследованием [149]. В другом исследовании за 8 недель наблюдалось прорастание волокон кортикоспинального тракта моторной зоны коры противоположного полушария к денервированному спинному мозгу по данным электрофизиологических методов диагностики, что также было подтверждено гистологически [133].

В ограниченном количестве научных исследований авторы оценивали дозозависимость эффекта трансплантации МСК. Так, например, Tanaka с соавторами [201] оценивали эффекты после трансплантации МСК, полученных из пуповины, в дозе 1×10^4 и 1×10^5 новорождённым мышам с моделью инфаркта мозга в течение 28 суток. В ходе эксперимента авторы подтвердили наличие дозозависимого эффекта, показав, что восстановление неврологических функций у животных значительно улучшалось только в группе с большей дозировкой МСК. В исследовании Nonna [96] был выявлен дозозависимый эффект внутривенной трансплантации иммортализованных геном теломеразы человека МСК, полученных из костного мозга (hTERT-MSC), в следующих дозировках 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 клеток крысам через 12 часов после моделирования инфаркта головного мозга. По данным авторов, наблюдалась корреляция функционального восстановления

животных и уменьшения объема очага ишемии (по данным МРТ, магнитно-резонансной спектроскопии и гистологии на 7-е сутки после индукции ишемии) в зависимости от дозы трансплантированных клеток. Также при сравнении трансплантации 1×10^6 hTERT-MSC и не модифицированных МСК в той же дозе отмечалось идентичное влияние обоих типов стволовых клеток на регресс объема очага инфаркта мозга. В другой работе Wu и соавторы [221] сравнивали терапевтическую эффективность клеточной терапии МСК при внутривенном введении крысам с моделью инфаркта мозга в дозе 1×10^6 и 3×10^6 в течение 7 дней. Авторы не выявили значимой разницы между исследуемыми группами: трансплантация МСК в обеих дозировках в равной степени способствовала восстановлению неврологического статуса лабораторных животных, уменьшало объем очага инфаркта мозга (оцененного с помощью гистологического исследования) и выраженность апоптоза, а также приводило к активации ангиогенеза. Можно предположить, что отсутствие значимых различий связано с небольшой разницей между исследуемыми дозировками. Согласно данным литературы, максимальной дозировкой МСК для внутривенной трансплантации лабораторным грызунам с экспериментальным инфарктом мозга составила порядка 1×10^7 клеток [96,98]. При применении такой дозировки МСК костного мозга авторами была показана терапевтическая эффективность клеточной терапии, при этом не наблюдалось каких-либо побочных эффектов. Стоит отметить, что МСК имеют относительно крупный размер (20-30 мкм в диаметре) и выраженные адгезивные свойства, что может потенциально приводить к эмболическим осложнениям при трансплантации больших доз клеточного материала, в частности к эмболии лёгочной артерии при внутривенной трансплантации [85].

Результаты настоящего исследования сопоставимы с данными мировой научной литературы, посвященной изучению влияния клеточной терапии МСК на восстановление животных с моделью экспериментального инфаркта головного мозга. Как и в нашей работе, подавляющее большинство

исследователей наблюдало регресс неврологического дефицита у животных, получавших клеточную терапию. При этом выраженность функционального восстановления напрямую зависит от дозировки введенных МСК. В некоторых работах также отмечался регресс объема очага инфаркта [96]. Но наряду с этим есть исследования, в которых подобного эффекта МСК не было выявлено [119,86,154].

Можно предположить, что выраженность терапевтического эффекта внутривенного введения МСК зависит от источника клеток, выбранной дозировки и времени применения клеточной трансплантации. В ходе настоящего исследования было продемонстрировано, что внутривенная трансплантация МСК плаценты человека оказывает положительное влияние на восстановление неврологического статуса животных с моделью экспериментального инфаркта головного мозга даже в минимальной дозировке – 5×10^5 клеток. Также был выявлен дозозависимый эффект внутривенной трансплантации МСК: применение большей концентрации клеток приводило к более раннему, более выраженному и пролонгированному эффекту на регресс неврологического дефицита у лабораторных крыс с инфарктом головного мозга.

2. Оценка и сравнение терапевтической эффективности внутривенной трансплантации нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток человека, в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга

2.1 Оценка выживаемости лабораторных животных

Выживаемость лабораторных животных за время наблюдения (60 суток) во всех экспериментальных группах была оценена при помощи метода Каплана-Мейера. После окончания срока наблюдения, 60 суток, животные выводились из эксперимента. Кривые выживаемости представлены на Рис. 8.

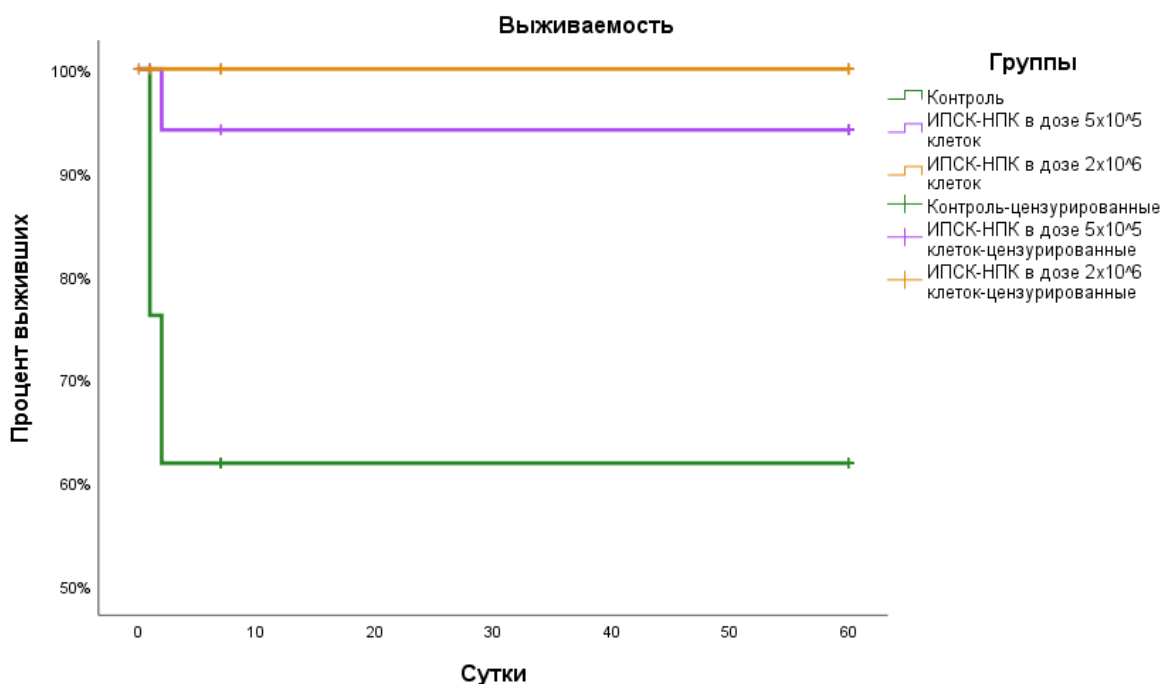


Рис. 8. Кривые выживаемости Каплана-Мейера для исследуемых групп животных на протяжении 60 суток. Животные, выведенные раньше для проведения гистологического исследования, отмечены как цензурированные данные. Достоверные отличия выявлены при сравнении групп с клеточной терапией с группой контроля ($p < 0,05$).

При оценке показателя выживаемости лабораторных животных с помощью log-rank теста с FDR-поправкой на множественные сравнения наблюдались достоверные отличия обеих групп с введением ИПСК-НПК по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). При этом не было выявлено значимых различий по данному показателю при сравнении групп с клеточной терапией ИПСК между собой.

2.2 Оценка динамики изменения массы тела лабораторных животных

Сравнение нормированной к первым суткам массы крыс в трех группах производилось методом общей линейной модели с повторными измерениями. При оценке по данному показателю достоверных отличий в динамике изменения массы животных выявлено не было. Кривые изменения массы крыс в исследуемых группах представлены на Рис. 9.

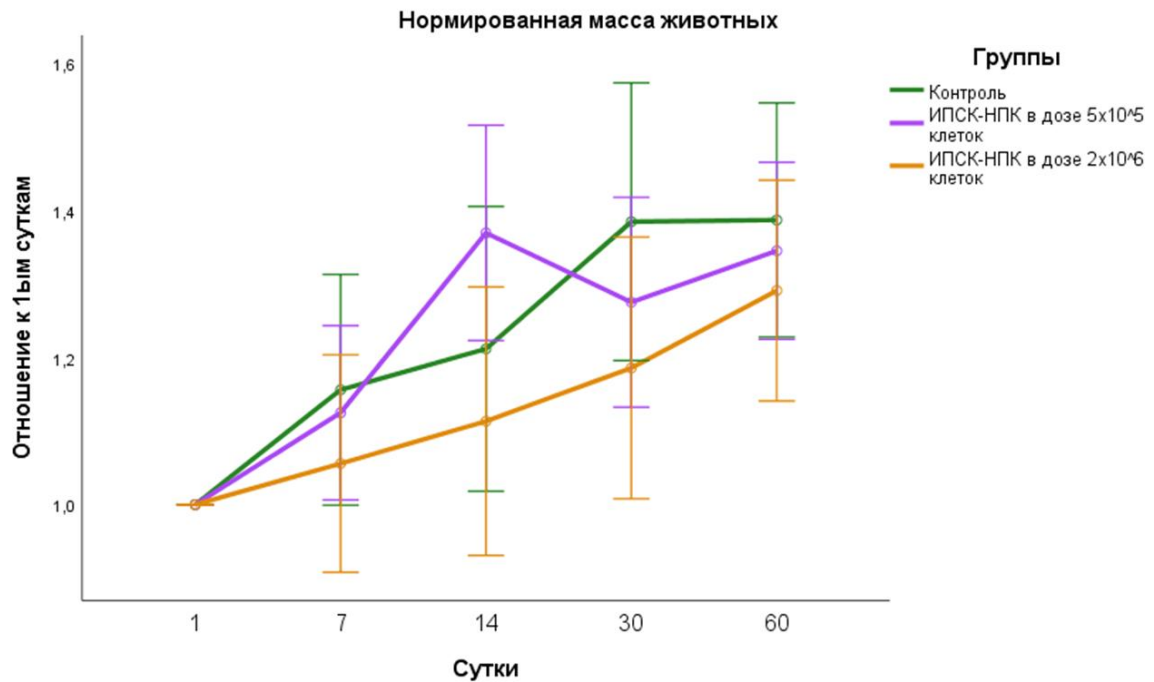


Рис. 9. График динамики изменения нормированной к первым суткам массы животных. Срок наблюдения составлял 60 суток. Представлены средние значения и планки доверительного интервала.

2.3 Оценка динамики изменения неврологического статуса лабораторных животных

Анализ динамики изменения неврологического дефицита по показателям шкалы mNSS, нормированным к первым суткам, производился методом общей линейной модели с повторными измерениями. При сравнении полученных данных по тренду регресса неврологического дефицита были выявлены достоверные отличия в группе с введением 2×10^6 клеток по сравнению с группой клеточной терапии 5×10^5 ИПСК-НПК и контролем ($p < 0,05$). График динамики регресса неврологического дефицита, оцененного по шкале mNSS представлен на Рис. 10.

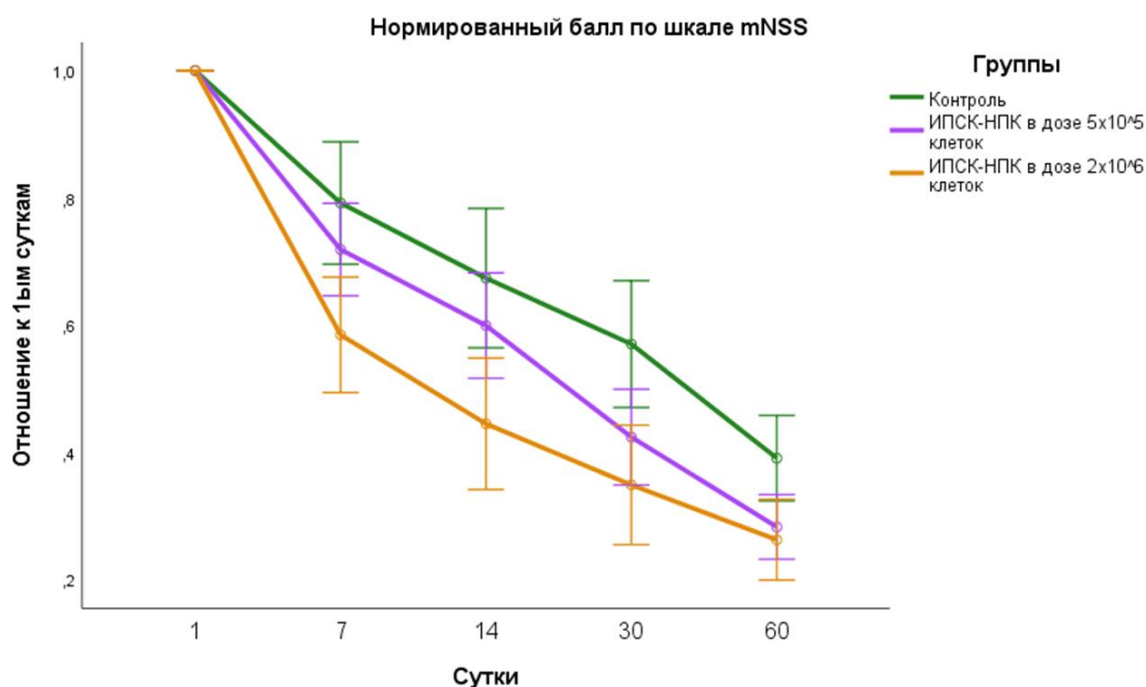


Рис. 10. График динамики изменения нормированного (к первым суткам) неврологического дефицита, оцененного по шкале mNSS на протяжении 60 суток. Представлены средние значения и планки доверительного интервала.

Таким образом, можно заключить, что внутривенная трансплантация ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток оказывает положительное терапевтическое воздействие на функциональное восстановление лабораторных крыс после воспроизведения модели инфаркта головного мозга.

2.4 Оценка динамики изменения объема очага ишемии головного мозга лабораторных животных

Анализ динамики изменения нормированного к первым суткам объема очага ишемии головного мозга по данным МРТ для всех исследуемых групп производился методом общей линейной модели с повторными измерениями. Во всех группах исследования, независимо от дозы введенных клеток, а также в группе контроля отмечалось постепенное уменьшение объема зоны инфаркта мозга (Рис. 11).

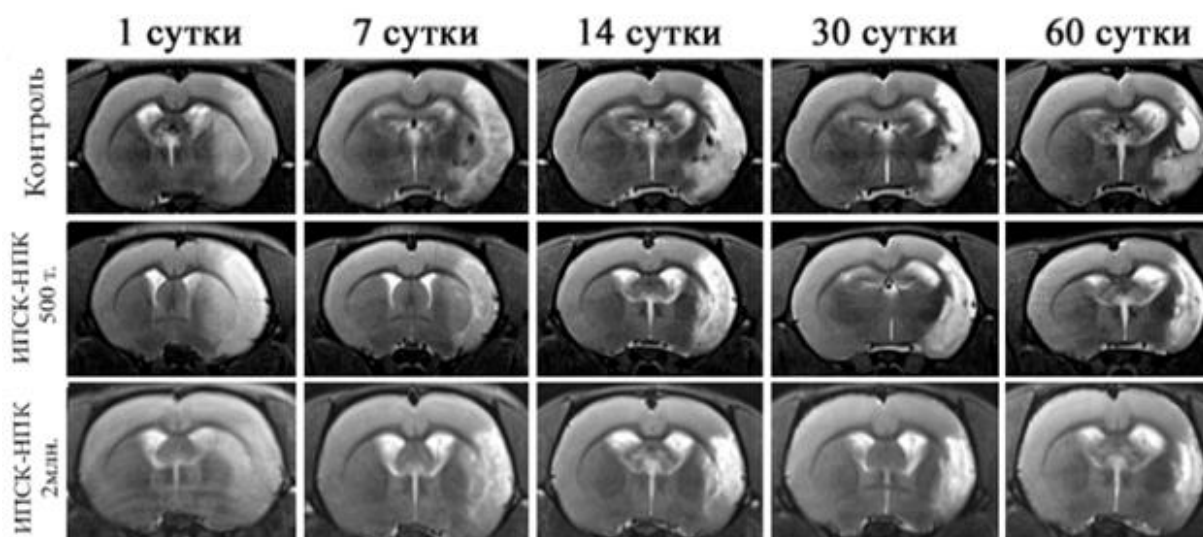


Рис. 11. Динамика изменения очага ишемии головного мозга на примере T2-изображений, полученных при МР-исследовании головного мозга крыс до (1-е сутки) и после (7-е, 14-е, 30-е, 60-е сутки) внутривенной трансплантации различных доз ИПСК-ИПК или физиологического раствора (группа контроля), в контрольных точках.

При сравнении по данному показателю лабораторных животных всех трех исследуемых групп статистически значимых различий выявлено не было (Рис. 12).

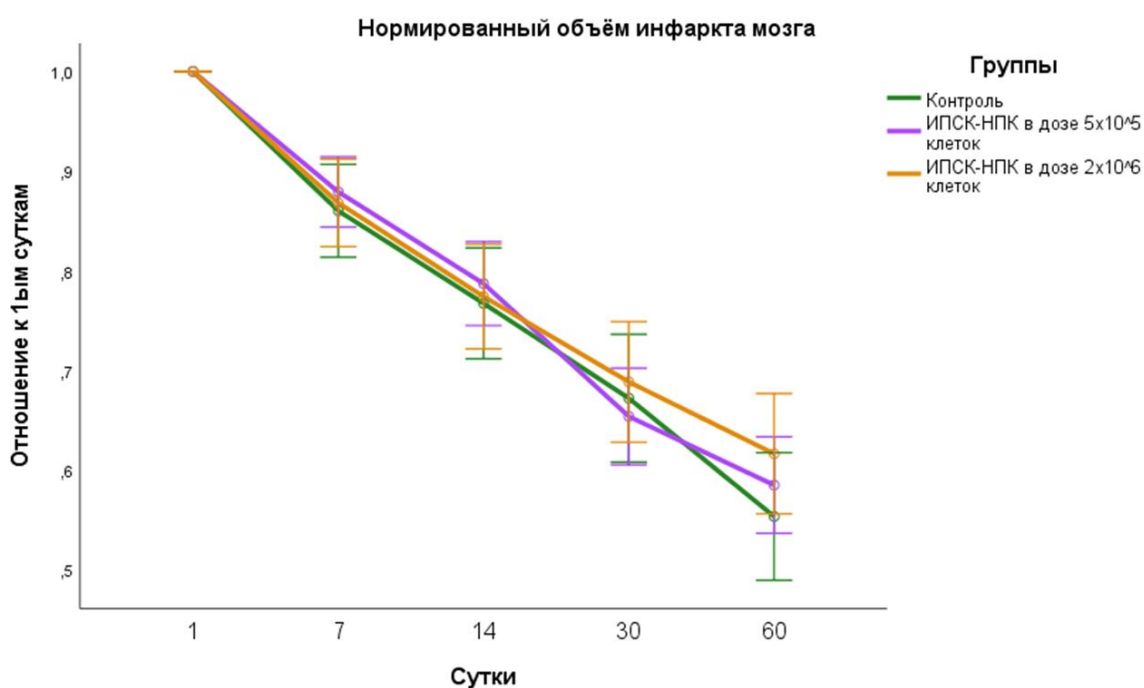


Рис. 12. График динамики изменения объема нормированного к первым суткам очага ишемии головного мозга по данным МРТ на протяжении 60 суток. Представлены средние значения и планки доверительного интервала.

Таким образом при оценке терапевтической эффективности внутривенной трансплантации ИПСК-НПК было выявлено достоверное значимое влияние клеточной терапии на показатель выживаемости, независимо от дозы клеточного материала. Также наблюдался достоверно более выраженный регресс неврологического дефицита при внутривенной трансплантации ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток. При этом трансплантация ИПСК-НПК в обеих дозах не оказывала влияния на динамику изменения массы исследуемых животных и уменьшения объема очага ишемии по данным МР-исследования на протяжении 60 суток.

В течение последнего десятилетия активно исследуется терапевтическая эффективность применения ИПСК и клеток, полученных из ИПСК, на модели экспериментального инфаркта головного мозга у животных. В подавляющем большинстве научных работ рассматриваются эффекты ИПСК и их производных при интрацеребральной трансплантации, в то время как исследований по изучению системной трансплантации ИПСК-НПК на моделях инфаркта мозга нам найти не удалось. Согласно результатам экспериментальных работ с использованием стереотаксического введения ИПСК, дифференцированных в нейрональном направлении (прогениторных или нейроэпителиальных клеток) непосредственно в вещество мозга, клеточная трансплантация приводила к функциональному восстановлению животных, перенесших ишемический инсульт, по данным различных поведенческих тестов, исследующих моторную и сенсорную функции нервной системы [164,170,206,51,202,71,222]. Согласно результатам нашего исследования, внутривенная трансплантация ИПСК-НПК также способствует функциональному восстановлению лабораторных животных, при этом помимо регресса неврологического дефицита, нами выявлено

значимое влияние на показатель выживаемости животных с моделью инфаркта головного мозга. Учитывая особенные свойства плюрипотентных клеток, активно обсуждается возможность дифференцировки введенных производных из ИПСК в функционально активные клетки нервной ткани, что было продемонстрировано в некоторых работах [164,102,92]. При этом стоит отметить, что дифференцировка трансплантированных клеток происходила существенно позже, чем выявлялись первые терапевтические эффекты в группах с клеточной терапией. Данный факт свидетельствует о более вероятном паракринном механизме действия ИПСК-НПК, чем о заместительном. В некоторых исследованиях продемонстрировано действие ИПСК-НПК за счет стимуляции нейропластичности вещества мозга реципиента, неоангиогенеза, подавлении иммунной и воспалительной реакции, глиоза и апоптоза [49,51,116]. Наряду с работами, описывающими положительное влияние трансплантации ИПСК-НПК при модели инфаркта головного мозга, есть также исследования, в которых не выявлялось влияния на регресс очага ишемии [92], что согласуется с результатами нашего исследования. Несмотря на описанные положительные эффекты трансплантации клеток, полученных из ИПСК у животных, в одной работе авторы высказывали опасения по поводу возможного опухолевого перерождения трансплантата (в связи с продолжением активной пролиферации клеток через 1 месяц после введения) [102], что ставит под сомнение перспективы безопасного применения данного типа клеток в клинической практике и требует продолжения накопления знаний о свойствах дифференцированных ИПСК и их взаимодействии с веществом головного мозга после трансплантации в условиях ишемии.

3. Сравнение терапевтической эффективности внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в дозе 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга

На основании результатов предшествующих этапов исследования было выявлено, что наибольшая терапевтическая эффективность наблюдалась при внутривенной трансплантации МСК и ИПСК-НПК в больших дозировках - 2×10^6 клеток, при этом основное влияние клеточная терапия оказала на показатель выживаемости лабораторных животных, перенесших инфаркт головного мозга, и на динамику восстановления неврологических функций, оцененных по шкале mNSS. В связи с тем, что трансплантированные клетки имеют различное происхождение, свойства и предположительно различаются по механизмам действия, научный интерес представляет сравнение эффективности внутривенного применения МСК и ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток крысам с моделью ишемии головного мозга по вышеуказанным показателям.

3.1 Оценка выживаемости лабораторных животных

При сравнении групп с клеточной терапией МСК и ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток отмечалось различие по показателю смертности выявлялись следующие отличия: в группе с введением 2×10^6 ИПСК-НПК не было зарегистрировано ни одного смертельного случая, в то время как в группе с введением такой же дозы МСК гибель животных происходила в течение первых 12 суток. При оценке выживаемости лабораторных животных методом Каплана Мейера наблюдалось значимое влияние трансплантации 2×10^6 ИПСК-НПК по сравнению с группой с введением 2×10^6 МСК ($p < 0,05$). Кривые выживаемости Каплана-Мейера для исследуемых групп животных представлены на Рис. 13.

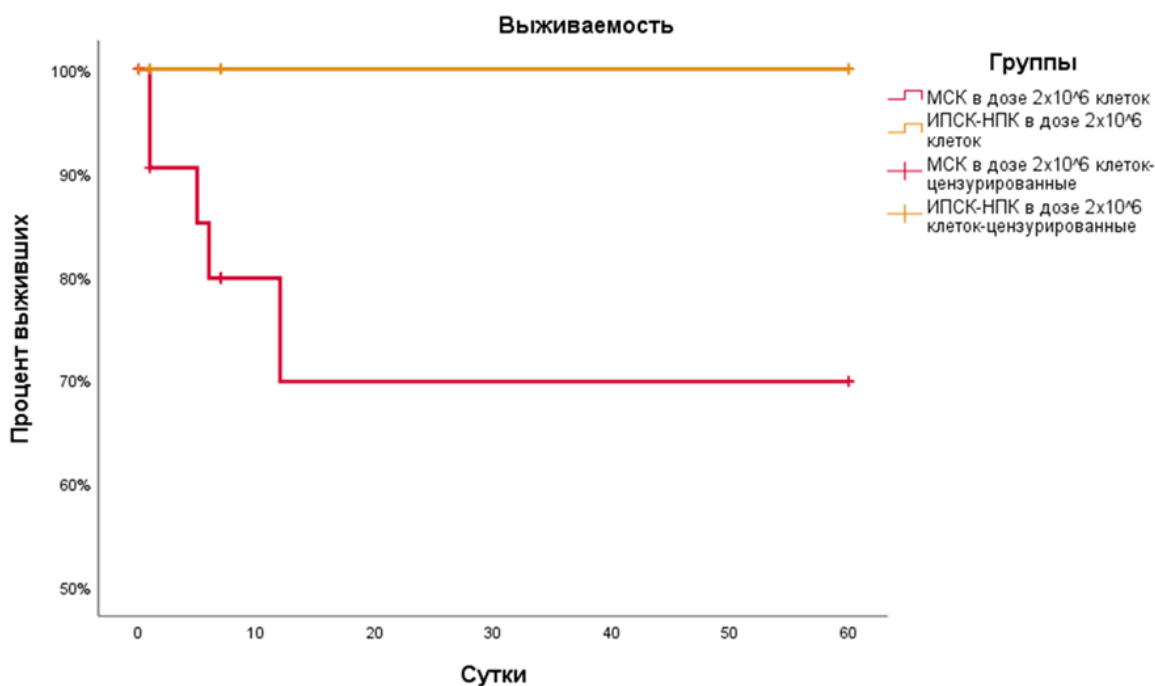


Рис. 13. Кривые выживаемости Каплана-Мейера для исследуемых групп животных на протяжении 60 суток.

Таким образом, можно заключить, что внутривенная трансплантация ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток достоверно влияет на выживаемость лабораторных крыс с моделью острой фокальной ишемией головного мозга по сравнению с группой с трансплантацией такой же дозы МСК.

3.2 Оценка динамики изменения неврологического статуса лабораторных животных

Оценка динамики изменения неврологического дефицита, согласно показателям шкалы mNSS, нормированным к первым суткам, производилась методом общей линейной модели с повторными измерениями. При сравнении полученных данных не отмечалось достоверных отличий между группами с внутривенной трансплантацией МСК и ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток. График динамики регресса неврологического дефицита, оцененного по шкале mNSS, представлен на Рис. 14.

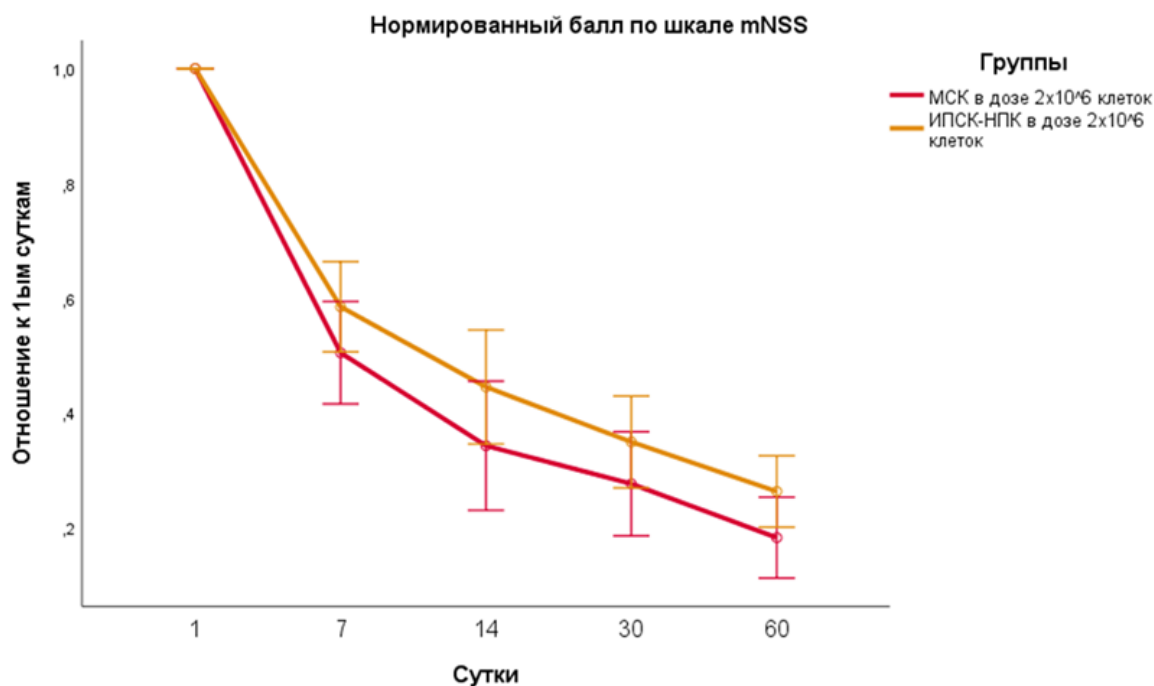


Рис. 14. График динамики изменения объема нормированного к первым суткам показателя неврологического дефицита, оцененного по шкале mNSS, при сроке наблюдения 60 суток. Представлены средние значения и планки доверительного интервала. Достоверно значимых различий между группами выявлено не было.

Таким образом, на основании полученных данных исследования, можно заключить, что внутривенная трансплантация двух различных типов клеток, МСК и ИПСК-НПК, в одинаковой дозе 2×10^6 клеток оказывает равный по выраженности эффект на восстановление неврологического статуса у лабораторных крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга. Однако, только применение ИПСК-НПК в этой дозировке значительно улучшает выживаемость лабораторных животных, в то время как инфузия МСК не оказывает на данный показатель значимого влияния.

Терапевтическая эффективность применения МСК на животных моделях многократно подтверждалась в исследованиях разных авторов, что также послужило основой для некоторых клинических испытаний с участием пациентов, перенесших инсульт [118]. Несмотря на данные некоторых научных работ о возможности трансплантированных МСК

дифференцироваться в нейроподобные клетки *in vivo* [54], подобная трансформация МСК носит ограниченный характер [54], а некоторыми исследователями вовсе ставится под сомнение [47]. Ученые, исследовавшие влияние МСК на церебральные процессы в условиях ишемии головного мозга, сходятся во мнении, что основным механизмом действия МСК является паракринное влияние на вещество головного мозга в области ишемии [129]. Также обсуждается участие трансплантированных МСК в восстановлении ГЭБ в области повреждения вещества головного мозга [188,205].

Ввиду новизны и трудоемкости технологии создания ИПСК, на данный момент исследования влияния ИПСК-НПК на организм реципиента, менее многочисленны, и находятся на доклинической стадии. При этом есть убедительные данные об эффективности применения ИПСК-НПК в экспериментах на моделях неврологических заболеваний у животных, в т. ч. модели инфаркта головного мозга. Ввиду особенностей происхождения и принадлежности к нейрональному ряду ИПСК-НПК, исследователями активно изучается возможность данного типа клеток «приживаться» в головном мозге, образуя зрелые нейроны и функциональные связи [116][164][206]. Тем не менее, учитывая выраженное терапевтическое действие трансплантированных ИПСК-НПК сразу после введения при отсроченной дифференцировке трансплантированных клеток *in vivo*, предположительно, имеет место паракринное влияние трансплантата на организм реципиента, также как в случае с клеточной терапией МСК [116]. Согласно результатам настоящего исследования, эффективность влияния внутривенной трансплантации МСК и ИПСК-НПК в равных дозах на динамику восстановления неврологического дефицита в условиях ишемии головного мозга не различалась, из чего можно заключить, что есть схожие по выраженности и направлению механизмы действия у разных типов трансплантированных клеток. Однако, выявленное значимое влияние ИПСК-НПК на выживаемость крыс, вероятно, обусловлено другими механизмами

действия данного типа клеток, что требует дальнейшего изучения. Имеющееся ограниченное количество информации об особенностях взаимодействия ИПСК-НПК с клетками организма реципиента, а также возможная тератогенность клеток, полученных модификацией вирусными векторами, выявленная в некоторых исследованиях [102], не позволяет транслировать трансплантацию ИПСК-НПК в клиническую практику на данный момент. Ввиду того, что МСК просты в получении, не иммуногены, не онкогенны и оказывают выраженный терапевтический эффект на состояние организма реципиента, данный тип клеток является наиболее предпочтительным для дальнейшего применения в клинической практике.

4. Распределение клеток после внутривенной трансплантации

4.1 Распределение МСК после внутривенной трансплантации

Было исследовано распределение МСК в головном мозге при внутривенной трансплантации крысам с моделью инфаркта головного мозга. С целью визуализации клеток трансплантата в веществе головного мозга при помощи МРТ и гистологического исследования предварительно при приготовлении клеточной суспензии была использована двойная метка: микрочастицы оксида железа (SPIO) в конъюгации с флуоресцентными красителями (зеленый белок Dragon Green (GFP) и липофильный мембранный красный краситель PKH 26). Все животные после воспроизведения модели инфаркта головного мозга разделяли на группы для оценки распределения меченых МСК при внутривенной трансплантации в головном мозге по данным МРТ:

1. Группа крыс с введением меченых МСК в дозе 5×10^5 клеток (n=7);
2. Группа крыс с введением меченых МСК в дозе 2×10^6 клеток (n=14).

До клеточной трансплантации проводилось МР-исследование головного мозга животного. Затем устанавливался внутрисосудистый катетер в правую бедренную вену, подключенный к шприцу с клеточной суспензией, после чего крыса помещалась в гентри МР-томографа снова. Внутривенная клеточная трансплантация осуществлялась при помощи микроинжектора со

скоростью 250 мкл/мин. Распределение клеток в головном мозге при одновременной внутривенной трансплантации оценивали при помощи динамического МР-сканирования в режиме реального времени с получением изображений, взвешенных по магнитной восприимчивости (на основе импульсной последовательности SWI TR/TE/FA=50/19,1/15 толщиной 0,5 мм) и временем одной фазы 7 минут.

Для оценки особенностей распределения меченых МСК при внутривенной трансплантации в дозировке 5×10^5 клеток производили выведение из эксперимента животных через 2 часа (n=3), 24 часа (n=2) и 7 суток (n=2) после клеточной инфузии для проведения гистологического исследования.

При проведении внутривенной трансплантации МСК в дозировке 5×10^5 клеток у 1 крысы из 7 выявлялись единичные зоны гипоинтенсивного сигнала при исследовании головного мозга с помощью МРТ в режиме SWI, соответствующие единичным скоплениям меченых МСК через 1 час после введения. При этом у других животных не было зафиксировано присутствие меченых МСК в головном мозге по данным МРТ в режиме реального времени в течение 1 часа после трансплантации. Через 24 часа (а также через 7 суток) после внутривенной трансплантации меченые клетки по данным МРТ в головном мозге не визуализировались (Рис. 15).

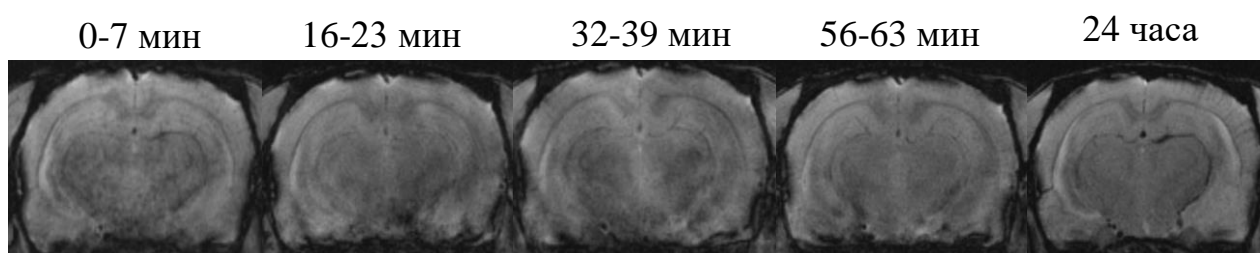


Рис. 15. Примеры изображений МРТ головного мозга крыс в режиме реального времени, полученные в процессе внутривенной трансплантации меченых МСК в дозе 5×10^5 клеток. Представлены МР-изображения в SWI-режиме в аксиальной проекции в динамике в различные промежутки

времени: от 0 до 63 минут, а также через 24 часа после трансплантации. Меченные микрочастицами оксида железа (SPIO) МСК не визуализируются.

При проведении гистологического исследования образцов головного мозга животных данной экспериментальной группы меченные двойной меткой МСК визуализировались в единичном количестве (Рис. 16).

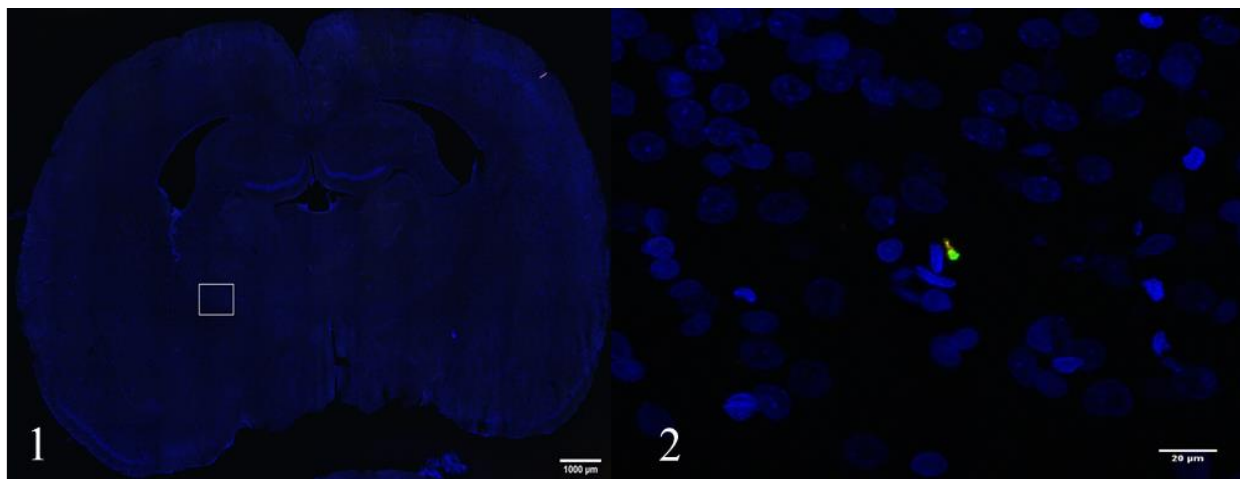


Рис. 16. Визуализация МСК в ткани головного мозга крысы через 2 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 клеток. Данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: 1 – панорамное изображение головного мозга; белым прямоугольником отмечена область, в которой детектировалась меченная клетка; масштабный отрезок равен 1000 мкм. На изображении 2 визуализируется клетка, несущая двойную метку: зеленая флюоресценция соответствует микрочастицам SPIO (GFP), красно-оранжевая флюоресценция - липофильному мембранному красителю PKH 26. Ядра докрашены DAPI; масштабный отрезок равен 20 мкм.

Единичное количество трансплантированных МСК в головном мозге или их отсутствие может быть связано с фильтрацией основной массы клеток паренхиматозными органами при их прохождении по малому и большому кругам кровообращения. Дополнительно для подтверждения данной гипотезы было проведено гистологическое исследование образцов ткани

паренхиматозных органов. По данным конфокальной микроскопии при внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 клеток были визуализированы меченые клетки в ткани легкого (Рис. 17). Также детектировались скопления отдельных частиц SPIО в печени (Рис. 18).

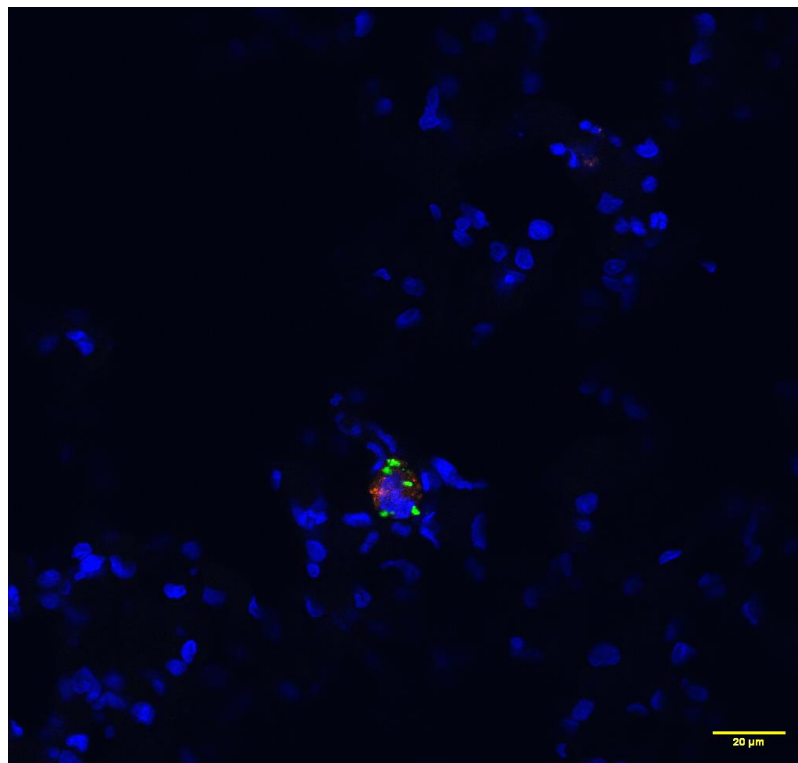


Рис. 17. Визуализация МСК в ткани легкого крысы через 2 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 клеток. Данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: зеленая флюоресценция соответствует SPIО (GFP) меченым МСК, красно-оранжевая флюоресценция - липофильному мембранному красителю РКН 26. Ядра докрашены DAPI. Масштабный отрезок равен 20 мкм.

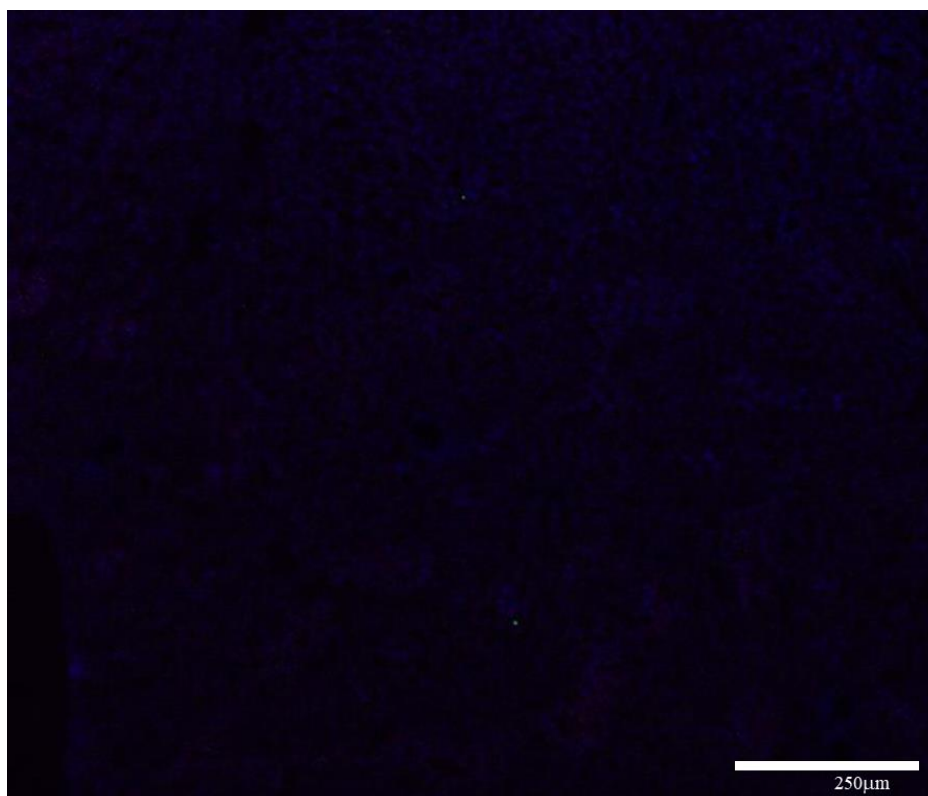


Рис. 18. Визуализация частиц SPIO в ткани печени крысы через 2 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 клеток. Данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: зеленая флюоресценция соответствует частицам SPIO(GFP), ядра докрашены DAPI. Масштабный отрезок равен 250 мкм.

Определение в ткани печени только одной флуоресцентной метки (SPIO+GFP) может свидетельствовать о разрушении трансплантированных клеток в кровотоке или непосредственно в органе. Проходя такую фильтрацию, небольшая доза трансплантируемых МСК, вероятнее всего, задерживается на периферии, в то время как до мозга могут доходить лишь единичные клетки ниже порога детектируемых значений. Подобную задержку в периферических органах, прежде всего в легких, основной массы трансплантированных стволовых клеток при внутривенном введении продемонстрировали и другие авторы [97,225].

При гистологическом исследовании образцов селезенки и почки крысы спустя 2 часа после внутривенного введения 5×10^5 меченых МСК не было

выявлено ни одной клетки. Данные конфокальной микроскопии представлены на Рис. 19 и 20.

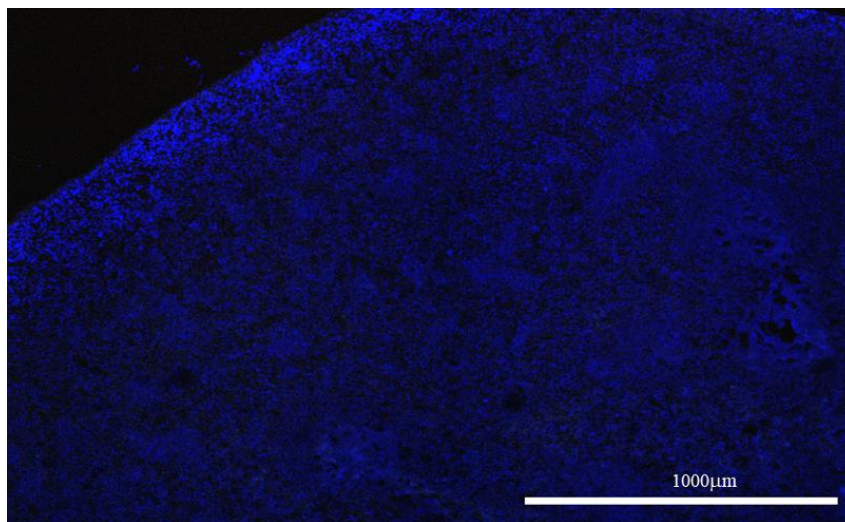


Рис. 19. Данные гистологического исследования ткани селезенки через 2 часа после внутривенной трансплантации 5×10^5 МСК. Ядра докрашены DAPI. Меченые клетки не визуализируются. Масштабный отрезок равен 1000 мкм.

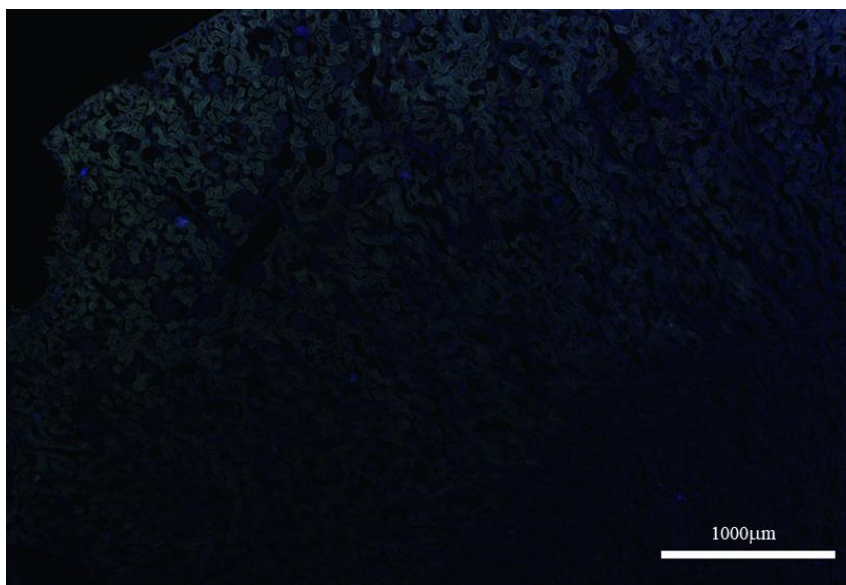


Рис. 20. Данные гистологического исследования ткани почки через 2 часа после внутривенной трансплантации 5×10^5 МСК. Ядра докрашены DAPI. Меченые клетки не визуализируются. Масштабный отрезок равен 1000 мкм.

Через 24 часа и 7 суток после внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 клеток при гистологическом исследовании меченые клетки в головном мозге не визуализировались. При этом меченые МСК детектировались в образцах ткани легких и печени. Данные конфокальной микроскопии представлены на Рис. 21 и 22.

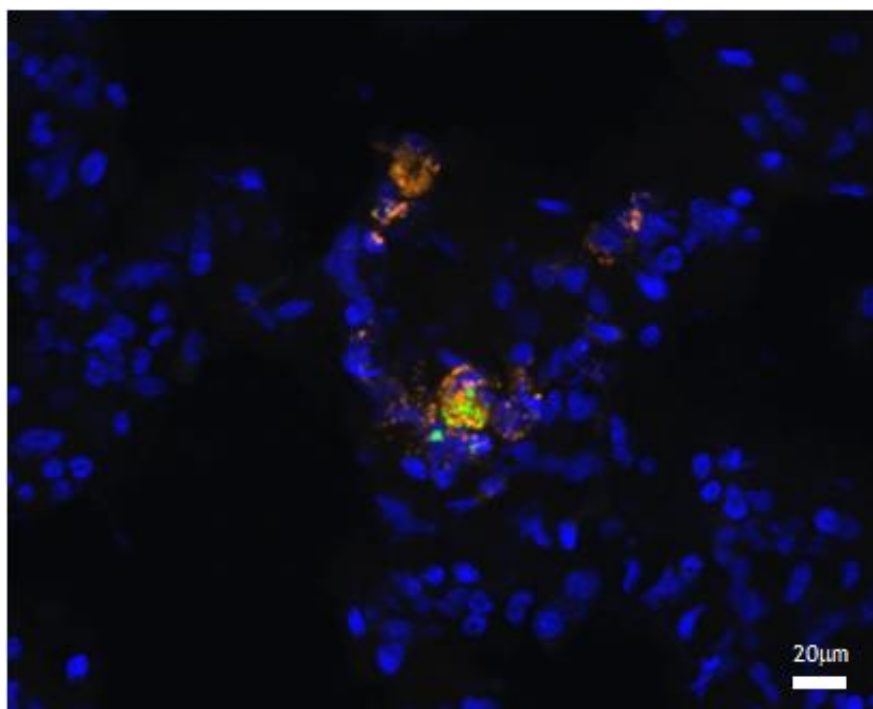


Рис. 21. Визуализация МСК в ткани легкого крысы через 24 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 клеток. Данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: зеленая флюоресценция соответствует SPIO (GFP) меченым МСК, красно-оранжевая флюоресценция - липофильному мембранному красителю PKH 26. Ядра докрашены DAPI. Масштабный отрезок равен 20 мкм.

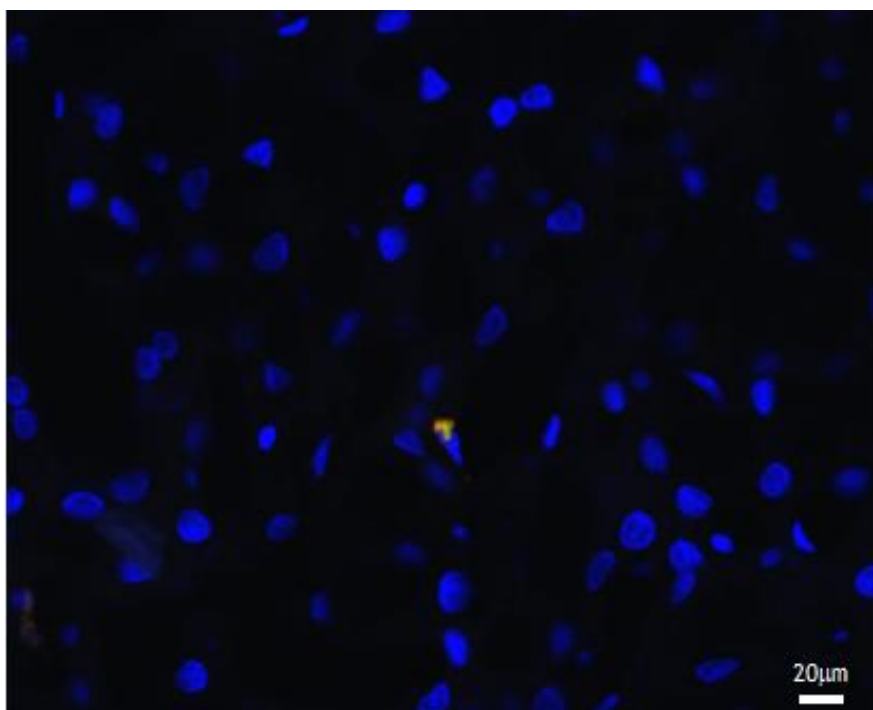


Рис. 22. Визуализация МСК в ткани печени крысы через 24 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 клеток. Данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: зеленая флюоресценция соответствует SPIO (GFP) меченым МСК, красно-оранжевая флюоресценция - липофильному мембранному красителю PKH 26. Ядра докрашены DAPI. Масштабный отрезок равен 20 мкм.

Несмотря на крайне малое количество МСК, проходящее через церебральные сосуды, при трансплантации 5×10^5 клеток, как было нами показано выше, клеточная терапия в такой малой дозе все же оказывает положительное терапевтическое действие на течение инфаркта головного мозга у крыс.

На следующем этапе нашей работы были изучены особенности распределения МСК в головном мозге крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга после внутривенной трансплантации 2×10^6 клеток ($n=14$). На протяжении времени трансплантации МСК, а также в течение 1 часа после введения непрерывно проводили МР-сканирование в режиме SWI с получением изображений взвешенных по магнитной восприимчивости. Повторное МР-сканирование головного мозга через 24 часа и 7 суток после

введения клеток также проводили в режиме SWI высокого разрешения. Этот режим является наиболее чувствительным для регистрации сигнала от метки СПИО в клетках, что позволяет визуализировать даже единичные скопления меченых МСК. Пример характера распределения МСК в дозе 2×10^6 клеток при внутривенном введении крысе с моделью инфаркта головного мозга по данным МРТ в режиме SWI представлен на Рис. 23. На сроках 2 часа и 24 часа после клеточной трансплантации данные МРТ были верифицированы при помощи гистологического исследования.

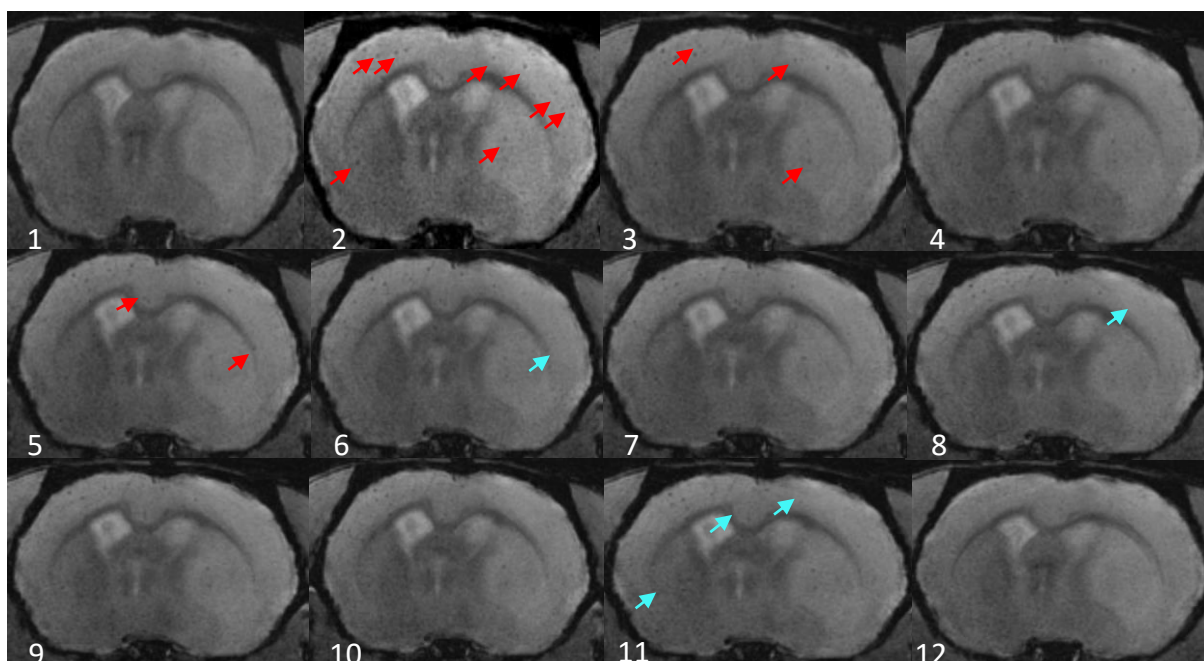


Рис. 23. На рисунке изображены примеры МР изображений одного среза головного мозга в режиме SWI, полученные в течение 1 часа с начала введения МСК в дозе 2×10^6 клеток. 1 - начало трансплантации, МСК в веществе головного мозга не определяются. На изображениях 2-11 определяются зоны гипоинтенсивного сигнала, соответствующие скоплению МСК, меченных микрочастицами оксида железа (красные стрелки). В течение срока сканирования отмечается появление «новых» МСК в различных церебральных структурах и «исчезновение» ранее детектируемых клеток (голубые стрелки). 12-МР-изображение в режиме SWI через 24 часа после клеточной трансплантации, меченые МСК не визуализируются.

При анализе МР-изображений, полученных в режиме реального времени при внутривенном введении МСК было выявлено, что трансплантированные клетки начинают визуализироваться в мозге, начиная с 7-й минуты после начала трансплантации. С течением времени появлялось больше зон гипоинтенсивного сигнала на SWI (накопление клеток) в одних областях, в то время как в других областях сигнал «пропадал», что может свидетельствовать о том, что клетки не задерживались в церебральных структурах, а направлялись с током крови далее по сосудистому руслу. По данным МРТ, максимальное количество МСК в головном мозге детектировалось в течение первого часа после начала трансплантации, а к исходу часа отмечалось уменьшение количества гипоинтенсивных областей, соответствующих сигналу от меченых МСК. Примеры получаемых в динамике МР-изображений в режиме SWI после внутривенной трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток представлены на Рис. 24.

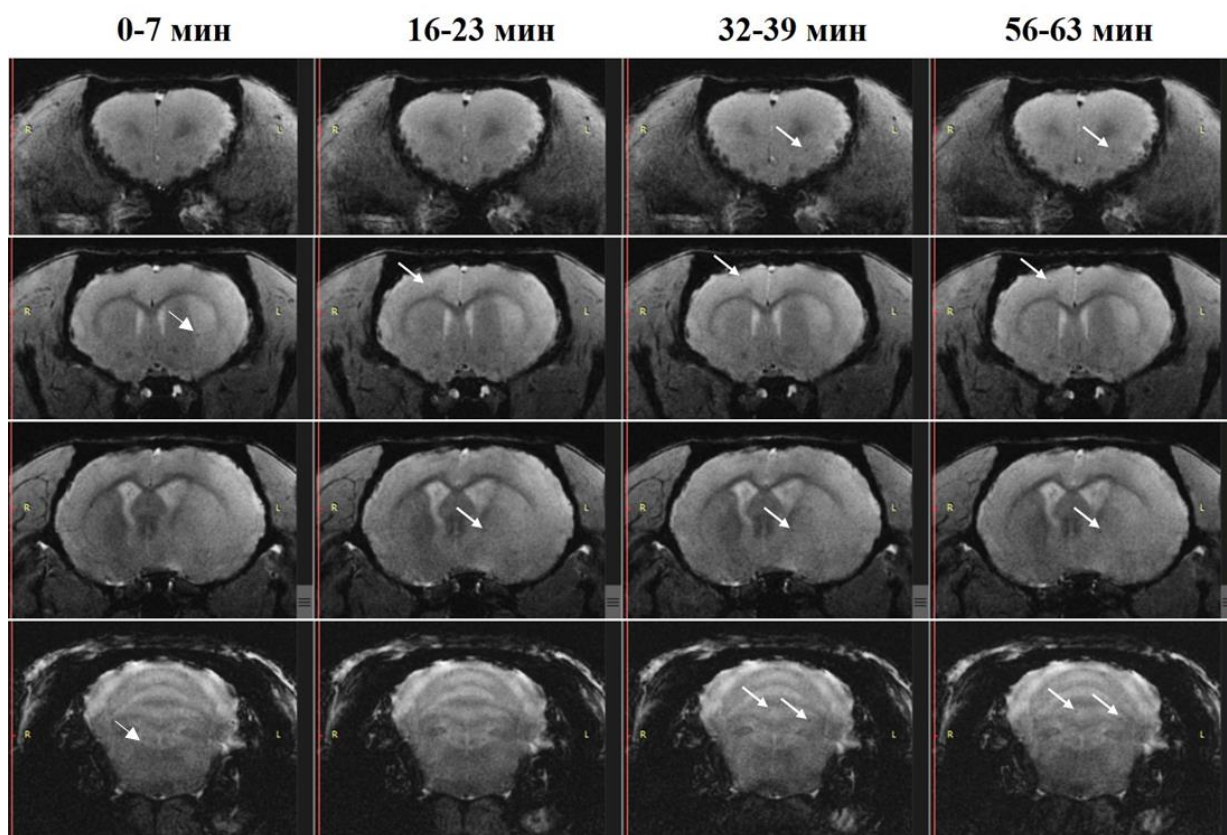


Рис. 24. Примеры данных МРТ головного мозга крыс, полученные в процессе внутривенной трансплантации меченых МСК в дозе 2×10^6 клеток. Представлены МР-изображения в SWI-режиме в аксиальной проекции в

динамике в различные промежутки времени: от 0 до 63 минуты. Белые стрелки указывают на гипоинтенсивные области, которые соответствуют местам скопления SPIO-меченных МСК.

Стоит отметить, что распределение МСК в веществе головного мозга носит диффузный характер: клетки детектировались в стволе мозга, мозжечке, в области подкорковых структур (таламуса, стриатума, белого шара и др.), а также в области гиппокампа и неокортекса как в ипсилатеральном очагу инфаркта, так и в контралатеральном полушарии. В области очага ишемии отмечалось относительно меньшее по количеству накопление МСК, что вероятно связано с локальным отеком вещества головного мозга. Пример МР-изображений распределения в головном мозге крысы трансплантированных МСК в соответствии с атласом анатомии лабораторных крыс Scalable Atlas Brain [33] представлен на Рис. 25.

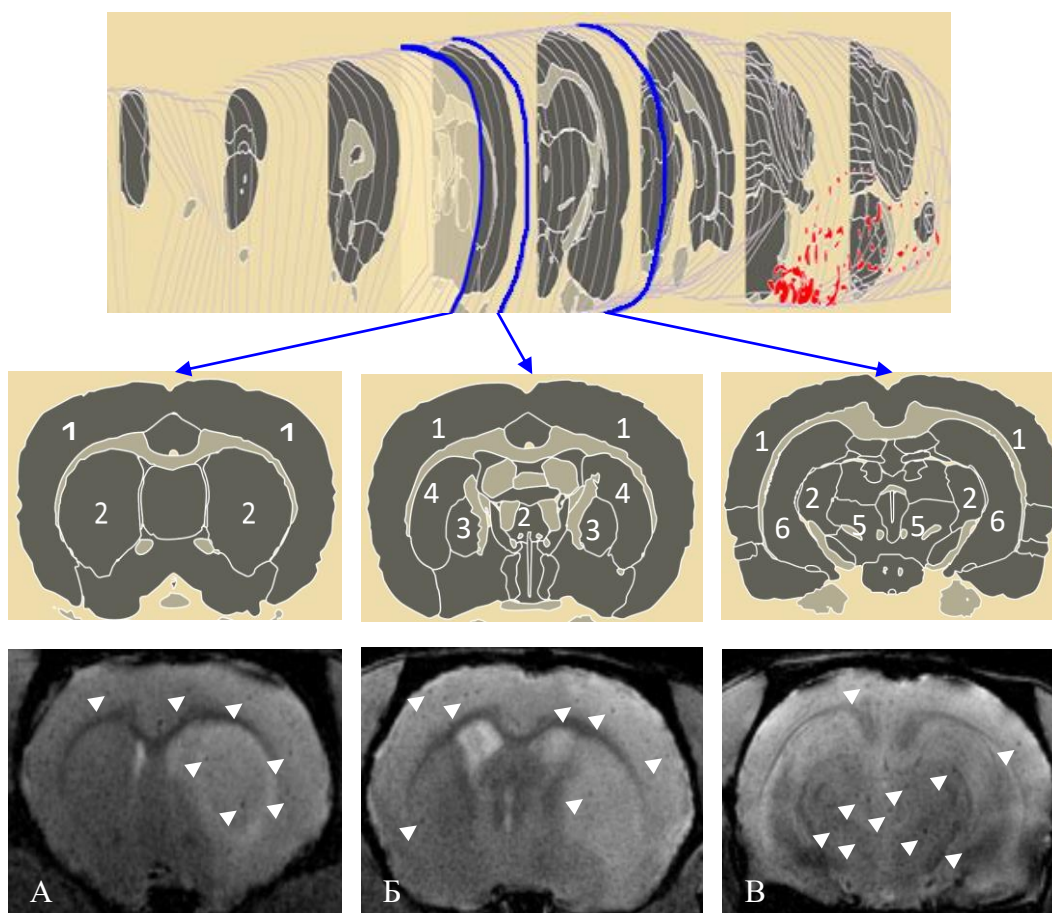


Рис. 25. На рисунке представлены МР-изображения фронтального среза головного мозга крысы, полученные в режиме SWI, в соответствии с

иллюстрациями структур головного мозга крыс Scalable Atlas Brain [33]. На МР-изображениях участки гипоинтенсивного сигнала соответствуют скоплениям меченных микрочастицами оксида железа МСК, трансплантированных внутривенно. А – срез на уровне таламуса. Б - срез на уровне подкорковых структур. В - срез на уровне ствола головного мозга. Трансплантированные МСК (отмечены белыми стрелками) визуализируются в следующих церебральных структурах: 1-неокортекс, 2-таламус, 3-бледный шар, 4-стриатум, 5-ствол мозга, 6-гипокамп.

При контрольном МР-сканировании головного мозга лабораторных животных через 24 часа и 7 суток после клеточной трансплантации меченные микрочастицами оксида железа МСК не визуализировались.

Для оценки особенностей распределения меченых МСК при внутривенной трансплантации в дозировке 2×10^6 клеток производили выведение из эксперимента животных через 2 часа ($n=9$), 24 часа ($n=3$) и 7 суток ($n=2$) после клеточной инфузии для проведения гистологического исследования. По данным гистологического исследования меченные флуоресцентными метками МСК визуализировались в препаратах головного мозга крыс с моделью инфаркта мозга в единичном количестве в обоих полушариях через 2 часа после внутривенной трансплантации (Рис. 26). Через 24 часа и 7 суток после введения трансплантированных клеток в образцах головного мозга обнаружено не было.

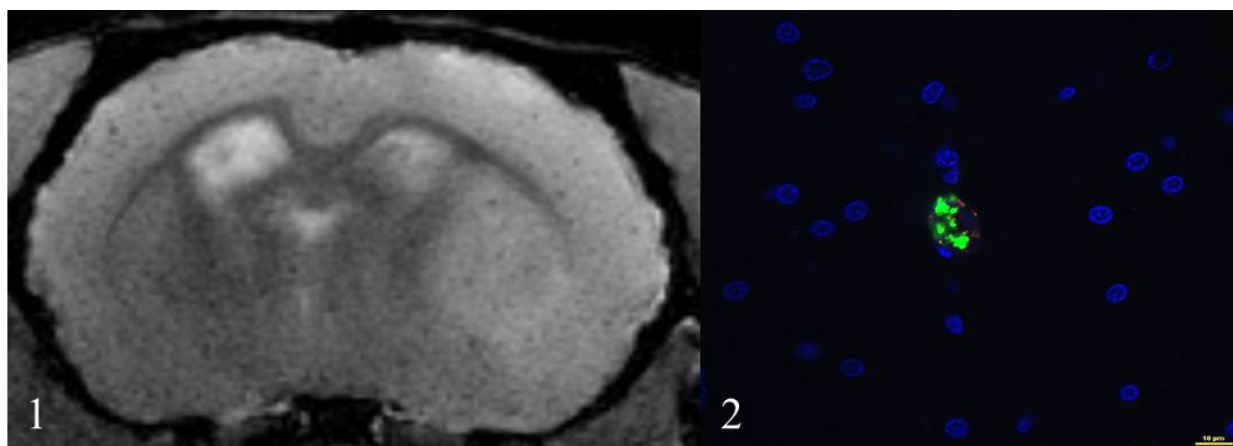


Рис. 26. Визуализация МСК в головном мозге лабораторных крыс через 2 часа после внутривенной трансплантации в дозе 2×10^6 клеток. Представлены данные МРТ головного мозга крыс (1) и данные гистологического исследования (2). 1 - на МР-изображениях в режиме SWI визуализируются участки гипоинтенсивного сигнала, соответствующие скоплениям SPIO-меченных МСК. 2 - данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: зеленая флюоресценция соответствует SPIO-меченым клеткам (GFP), красно-оранжевая - липофильному мембранному красителю PKH 26, синяя - ядерному красителю DAPI. На микрофотографии визуализируется единичная клетка, несущая двойную метку. Масштабный отрезок составляет 10 мкм.

Как и в случае с трансплантацией 5×10^5 МСК, для определения локализации МСК при внутривенном введении 2×10^6 клеток дополнительно проводилось гистологическое исследование образцов паренхиматозных органов: легких, печени, селезенки, почек через 2 часа после трансплантации. При конфокальной микроскопии образцов ткани легких были выявлены в большом количестве трансплантированные МСК, которым соответствовал флуоресцентный сигнал в зеленом (SPIO+GFP) и красном (PKH 26) спектре. Также МСК с двойной меткой были обнаружены в ткани печени. В образцах ткани селезенки и почек были обнаружены депозиты железа из трансплантированных клеток. Примеры визуализации трансплантированных внутривенно МСК в дозе 2×10^6 клеток в ткани паренхиматозных органов по данным гистологии представлены на Рис. 27-31.

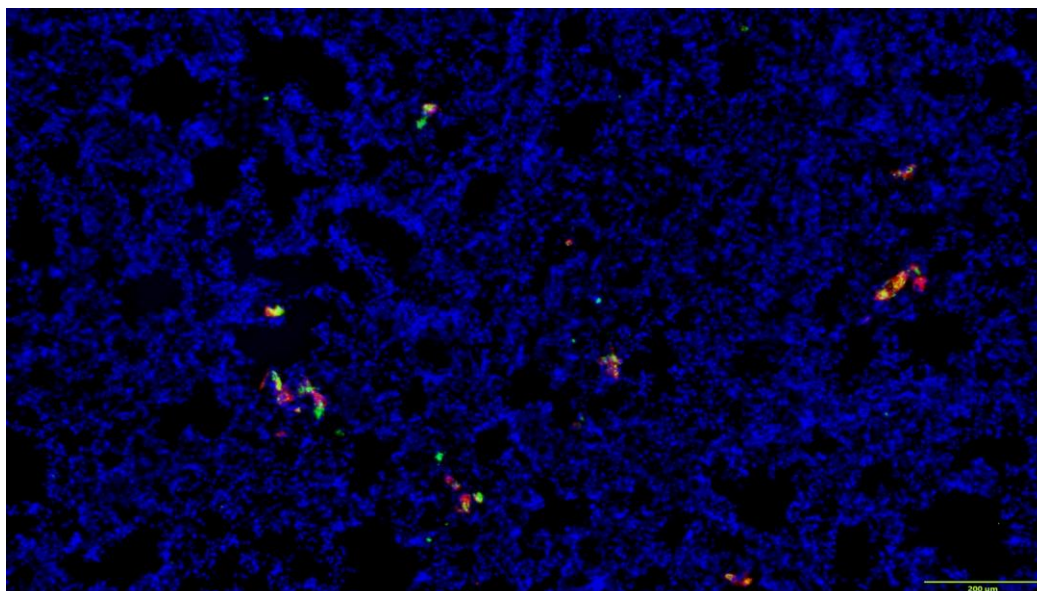


Рис. 27. Визуализация МСК в ткани легкого через 2 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток по данным конфокальной микроскопии. Зеленая флюоресценция соответствует GFP, красно-оранжевая - РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируются группы клеток, несущих двойную метку. Масштабный отрезок составляет 200 мкм.

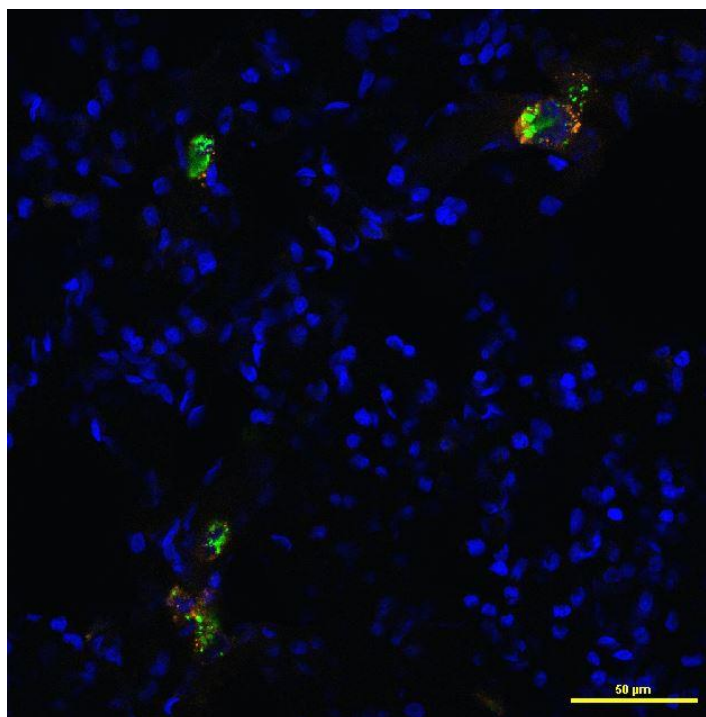


Рис. 28. Визуализация МСК в ткани легкого через 2 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток по данным конфокальной микроскопии. Зеленая флюоресценция соответствует GFP, красно-оранжевая

- РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируются группы клеток, несущих двойную метку. Масштабный отрезок составляет 50 мкм.

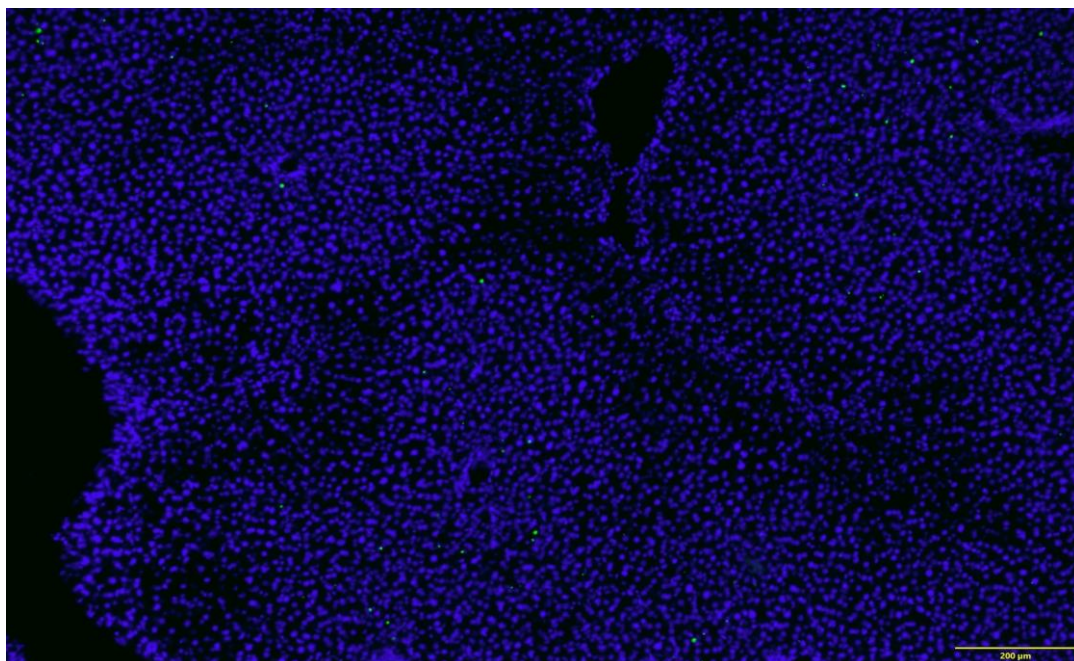


Рис. 29. Визуализация частиц SPIO (GFP) в ткани печени крысы через 2 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток. Данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: зеленая флюоресценция соответствует частицам SPIO, конъюгированным с зеленым флюоресцентным белком Dragon green. Ядра докрашены DAPI. В ткани печени визуализируются скопления частиц, обладающих зеленой флюоресценцией. Масштабный отрезок равен 200 мкм.

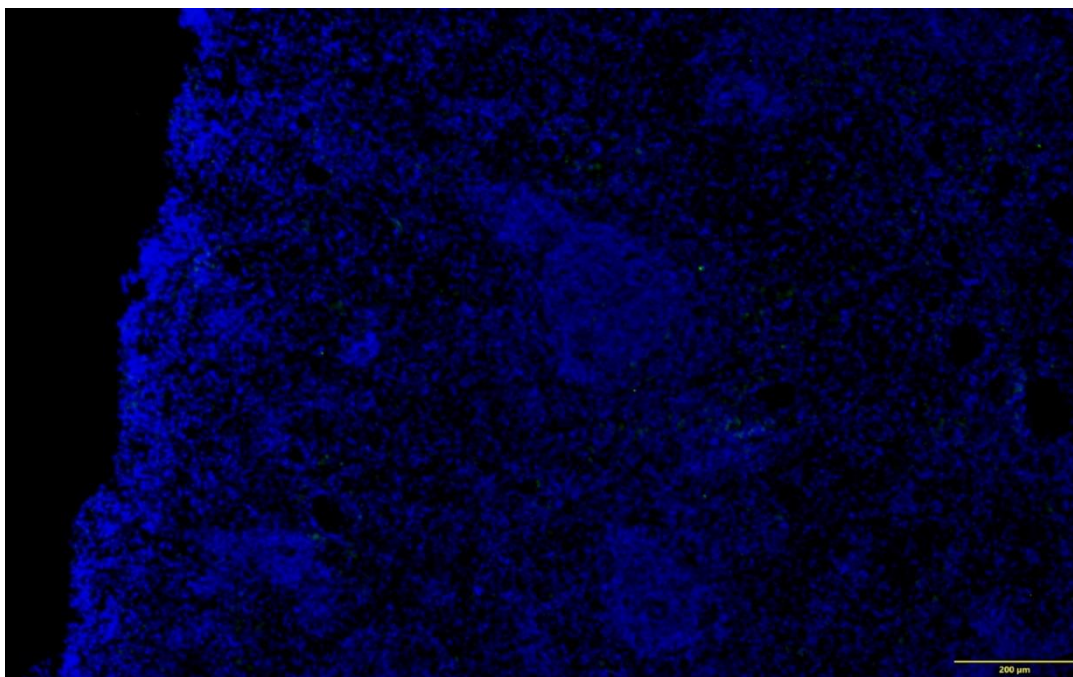


Рис. 30. Визуализация частиц SPIO (GFP) в ткани селезенки крысы через 2 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток. Данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: зеленая флюоресценция соответствует частицам SPIO, конъюгированным с зеленым флюоресцентным белком Dragon green. Ядра докрашены DAPI. В ткани печени визуализируются скопления частиц, обладающих зеленой флюоресценцией. Масштабный отрезок равен 200 мкм.

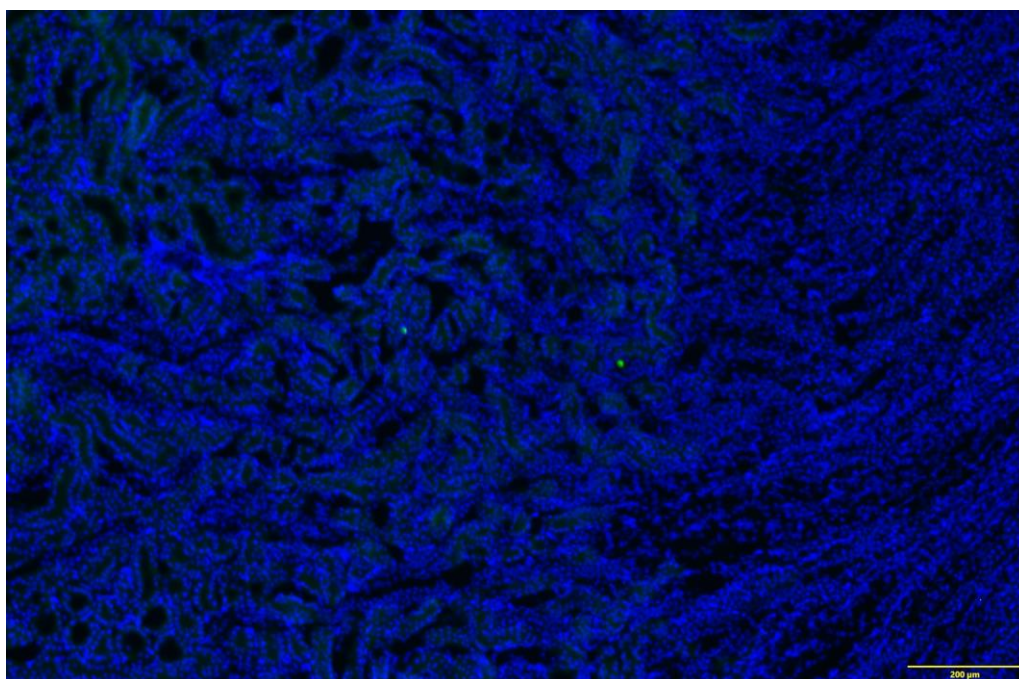


Рис. 31. Визуализация частиц SPIO (GFP) в ткани почки крысы через 2 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток. Данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: зеленая флюоресценция соответствует частицам SPIO, конъюгированным с зеленым флуоресцентным белком Dragon green. Ядра докрашены DAPI. В ткани почки визуализируются частицы SPIO (GFP). Масштабный отрезок равен 200 мкм.

При гистологическом исследовании препаратов головного мозга не было обнаружено меченых клеток спустя 24 часа и 7 суток после внутривенной трансплантации 2×10^6 меченых МСК. При этом в образцах ткани легкого и печени регистрировались клетки в единичном количестве через 24 часа после клеточной инфузии. Данные конфокальной микроскопии представлены на Рис. 32 и 33.

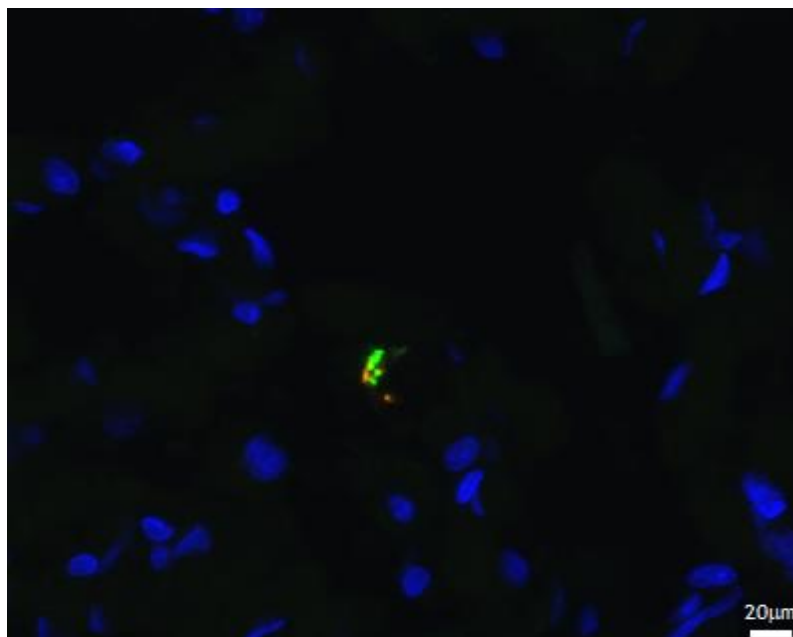


Рис. 32. Визуализация МСК в ткани легкого через 24 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток по данным конфокальной микроскопии. Зеленая флюоресценция соответствует GFP, красно-оранжевая - РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируются группы клеток, несущих двойную метку. Масштабный отрезок составляет 20 мкм.

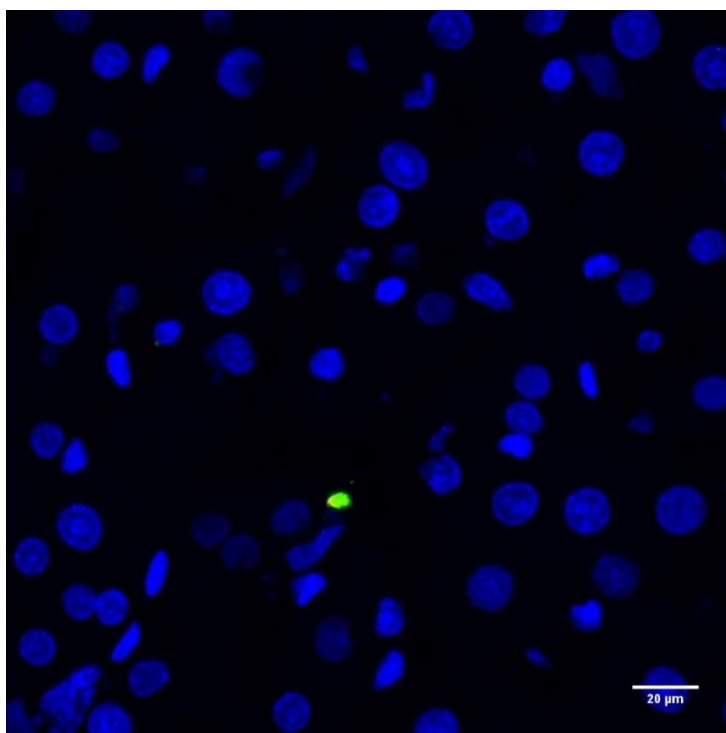


Рис. 33. Визуализация МСК в ткани печени через 24 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток по данным конфокальной микроскопии. Зеленая флюоресценция соответствует GFP, красно-оранжевая - РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируется клетка, несущая двойную метку Масштабный отрезок составляет 20 мкм.

Таким образом, при внутривенном введении МСК в дозе 2×10^6 клеток небольшое, однако детектируемое количество трансплантированных клеток, визуализируется в головном мозге по данным МРТ, что также подтверждается данными гистологического исследования. При этом распределение трансплантированных клеток происходит по обоим полушариями головного мозга и носит диффузный характер. Наибольшее количество трансплантированных МСК в головном мозге детектируется в течение 1-2 часов после трансплантации, однако, клетки не задерживаются в головном мозге не более чем 24 часа, после чего элиминируются. Помимо визуализации в головном мозге, так же как и в случае трансплантации 5×10^5 клеток, при введении МСК в дозе 2×10^6 меченые клетки определялись в паренхиматозных органах, что подтверждают данные других исследователей

[197,163]. Наибольшее их количество детектировалось в легких. При этом, по сравнению с введением клеток в меньшей дозировке, в данном случае визуально количество клеток в ткани легкого было больше.

4.2 Распределение ИПСК-НПК при внутривенной трансплантации

Дополнительно было проведено гистологическое исследование образцов мозга и паренхиматозных органов при внутривенном введении меченных флуоресцентным красителем РКН 26 ИПСК-НПК в дозе 5×10^5 ($n=6$) и 2×10^6 ($n=9$) клеток крысам с моделью экспериментального инфаркта головного мозга. В исследуемой группе с трансплантацией 5×10^5 клеток крыс подвергали эвтаназии для последующего проведения гистологического исследования на следующих сроках: через 2 часа ($n=2$), 24 часа ($n=2$) и 7 суток ($n=2$) после клеточной инфузии. По данным конфокальной микроскопии, через 2 часа после внутривенной трансплантации в образцах головного мозга не было выявлено меченых ИПСК-НПК. В то же время визуализировались меченые клетки в тканях легкого, печени, почки и селезенки (Рис. 34-37).

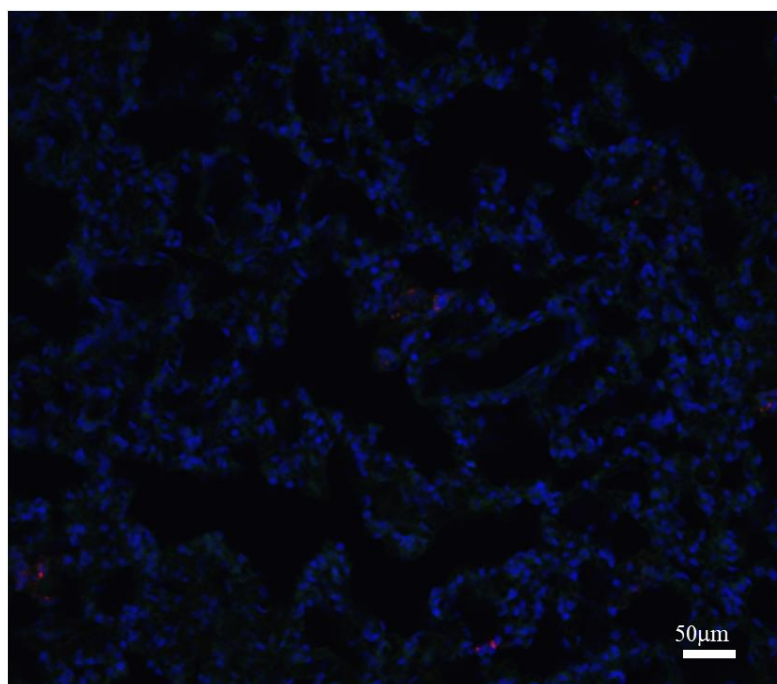


Рис. 34. Визуализация клеток в ткани легкого через 2 часа после внутривенной трансплантации меченных РКН 26 5×10^5 ИПСК-НПК по

данным конфокальной микроскопии. Красно-оранжевая флюоресценция соответствует РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируются меченные РКН 26 клетки. Масштабный отрезок составляет 50 мкм.

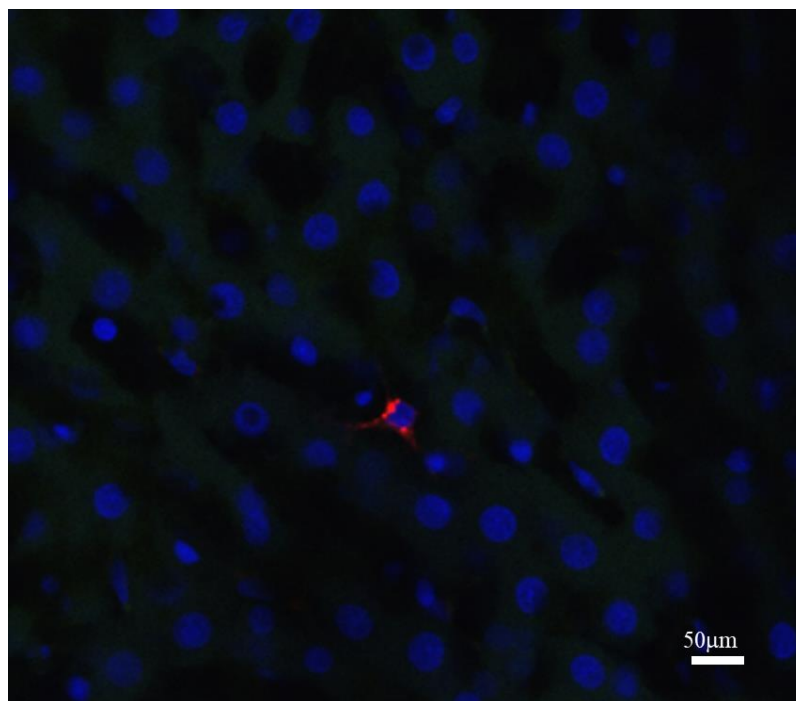


Рис. 35. Визуализация клеток в ткани печени через 2 часа после внутривенной трансплантации меченных РКН 26 5×10^5 ИПСК-НПК по данным конфокальной микроскопии. Красно-оранжевая флюоресценция соответствует РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируются меченные РКН 26 клетки. Масштабный отрезок составляет 20 мкм.

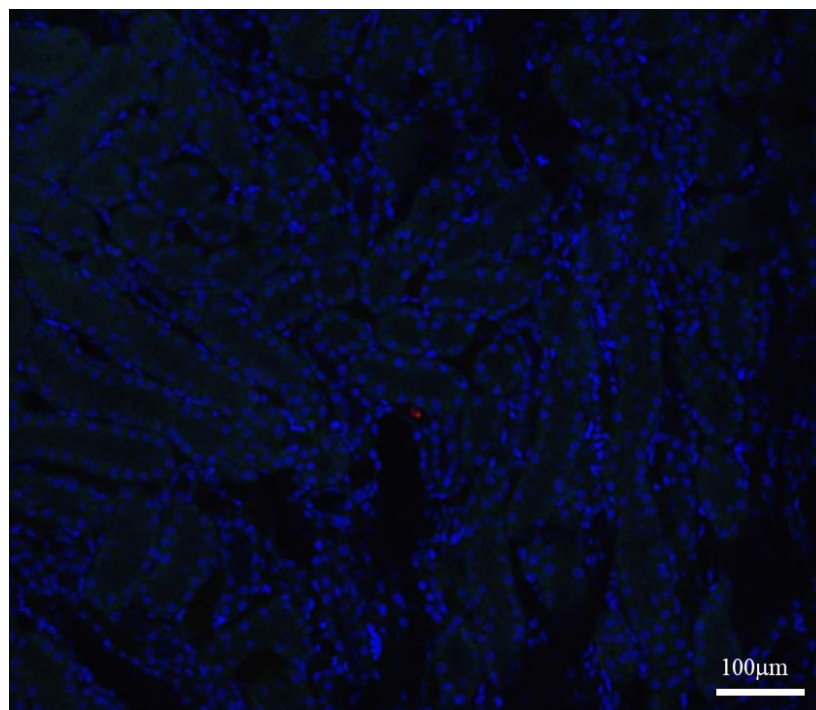


Рис. 36. Визуализация клеток в ткани почки через 2 часа после внутривенной трансплантации меченных РКН $26 \cdot 5 \times 10^5$ ИПСК-НПК по данным конфокальной микроскопии. Красно-оранжевая флюоресценция соответствует РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируются меченные РКН 26 клетки. Масштабный отрезок составляет 100 мкм.

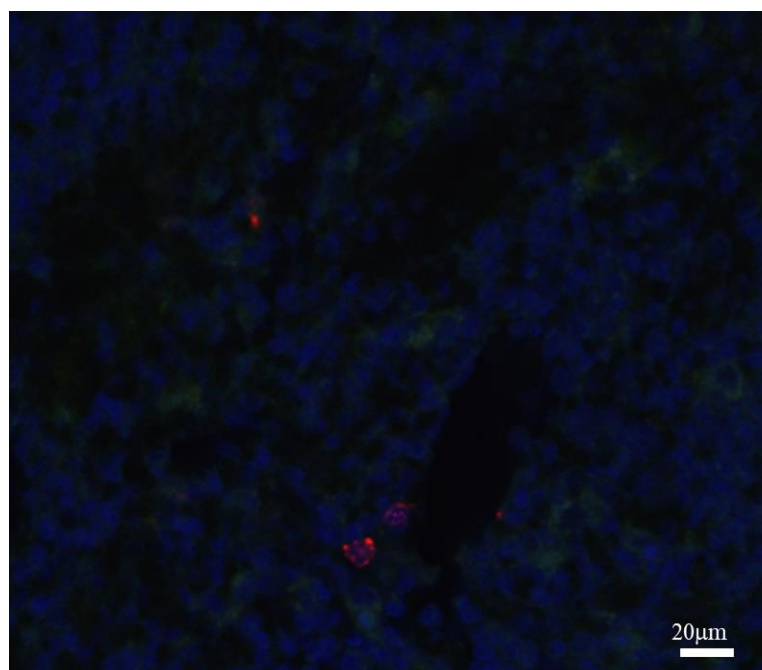


Рис. 37. Визуализация клеток в ткани селезенки через 2 часа после внутривенной трансплантации меченных РКН $26 \cdot 5 \times 10^5$ ИПСК-НПК по

данным конфокальной микроскопии. Красно-оранжевая флюоресценция соответствует РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируются меченные РКН 26 клетки. Масштабный отрезок составляет 20 мкм.

В группе животных с внутривенным введением меченых ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток гистологическое исследование проводилось на следующие сроки: 2 часа (n=2), 24 часа (n=3), 7 суток (n=4) после трансплантации.

По данным гистологического исследования, в препаратах головного мозга ни одного животного не было визуализировано ни одной меченой клетки через 2 часа, 24 часа и 7 суток после трансплантации. Данные конфокальной микроскопии образца головного мозга через 2 часа после внутривенной трансплантации ИПСК-НПК представлены на Рис. 38.

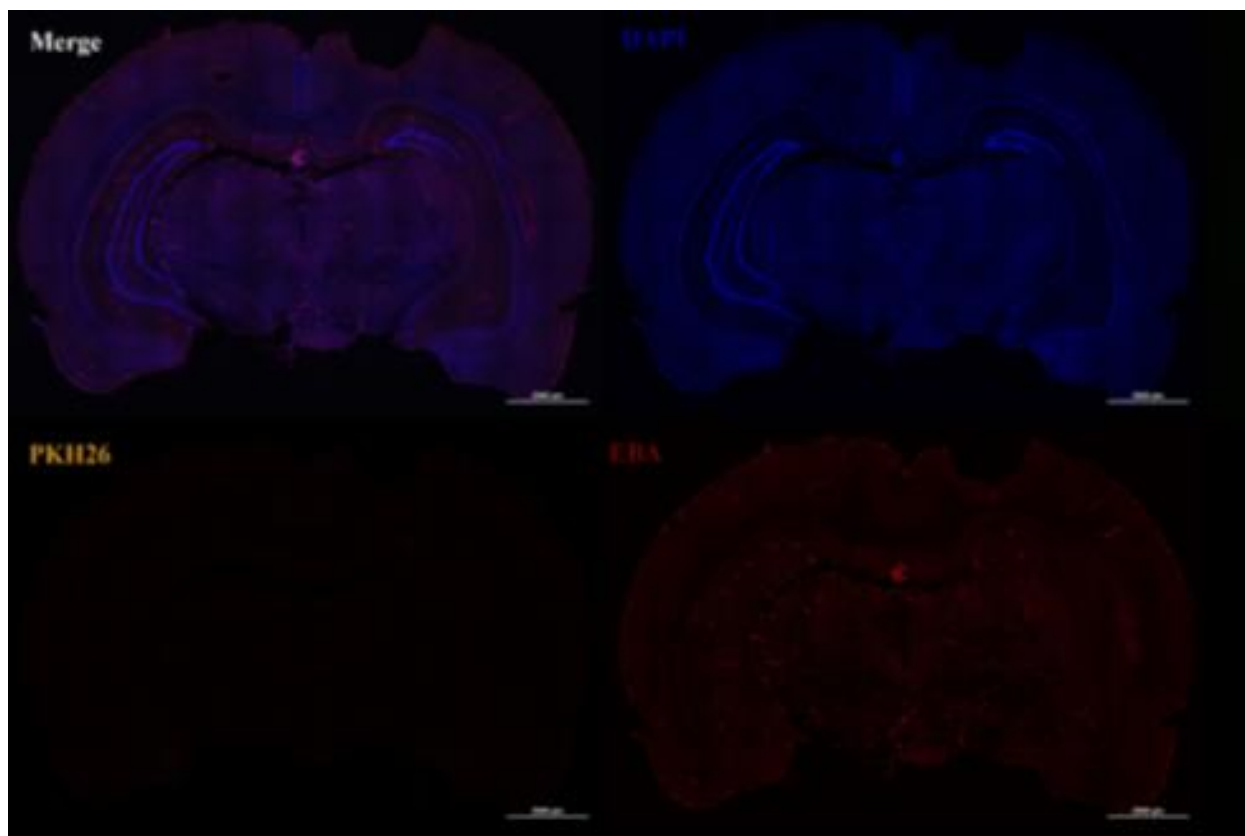


Рис. 38. Визуализация клеток в образцах головного мозга по данным гистологического исследования через 2 часа после внутривенной трансплантации меченных РКН 26 ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток. Данные конфокальной микроскопии, смешанное изображение: красная

флюоресценция –краситель эндотелиально-церебрального барьера ЕВА, синий- ядра докрашены DAPI. Оранжевой флюоресценции РКН 26 не выявлено. Масштабный отрезок составляет 2000 мкм.

В то же время визуализировались скопления меченных РКН 26 ИПСК-НПК в образцах паренхиматозных органов. Данные представлены на Рис. 39.

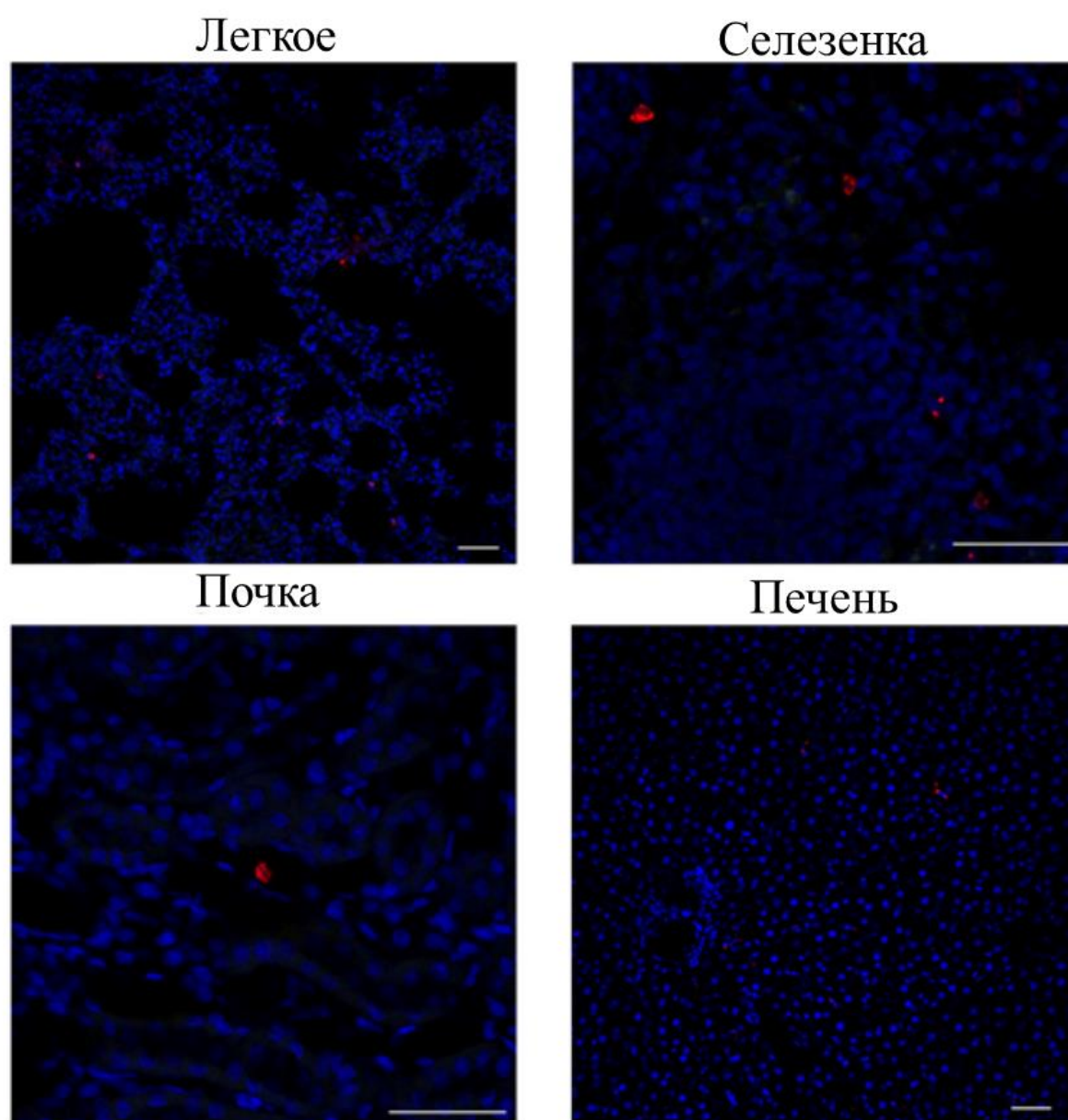


Рис. 39. Визуализация по данным гистологического исследования образцов паренхиматозных органов меченных РКН 26 ИПСК-НПК через 2 часа после внутривенной трансплантации в дозе 2×10^6 клеток. Данные конфокальной

микроскопии, смешанное изображение: красно-оранжевая флюоресценция соответствует липофильному мембранному красителю РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Масштабный отрезок составляет 20 и 100 мкм.

При исследовании образцов паренхиматозных органов через 24 часа после трансплантации ИПСК-НПК по данным конфокальной микроскопии меченые клетки визуализировались в ткани легких, печени, почек и селезенки. Данные представлены на Рис. 40-43.

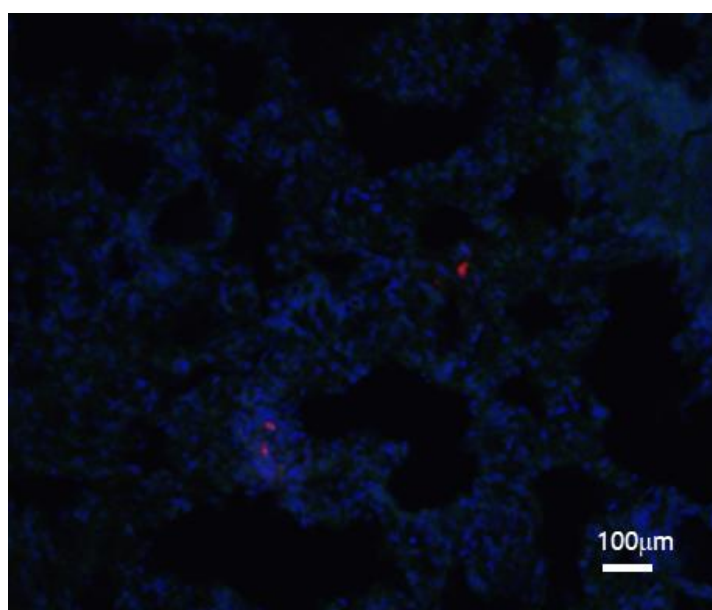


Рис. 40. Визуализация клеток в ткани легкого через 24 часа после внутривенной трансплантации меченных РКН 26 2×10^6 ИПСК-НПК по данным конфокальной микроскопии. Красно-оранжевая флюоресценция соответствует РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируются меченные РКН 26 клетки. Масштабный отрезок составляет 100 мкм.

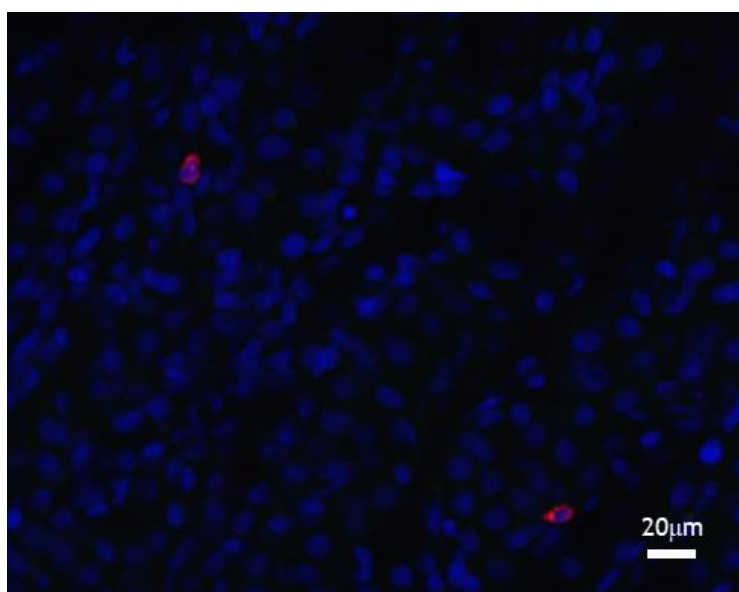


Рис. 41. Визуализация клеток в ткани печени через 24 часа после внутривенной трансплантации меченных РКН 26×10^6 ИПСК-НПК по данным конфокальной микроскопии. Красно-оранжевая флюоресценция соответствует РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируются меченные РКН 26 клетки. Масштабный отрезок составляет 20 мкм.

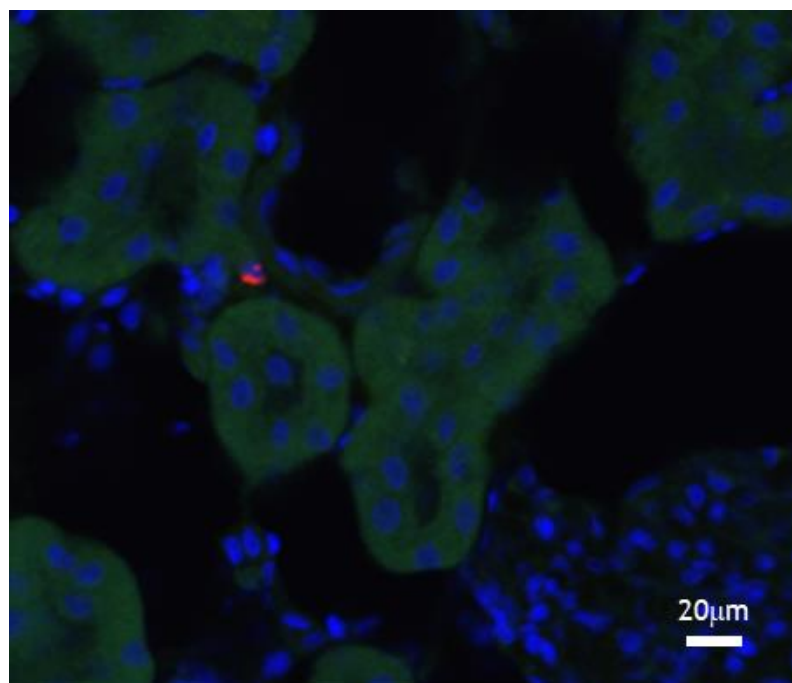


Рис. 42. Визуализация клеток в ткани почки через 24 часа после внутривенной трансплантации меченных РКН 26×10^6 ИПСК-НПК по данным конфокальной микроскопии. Красно-оранжевая флюоресценция

соответствует РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируются меченные РКН 26 клетки. Масштабный отрезок составляет 20 мкм.

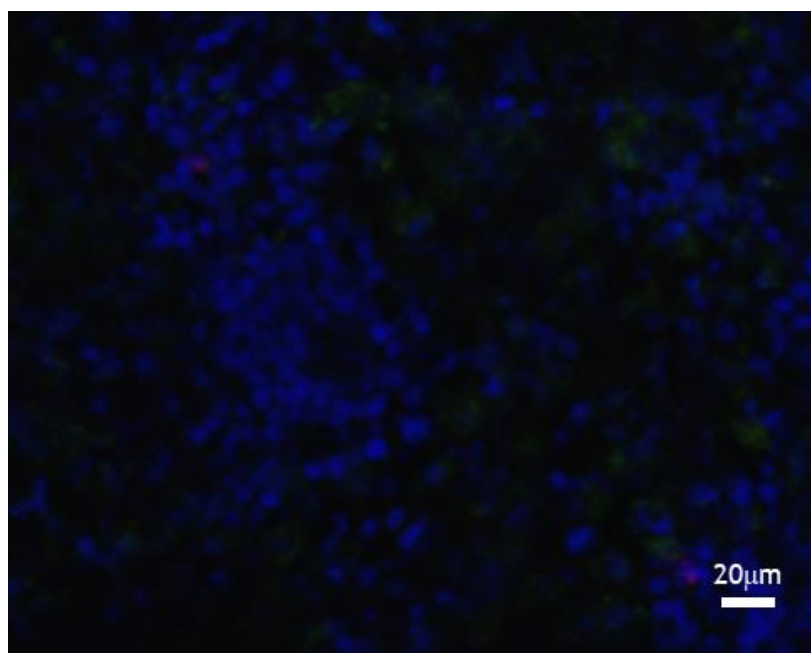


Рис. 43. Визуализация клеток в ткани селезенки через 24 часа после внутривенной трансплантации меченных РКН 26 2×10^6 ИПСК-НПК по данным конфокальной микроскопии. Красно-оранжевая флюоресценция соответствует РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируются меченные РКН 26 клетки. Масштабный отрезок составляет 20 мкм.

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что прижизненная визуализация в головном мозге меченых мезенхимальных стволовых клеток при внутривенной трансплантации с помощью МРТ ограничена порогом возможной детекции МР-томографа, и не показательна для трансплантации малых доз клеток. Вероятно, наряду с малым количеством клеток в трансплантате, это также связано с особенностями внутривенной трансплантации. Введение клеток в периферическую вену подразумевает последующее прохождение ими малого и большого круга кровообращения, что приводит к фильтрации и задержке основной массы клеток в паренхиматозных органах. Первыми такими органами на пути следования клеток являются легкие, где происходит основная фильтрация

трансплантированной клеточной суспензии. При этом с повышением дозы введенных клеток возрастает количество, «осевших» МСК, как это было продемонстрировано при введении 2×10^6 меченых клеток по данным гистологического исследования. Данное наблюдение подтверждает результаты работ других авторов [84,163,161]. Так, например, в исследовании Nose и соавторов (2021) проводилось изучение особенностей распределения несущих радиоактивную метку МСК при трансплантации в периферическую вену у различных лабораторных животных (мыши, крысы, кролики), а также у не человекообразных обезьян по данным позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) [161]. Так же, как и в случае других животных, при введении в хвостовую вену крыс различных доз меченых МСК ($4,6-19,0 \times 10^5$ клеток) по данным ПЭТ регистрировалось повышение активности сигнала радиофармпрепарата в обоих легких, и в меньшей степени – в системе мочевыводящих путей. В то же время при введении меченых МСК в сонную артерию повышение сигнала отмечалось в веществе головного мозга, и не выявлялось в легких. Можно предположить, что наблюдаемая задержка МСК в ткани легкого при внутривенном введении связана с разницей в диаметре клеток трансплантата и просвета сосудов микроциркуляторного русла легких. Известно, что диаметр мезенхимальной стволовой клетки составляет в среднем 26,5 мкм (15-50 мкм) [85], в то время, как диаметр легочных капилляров грызунов составляет 12 мкм [186]. Fischer и соавторы показали, что есть зависимость выраженности задержки трансплантированных клеток тканью легких реципиента от размера введенных клеток [75]. Обладающие наибольшим размером МСК более интенсивно фильтровались тканью легких, чем меньшие по размеру клетки: зрелые мультипотентные прогениторные клетки, моноклеары костного мозга и нейральные стволовые клетки. Также авторы подтвердили гипотезу, что не последнюю роль в захвате трансплантированных клеток легочными капиллярами играют адгезивные свойства МСК, которые восприимчивы к молекулам адгезии, выделяемым эндотелием сосудов [182]. Несмотря на задержку

трансплантированных МСК при прохождении микроциркуляторного русла легких, по данным научных исследований, этот феномен носит временный характер. В исследованиях ряда авторов было показано, что активное «поглощение» легкими грызунов введенных стволовых клеток в первые минуты после трансплантации через час достигало 60%, но к 3му часу составляло 30% [177]. У людей, перенесших инсульт, внутривенно введенные стволовые клетки периферической крови также активно задерживались легкими через 30 минут после внутривенного введения, однако, через 4 часа после трансплантации распределение трансплантированных клеток по паренхиматозным органам составляло: 42,12 % клеток в селезенке, 21,3 % - в печени и только 5,8 % клеток в легких [108].

По данным других авторов меченые клетки обнаруживаются в ткани легких не менее 12 дней [230]. Транзитное прохождение трансплантированными МСК головного мозга с последующей аккумуляцией клеток в паренхиматозных органах, сопровождаемое терапевтическим действием на состояние животных с моделью инфаркта головного мозга позволило некоторым авторам высказать новый взгляд на паракринное действие МСК. Согласно результатам исследования Sandra A Acosta [21], внутривенная трансплантация МСК в отсроченном периоде инфаркта головного мозга подавляет воспалительные процессы, происходящие в ткани селезенки, которые оказывают влияние на развитие вторичной нейродегенерации в головном мозге у крыс с экспериментальным инсультом. Согласно результатам, полученным в ходе настоящего исследования, несмотря на ограниченное количество мезенхимальных стволовых клеток, попадающих в головной мозг при внутривенной трансплантации, а также их краткосрочное пребывание в данной локации, как было показано выше, применение данного типа клеток в обеих дозировках оказывает положительное терапевтическое влияние на функциональное восстановление крыс с моделью экспериментального инфаркта головного мозга. Данный

факт позволяет предположить преобладание паракринного механизма действия МСК на церебральные изменения в условиях ишемии.

5. Оценка активности глиальной реакции в полушарии инфаркта у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга

Дополнительно в рамках изучения механизмов действия мезенхимальных стволовых клеток, было исследовано влияние внутривенной клеточной трансплантации МСК на активность глиальной реакции в области коры полушария инфаркта головного мозга лабораторных животных по данным иммуногистохимического исследования через 7 суток после введения. Для проведения данного этапа исследования лабораторные животные через 24 часа после воспроизведения модели инфаркта головного мозга были разделены на группы:

1. Группа крыс с введением МСК в дозе 2×10^6 клеток ($n=5$);
2. Группа контроля: крысы с введением 1мл физиологического раствора ($n=5$).

Для проведения иммуногистохимического исследования все животные были выведены из эксперимента на 7-е сутки после клеточной трансплантации или введения физиологического раствора. Оценка выраженности реакции нейроглии проводилась по показателю активности экспрессии глиофибрилярного кислого белка (GFAP). Примеры изображений, полученных с помощью конфокальной микроскопии образцов головного мозга представлены на Рис. 44 и 45.

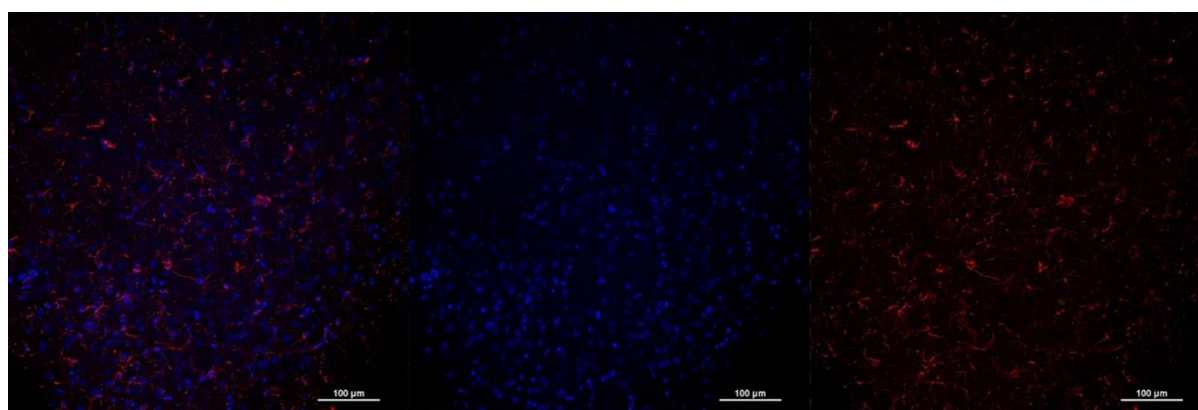


Рис. 44 Активность экспрессии GFAP клетками нейроглии в области коры полушария инфаркта головного мозга крысы из группы клеточной терапии МСК. Данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: красная флюоресценция соответствует окраске антителами к GFAP, ядра докрашены DAPI. Масштабный отрезок равен 100 мкм.

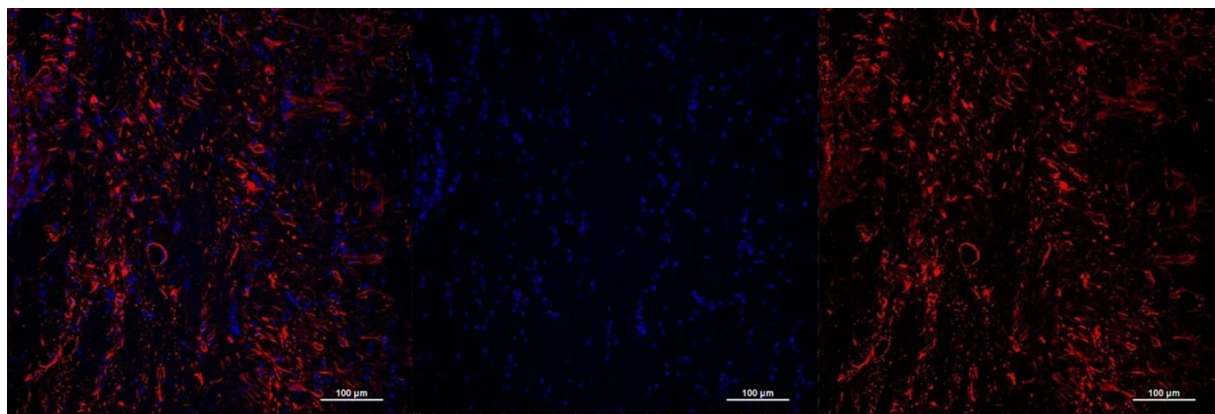


Рис. 45 Активность экспрессии GFAP клетками нейроглии в области коры полушария инфаркта головного мозга крысы из группы контроля. Данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: красная флюоресценция соответствует окраске антителами к GFAP, ядра докрашены DAPI. Масштабный отрезок равен 100 мкм.

Оценка экспрессии GFAP производилась при помощи анализа интенсивности флюоресценции вещества головного мозга в указанной зоне по данным конфокальной микроскопии.

При оценке выраженности глиальной реакции в области коры головного мозга в полушарии инфаркта методом факторного дисперсионного анализа с группировкой (Nested Factorial ANOVA) была выявлена достоверно более низкая экспрессия GFAP в исследуемой области мозга у крыс из группы клеточной терапии МСК по сравнению с группой контроля. Данные представлены на Рис. 46.

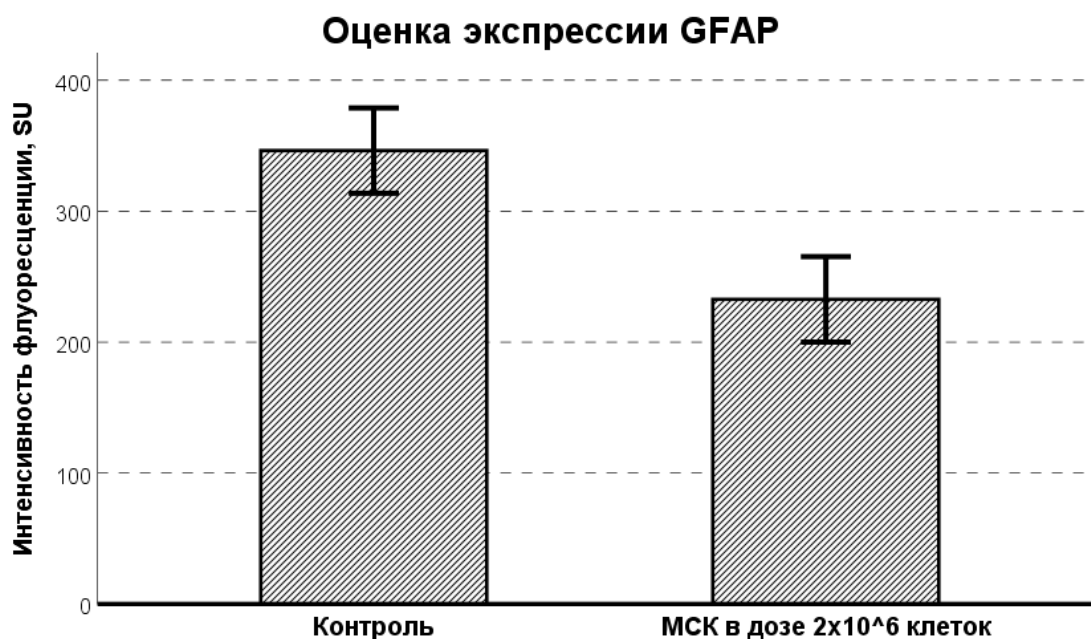


Рис. 46 Диаграмма оценки экспрессии GFAP в области коры полушария инфаркта головного мозга крыс в группе контроля (инфузия физиологического раствора) и группе клеточной терапии МСК (трансплантация 2×10^6 клеток) на 7-е сутки после введения.

Таким образом, можно заключить, что внутривенная трансплантация МСК в дозе 2×10^6 клеток уменьшает активность глиальной реакции в области коры в перифокальной зоне полушария инфаркта головного мозга. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей. Так в работе Shen и соавт. [190] наблюдалось уменьшение выраженности экспрессии белков астроглии (GFAP и нейрокана) после внутривенного введения МСК костного мозга крысы через 24 часа после воспроизведения модели инфаркта головного мозга. Исходя из полученных данных, авторы приходят к выводу, что трансплантация МСК, тормозя реактивную деятельность астроцитов, способствует благоприятной среде для регенерации вещества головного мозга в условиях ишемии. Подобные наблюдения подтверждаются работами других авторов, изучавших влияние клеточной терапии на реактивный глиоз в более поздние сроки. Так, в исследовании Gómez-de Frutos [86] изучались особенности влияния внутривенной

трансплантации МСК человека через 48 часов после воспроизведения экспериментального инфаркта головного мозга у лабораторных крыс с гипергликемией. Согласно полученным результатам, наблюдался более выраженный регресс неврологического дефицита у крыс с клеточной терапией, однако, не было выявлено влияния трансплантации МСК на динамику изменения объема очага инфаркта головного мозга по данным МРТ. В то же время в группе крыс с клеточной терапией МСК отмечалось значимое уменьшение экспрессии GFAP в перифокальной области через 6 недель после моделирования ишемического инсульта по сравнению с не лечеными крысами, из чего авторы заключают, что применение внутривенной трансплантации МСК приводит к торможению воспалительной реакции нейроглии, которая в условиях ишемии усугубляет неврологический дефицит.

Согласно результатам нашего исследования, наблюдаемый терапевтический эффект внутривенной трансплантации МСК крысам с моделью экспериментального инфаркта головного мозга может быть обусловлен подавлением глиальной реакции астроцитов в перифокальной области, наряду с другими механизмами действия трансплантированных стволовых клеток. Выявление влияния МСК на процессы, происходящие в веществе головного мозга в условиях ишемии, проясняют особенности механизмов действия данного типа клеток, которые способствуют функциональному восстановлению лабораторных животных с моделью экспериментального инфаркта головного мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было изучено влияние внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на церебральные изменения при острой фокальной ишемии головного мозга у крыс по данным МРТ и гистологического исследования. Для проведения научной работы на первом этапе была комплексно исследована терапевтическая эффективность внутривенной трансплантации МСК плаценты человека в дозировке 5×10^5 и 2×10^6 клеток по показателю выживаемости лабораторных крыс с моделью экспериментального инфаркта головного мозга, динамики изменения массы тела животных, регресса неврологического дефицита и изменения объема очага ишемии головного мозга во время срока наблюдения, который составлял 60 суток. Затем была сопоставлена выраженность терапевтического эффекта, оказываемого МСК при трансплантации в двух дозировках, на восстановление неврологических функций у лабораторных крыс с моделью экспериментального инфаркта головного мозга. Установлено, что внутривенная трансплантация МСК, независимо от дозы, способствовала регрессу неврологического дефицита у лабораторных животных с острой фокальной ишемией головного мозга. При этом было выявлено, что применение клеточной терапии МСК путем внутривенной трансплантации имеет дозозависимый эффект. Введение 5×10^5 МСК приводило к уменьшению выраженности неврологического дефицита, начиная с 14 суток, при этом длительность терапевтического эффекта не превышала 1 месяц после введения. Внутривенная трансплантация 2×10^6 МСК способствовала более выраженному восстановлению неврологического статуса животных, начиная с 7-х суток после клеточной инфузии, а также обладала более длительным положительным действием на процесс функционального восстановления крыс с экспериментальным инфарктом головного мозга. К 60-м суткам влияние трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток наблюдалось в виде значимо более выраженного регресса неврологического дефицита у крыс с моделью ишемии головного мозга, чем

у животных, которым была проведена клеточная терапия МСК в меньшей дозе. При этом ни в одной из исследуемых групп животных не было выявлено значимого влияния на динамику изменения массы тела животных и объема очага инфаркта мозга по данным МРТ, а также на показатель выживаемости лабораторных животных с моделью инфаркта головного мозга.

Была комплексно изучена и сопоставлена терапевтическая эффективность внутривенной трансплантации нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, крысам с моделью острой фокальной ишемии головного мозга, в двух дозировках: 5×10^5 и 2×10^6 клеток. Установлено, что вне зависимости от дозы клеток, введение ИПСК-НПК значительно улучшает выживаемость лабораторных животных по сравнению с крысами без клеточной терапии. Также было показано, что клеточная терапия ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток способствует восстановлению неврологического статуса животных с экспериментальным инфарктом головного мозга. Внутривенная трансплантация ИПСК-НПК в обеих дозировках не оказывала значимого влияния на динамику изменения массы тела животных, а также объема очага инфаркта мозга по данным МРТ.

Была сопоставлена терапевтическая эффективность внутривенной трансплантации МСК и ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток крысам с острой фокальной ишемией головного мозга. Установлено, что только клеточная терапия ИПСК-НПК оказывала значимое воздействие на выживаемость лабораторных животных. При этом не отмечалось значимого различия в выраженности влияния на регресс неврологического дефицита внутривенной трансплантации разных типов клеток.

При помощи использования МРТ, в том числе в режиме реального времени, и последующей верификации данных при помощи гистологического исследования препаратов головного мозга крыс было изучено распределение МСК в головном мозге крыс после внутривенной

трансплантации у животных с моделью экспериментального инфаркта головного мозга. Было показано, что распределение меченных микрочастицами оксида железа МСК имеет диффузный характер – клетки визуализировались в обоих полушариях головного мозга. По данным МРТ, в головном мозге крыс после введения меченых МСК в дозе 5×10^5 клеток визуализировались единичные скопления меченых клеток, в то время как после трансплантации 2×10^6 клеток отмечалось большее количество зон сниженного сигнала, соответствующих меченым клеткам. При этом в течение 1 часа непрерывного МР-исследования отмечалось постепенное накопление клеток, а затем их частичная элиминация из вещества мозга. При исследовании головного мозга методом МРТ в динамике меченые МСК не визуализировались спустя 24 часа и 7 суток после внутривенной трансплантации 5×10^5 и 2×10^6 клеток. При проведении гистологического исследования образцов головного мозга спустя 2 часа, 24 часа и 7 суток после внутривенной трансплантации 5×10^5 клеток не было обнаружено меченых МСК. В то же время при дополнительном проведении гистологического исследования ткани паренхиматозных органов, через 2 и 24 часа после трансплантации клетки визуализировались в образцах ткани легких и печени. Спустя 2 часа после внутривенного введения 2×10^6 меченых МСК визуализировались единичные трансплантированные клетки в образцах головного мозга по данным гистологического метода исследования. При этом МСК также находились в препаратах паренхиматозных органов, в большем количестве в легких, и продолжали детектироваться в тканях через 24 часа после трансплантации.

При помощи иммуногистохимического исследования было показано тормозящее влияние внутривенной трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток на активность глиальной реакции в полушарии инфаркта головного мозга по сравнению с животными, которым не была проведена клеточная терапия. На 7-е сутки после клеточной трансплантации отмечалось уменьшение выраженности экспрессии глиофибрилярного кислого белка в области коры

перифокальной зоны полушария инфаркта головного мозга, что свидетельствует об уменьшении активности астроцитов, вызванной ишемией головного мозга.

Полученные в ходе исследования данные позволяют сделать вывод о том, что присутствие МСК в непосредственной близости от зоны ишемии, равно как и в вообще в поврежденном органе, не лежит в основе терапевтического действия клеток при внутривенной трансплантации крысам с моделью инфаркта головного мозга. На основании полученных данных о терапевтической эффективности МСК, о характере распределения клеток после внутривенного введения и влияния МСК на активность глиальной реакции в полушарии инфаркта головного мозга можно заключить, что трансплантированные клетки оказывают действие на восстановление неврологических функций за счет паракринных механизмов, приводя к уменьшению неврологического дефицита лабораторных крыс с моделью экспериментального инфаркта головного мозга. Полученные в ходе научной работы результаты внесут вклад в понимание механизмов действия мезенхимальных стволовых клеток и послужат основой при разработке протоколов клинических исследований, посвященных клеточной терапии ишемического инсульта у людей.

ВЫВОДЫ

1. Терапевтическая эффективность внутривенной трансплантации МСК лабораторным животным с моделью острой фокальной ишемии головного мозга носит дозозависимый характер. Применение МСК в дозе 5×10^5 клеток значительно влияет на восстановление неврологических функций с 14 суток после клеточной инфузии, при этом терапевтический эффект длится до 30-го дня после трансплантации. Внутривенная трансплантация 2×10^6 МСК достоверно улучшает функциональное восстановление крыс, начиная с 7-х суток после введения, при этом длительность эффекта составляет 60 суток.

2. Внутривенная трансплантация ИПСК-НПК в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток приводит к значимому улучшению выживаемости лабораторных крыс, однако только трансплантация 2×10^6 ИПСК-НПК способствует восстановлению функций нервной системы лабораторных животных с моделью инфаркта головного мозга.

3. При сравнении терапевтической эффективности внутривенной трансплантации МСК и ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток не отмечалось значимой разницы при оценке динамики восстановления неврологического дефицита. При этом только трансплантация ИПСК-НПК оказывала значимое влияние на выживаемость лабораторных крыс с моделью ишемического инфаркта головного мозга.

4. При внутривенной трансплантации распределение МСК в головном мозге лабораторных крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга носит диффузный характер по данным МРТ в режиме реального времени. При этом клетки в малом количестве детектируются в обоих полушариях в течение первого часа после введения, после чего постепенно элиминируются из головного мозга, и не обнаруживаются спустя 24 часа после введения.

5. По данным гистологического исследования при внутривенной трансплантации МСК обнаруживаются в единичном количестве в обоих полушариях головного мозга через 2 часа после внутривенной

трансплантации, и спустя 24 часа из головного мозга элиминируются. При этом отмечается накопление трансплантированных МСК в тканях паренхиматозных органов, в которых клетки визуализируются до 24 часов.

6. По данным иммуногистохимического исследования на 7-е сутки после внутривенной трансплантации МСК отмечается значимое уменьшение активности глиальной реакции в области коры полушария инфаркта у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании полученных в настоящем исследовании результатов разработаны следующие практические рекомендации для использования в клинической, научно-исследовательской и преподавательской деятельности:

1. Применение клеточной терапии мезенхимальными стволовыми клетками на животных моделях экспериментального инфаркта головного мозга имеет дозозависимый характер, что следует учитывать при разработке протокола клеточной терапии на клинической стадии исследования.
2. Для выполнения внутривенной трансплантации стволовых клеток в экспериментальных исследованиях следует применять протокол введения, составленный с учетом размеров трансплантированных клеток, оптимальной дозы и скорости введения клеточной суспензии.
3. С целью проведения прижизненной визуализации меченных микрочастицами оксида железа мезенхимальных стволовых клеток и распределения их в головном мозге лабораторных крыс при внутривенной трансплантации целесообразно использовать метод динамического МР-сканирования с получением изображений взвешенных по магнитной восприимчивости (на основе импульсной последовательности SWI TR/TE/FA=50/19,1/15 толщиной 0,5 мм) и временем одной фазы 7 минут, что позволяет детектировать единичные скопления меченых трансплантированных клеток.
4. Данные МР-сканирования, применяемые для прижизненной визуализации меченных микрочастицами оксида железа мезенхимальных стволовых клеток и изучения их распределения в головном мозге, соотносятся с данными гистологического исследования. Предпочтение МРТ для детекции трансплантированных клеток позволяет сократить количество животных, задействованных в эксперименте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимирская, Е.Б. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в клеточной терапии // Онкогематология. – 2007. – № 1. – С. 4–16.
2. Габбасов, З.А. Стволовые клетки костного мозга и их участие в атерогенезе сосудов человека / О.С. Сабурова, А.А. Агапов, Э.Л. Соболева // Клиническая геронтология. – 2007. – Т. 13, – № 4. – С. 55–60.
3. Гусев, Е.И. Проблема инсульта в Российской Федерации: время активных современных действий / В.И. Скворцова, Л.В. Стаховская // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2007. – Т. 107, – № 6. – С. 4–10.
4. Гусев, Е.И. Ишемия головного мозга / В.И. Скворцова. – Москва: Медицина, 2001. – 321 с.
5. Гусев, Е.И. Нейропротективная терапия ишемического инсульта II. Вторичная нейропротекция / В.И. Скворцова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2002. – Т. 6. – С. 3–18.
6. Гусев, Е.И. Неврология. Национальное руководство. / А.Н. Коновалов, В.И. Скворцова, А. Гехт / под ред. Гусева Е.И. и др. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 880 с.
7. Деев, Р.В. Научное наследие Александра Максимова и современность // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – Т. 1. – С. 4–8.
8. Калинина, Н.И. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей / В.Ю. Сысоева, К.А. Рубина, Е.В. Парфенова и др. // Acta naturae (русскоязычная версия). – 2011. – Т. 3, – № 4(11). – С. 32–39.
9. Кругляков, П.В. Мезенхимные стволовые клетки и иммунопатологические состояния организма / Е.А. Лохматова, В.Б. Климович, А.Ю. Зарицкий // Гены Клетки. – 2006. – Т. 1, – № 3. – С. 36–41.

10. Меркулов, В.А. Проблемы и перспективы применения клеточной терапии в клинической практике / Н.Д. Бунятян, С.М. Радаев // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2011. – Т. 2. – С. 35–38.
11. Пальцев, М.А. Стволовые клетки и клеточные технологии: настоящее и будущее // Ремедиум. – 2006. – Т. 8. – С. 6–13.
12. Пальцев, М.А. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. – Москва: Медицина, 2009.
13. Рыбцов, С.А. Развитие гемопоэтических стволовых клеток в раннем эмбрионе млекопитающих / М.А. Лагарькова // Биохимия. – 2019. – Т. 84, – № 3. – С. 297–313. – doi: 10.1134/s0320972519030023.
14. Скворцова, В.И. Применение мезенхимальных (стромальных) стволовых клеток костного мозга при экспериментальном ишемическом инсульте у крыс / Л.В. Губский, Р.Т. Таирова, О.В. Поварова // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. – Т. 1. – С. 14–20.
15. Ткачук, В.А. Стволовые клетки и регенеративная медицина. – Москва: Издательство МГУ, 2011. – 282 с.
16. Фриденштейн, А.Я. О фибробластоподобных клетках в культурах кроветворной ткани морских свинок / Р.К. Чайлахян, К.С. Лалыкина. – Москва: Медицина, 1980.
17. Фриденштейн, А.Я. Клеточные основы кроветворного микроокружения / Е.А. Лурия. – Москва: Медицина, 1980.
18. Чертков, И.Л. Клеточные основы кроветворения (кроветворные клетки предшественники) / А.Я. Фриденштейн. – Москва: Медицина, 1977. – 272 с.
19. Ярыгин, К.Н. Регенеративная биология и медицина. Книга II. Клеточные технологии в терапии болезней нервной системы / В.В. Семченко, С.И. Ерениев, В.Н. Ярыгин и др. / под ред. Ярыгина В.Н. и

- др. – Екатеринбург – Москва – Омск – Томск – Ханты-Мансийск: Омская областная типография, 2015. – 360 с.
20. Ярыгин, К.Н. Механизмы положительного влияния трансплантации МСК плаценты человека на восстановление крыс после экспериментального ишемического инсульта / И.В. Холоденко, А.А. Кониева, В.В. Бурунова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, – № 12. – С. 621–628.
 21. Acosta, S.A. Intravenous Bone Marrow Stem Cell Grafts Preferentially Migrate to Spleen and Abrogate Chronic Inflammation in Stroke / N. Tajiri, J. Hoover, Y. Kaneko et al. // *Stroke*. – 2015. – V. 46, – № 9. – P. 2616–2627. – doi: 10.1161/STROKEAHA.115.009854.
 22. Agrawal, H. Human adipose-derived stromal/stem cells demonstrate short-lived persistence after implantation in both an immunocompetent and an immunocompromised murine model. / H. Shang, A.P. Sattah, N. Yang et al. // *Stem Cell Res. Ther.* – 2014. – V. 5, – № 6. – P. 142. – doi: 10.1186/scrt532.
 23. Alanazi, A. Comparative adhesive and migratory properties of mesenchymal stem cells from different tissues / H. Munir, M. Alassiri, L.S.C. Ward et al. // *Biorheology*. – 2019. – V. 56, – № 1. – P. 15–30. – doi: 10.3233/BIR-180185.
 24. Alvarez-Dolado, M. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. / R. Pardal, J.M. Garcia-Verdugo, J.R. Fike et al. // *Nature*. – England, 2003. – V. 425, – № 6961. – P. 968–973. – doi: 10.1038/nature02069.
 25. in 't Anker, P.S. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. / W.A. Noort, S.A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur et al. // *Haematologica*. – Italy, 2003. – V. 88, – № 8. – P. 845–852.
 26. Ankrum, J.A. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune

- privileged / J.F. Ong, J.M. Karp // *Nat Biotechnol.* – *Nat Biotechnol*, 2014. – V. 32, – № 3. – P. 252–260.
27. Argibay, B. Intraarterial route increases the risk of cerebral lesions after mesenchymal cell administration in animal model of ischemia / J. Trekker, U. Himmelreich, A. Beiras et al. // *Sci. Rep.* – Nature Publishing Group, 2017. – V. 7, – № August 2016. – P. 1–17. – doi: 10.1038/srep40758.
28. Arthur, A. Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues / G. Rychkov, S. Shi, S.A. Koblar et al. // *Stem Cells.* – *Stem Cells*, 2008. – V. 26, – № 7. – P. 1787–1795. – doi: 10.1634/stemcells.2007-0979.
29. Asadi, H. Changing management of acute ischaemic stroke: The new treatments and emerging role of endovascular therapy / D. Williams, J. Thornton // *Curr. Treat. Options Neurol.* – *Curr Treat Options Neurol*, 2016. – V. 18, – № 5. – doi: 10.1007/s11940-016-0403-8.
30. Ashjian, P.H. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. / A.S. Elbarbary, B. Edmonds, D. DeUgarte et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – United States, 2003. – V. 111, – № 6. – P. 1922–1931. – doi: 10.1097/01.PRS.0000055043.62589.05.
31. Ashton, B.A. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. / T.D. Allen, C.R. Howlett, C.C. Eaglesom et al. // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – United States, 1980. – № 151. – P. 294–307.
32. Baker, E.W. Neural stem cell therapy for stroke: A multimechanistic approach to restoring neurological function / H.A. Kinder, F.D. West // *Brain and Behavior.* – John Wiley and Sons Ltd, 2019. – V. 9, – № 3. – P. e01214. – doi: 10.1002/brb3.1214.
33. Bakker, R. The Scalable Brain Atlas: Instant Web-Based Access to Public Brain Atlases and Related Content / P. Tiesinga, R. Kötter // *Neuroinformatics.* – Humana Press Inc., 2015. – V. 13, – № 3. – P. 353–366. – doi: 10.1007/s12021-014-9258-x.
34. Banas, A. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and

- their therapeutic potential for liver failure. / T. Teratani, Y. Yamamoto, M. Tokuhara et al. // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – Australia, 2009. – V. 24, – № 1. – P. 70–77. – doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05496.x.
35. Bang, O.Y. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients / J.S. Lee, P.H. Lee, G. Lee // *Ann. Neurol.* – John Wiley & Sons, Ltd, 2005. – V. 57, – № 6. – P. 874–882. – doi: 10.1002/ana.20501.
36. De Bari, C. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane / F. Dell’Accio, P. Tylzanowski, F.P. Luyten // *Arthritis Rheum.* – 2001. – V. 44, – № 8. – P. 1928–1942. – doi: 10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P.
37. Berge, E. European Stroke Organisation (ESO) guidelines on intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke / W. Whiteley, H. Audebert, G.M. De Marchis et al. // *Eur. Stroke J.* – 2021. – V. 6, – № 1. – P. I–LXII. – doi: 10.1177/2396987321989865.
38. Bhasin, A. Stem cell therapy: A clinical trial of stroke / M.V. Padma Srivastava, S. Mohanty, R. Bhatia et al. // *Clin. Neurol. Neurosurg.* – 2013. – V. 115, – № 7. – P. 1003–1008. – doi: 10.1016/j.clineuro.2012.10.015.
39. Boese, A.C. Neural stem cell therapy for subacute and chronic ischemic stroke / Q.S.E. Le, D. Pham, M.H. Hamblin et al. // *Stem Cell Research and Therapy.* – BioMed Central Ltd., 2018. – V. 9, – № 1. – P. 1–17. – doi: 10.1186/s13287-018-0913-2.
40. Börger, A.-K. Generation of HLA-Universal iPSC-Derived Megakaryocytes and Platelets for Survival Under Refractoriness Conditions. / D. Eicke, C. Wolf, C. Gras et al. // *Mol. Med.* – 2016. – V. 22. – P. 274–285. – doi: 10.2119/molmed.2015.00235.
41. Bossolasco, P. Motor neuron differentiation of iPSCs obtained from peripheral blood of a mutant TARDBP ALS patient. / F. Sassone, V. Gumina, S. Peverelli et al. // *Stem Cell Res.* – England, 2018. – V. 30. – P. 61–68. – doi: 10.1016/j.scr.2018.05.009.
42. Brazelton, T.R. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in

- adult mice. / F.M. Rossi, G.I. Keshet, H.M. Blau // *Science*. – United States, 2000. – V. 290, – № 5497. – P. 1775–1779. – doi: 10.1126/science.290.5497.1775.
43. Brighton, C.T. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. / D.G. Lorch, R. Kupcha, T.M. Reilly et al. // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – United States, 1992. – № 275. – P. 287–299.
44. Cai, L. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. / B.H. Johnstone, T.G. Cook, J. Tan et al. // *Stem Cells*. – 2009. – V. 27, – № 1. – P. 230–237. – doi: 10.1634/stemcells.2008-0273.
45. Caplan, A.I. All MSCs Are Pericytes? // *Cell Stem Cell*. – 2008. – V. 3, – № 3. – P. 229–230. – doi: 10.1016/j.stem.2008.08.008.
46. Carvalho, A.L. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses / M. V. Caldeira, S.D. Santos, C.B. Duarte // *British Journal of Pharmacology*. – 2008. – V. 153, – № SUPPL. 1. – doi: 10.1038/sj.bjp.0707509.
47. Castro, R.F. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. / K.A. Jackson, M.A. Goodell, C.S. Robertson et al. // *Science*. – United States, 2002. – V. 297, – № 5585. – P. 1299. – doi: 10.1126/science.297.5585.1299.
48. Chan, J.L. Intramyocardial Bone Marrow Stem Cells in Patients Undergoing Cardiac Surgical Revascularization. / J.G. Miller, Y. Zhou, P.G. Robey et al. // *Ann. Thorac. Surg.* – 2020. – V. 109, – № 4. – P. 1142–1149. – doi: 10.1016/j.athoracsur.2019.07.093.
49. Chang, D.J. Therapeutic potential of human induced pluripotent stem cells in experimental stroke / N. Lee, I.H. Park, C. Choi et al. // *Cell Transplant.* – 2013. – V. 22, – № 8. – P. 1427–1440. – doi: 10.3727/096368912X657314.
50. Chau, M. Transplantation of iPS cell-derived neural progenitors overexpressing SDF-1 α increases regeneration and functional recovery after

- ischemic stroke / T.C. Deveau, M. Song, Z.Z. Wei et al. // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8, – № 57. – P. 97537–97553. – doi: 10.18632/oncotarget.22180.
51. Chau, M.J. IPSC transplantation increases regeneration and functional recovery after ischemic stroke in neonatal rats / T.C. Deveau, M. Song, X. Gu et al. // *Stem Cells*. – 2014. – V. 32, – № 12. – P. 3075–3087. – doi: 10.1002/stem.1802.
52. Chen, J. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. / P.R. Sanberg, Y. Li, L. Wang et al. // *Stroke*. – United States, 2001. – V. 32, – № 11. – P. 2682–2688. – doi: 10.1161/hs1101.098367.
53. Chen, J. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. / Y. Li, L. Wang, M. Lu et al. // *J. Neurol. Sci.* – Netherlands, 2001. – V. 189, – № 1–2. – P. 49–57. – doi: 10.1016/s0022-510x(01)00557-3.
54. Chen, J. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats / Y. Li, L. Wang, Z. Zhang et al. // *Stroke*. – 2001. – V. 32, – № 4. – P. 1005–1011. – doi: 10.1161/01.STR.32.4.1005.
55. Chen, Y. Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties. / F.Y.H. Teng, B.L. Tang // *Cell. Mol. Life Sci.* – Switzerland, 2006. – V. 63, – № 14. – P. 1649–1657. – doi: 10.1007/s00018-006-6019-5.
56. Cheng, Y. Intravenously delivered neural stem cells migrate into ischemic brain, differentiate and improve functional recovery after transient ischemic stroke in adult rats. / J. Zhang, L. Deng, N.R. Johnson et al. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2015. – V. 8, – № 3. – P. 2928–2936.
57. Cho, K.J. Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha. / K.A. Trzaska, S.J. Greco, J. McArdle et al. // *Stem Cells*. – England, 2005. – V. 23, – № 3. – P. 383–391. – doi:

- 10.1634/stemcells.2004-0251.
58. Chua, J.Y. Intra-arterial injection of neural stem cells using a microneedle technique does not cause microembolic strokes. / A. V Pendharkar, N. Wang, R. Choi et al. // *J. Cereb. blood flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2011. – V. 31, – № 5. – P. 1263–1271. – doi: 10.1038/jcbfm.2010.213.
 59. Corselli, M. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells / C.W. Chen, M. Crisan, L. Lazzari et al. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2010. – V. 30, – № 6. – P. 1104–1109. – doi: 10.1161/ATVBAHA.109.191643.
 60. Covas, D.T. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. / J.L.C. Siufi, A.R.L. Silva, M.D. Orellana // *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol. – Brazil, 2003.* – V. 36, – № 9. – P. 1179–1183. – doi: 10.1590/s0100-879x2003000900006.
 61. Crisan, M. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs / S. Yap, L. Casteilla, C.W. Chen et al. // *Cell Stem Cell.* – 2008. – V. 3, – № 3. – P. 301–313. – doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
 62. Cui, C. miR-145 Regulates Diabetes-Bone Marrow Stromal Cell-Induced Neurorestorative Effects in Diabetes Stroke Rats / X. Ye, M. Chopp, P. Venkat et al. // *Stem Cells Transl. Med.* – 2016. – V. 5, – № 12. – P. 1656–1667. – doi: 10.5966/sctm.2015-0349.
 63. Cunningham, C.J. The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. / E. Redondo-Castro, S.M. Allan // *J. Cereb. blood flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2018. – V. 38, – № 8. – P. 1276–1292. – doi: 10.1177/0271678X18776802.
 64. Cyranoski, D. Stem-cell pioneer banks on future therapies // *Nature.* – 2012. – V. 488, – № 7410. – P. 139. – doi: 10.1038/488139a.
 65. Cyranoski, D. Japanese woman is first recipient of next-generation stem cells // *Nature.* – 2014. – doi: 10.1038/nature.2014.15915.
 66. Cyranoski, D. ‘Reprogrammed’ stem cells implanted into patient with

- Parkinson's disease // Nature. – Springer Science and Business Media LLC, 2018. – doi: 10.1038/d41586-018-07407-9.
67. Deuse, T. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients / X. Hu, A. Gravina, D. Wang et al. // Nat. Biotechnol. – 2019. – V. 37, – № 3. – P. 252–258. – doi: 10.1038/s41587-019-0016-3.
 68. Dezawa, M. Muse cells provide the pluripotency of mesenchymal stem cells: Direct contribution of muse cells to tissue regeneration // Cell Transplantation. – 2016. – V. 25, – № 5. – P. 849–861. – doi: 10.3727/096368916X690881.
 69. Ding, D.-C. Enhancement of neuroplasticity through upregulation of beta1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model. / W.-C. Shyu, M.-F. Chiang, S.-Z. Lin et al. // Neurobiol. Dis. – United States, 2007. – V. 27, – № 3. – P. 339–353. – doi: 10.1016/j.nbd.2007.06.010.
 70. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach et al. // Cytotherapy. – 2006. – V. 8, – № 4. – P. 315–317. – doi: 10.1080/14653240600855905.
 71. Eckert, A. Bystander Effect Fuels Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells to Quickly Attenuate Early Stage Neurological Deficits After Stroke / L. Huang, R. Gonzalez, H.-S. Kim et al. // Stem Cells Transl. Med. – Wiley, 2015. – V. 4, – № 7. – P. 841–851. – doi: 10.5966/sctm.2014-0184.
 72. Efimenko, A.I. [Viability and angiogenic activity of mesenchymal stromal cells from adipose tissue and bone marrow in hypoxia and inflammation in vitro]. / E.E. Starostina, K.A. Rubina, N.I. Kalinina et al. // Tsitologiya. – Russia (Federation), 2010. – V. 52, – № 2. – P. 144–154.
 73. Eggenhofer, E. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. / V. Benseler, A. Kroemer, F.C.

- Popp et al. // *Front. Immunol.* – 2012. – V. 3. – P. 297. – doi: 10.3389/fimmu.2012.00297.
74. Faça, V.M. Human mesenchymal stromal cell proteomics: contribution for identification of new markers and targets for medicine intervention. // *Expert Rev. Proteomics.* – England, 2012. – V. 9, – № 2. – P. 217–230. – doi: 10.1586/epr.12.9.
75. Fischer, U.M. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: The pulmonary first-pass effect / M.T. Harting, F. Jimenez, W.O. Monzon-Posadas et al. // *Stem Cells Dev.* – 2009. – V. 18, – № 5. – P. 683–691. – doi: 10.1089/scd.2008.0253.
76. Foerch, C. Invited article: Searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke / J. Montaner, K.L. Furie, M.M. Ning et al. // *Neurology.* – 2009. – V. 73, – № 5. – P. 393–399. – doi: 10.1212/WNL.0b013e3181b05ef9.
77. Foerch, C. Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke / M. Niessner, T. Back, M. Bauerle et al. // *Clin. Chem.* – 2012. – V. 58, – № 1. – P. 237–245. – doi: 10.1373/clinchem.2011.172676.
78. Foerch, C. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke / I. Curdt, B. Yan, F. Dvorak et al. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 2006. – V. 77, – № 2. – P. 181–184. – doi: 10.1136/jnnp.2005.074823.
79. Friedenstein, A.J. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells / R.K. Chailakhjan, K.S. Lalykina // *Cell Prolif.* – 1970. – V. 3, – № 4. – P. 393–403. – doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.
80. Friedenstein, A.J. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. / I.I. Piatetzky-Shapiro, K. V Petrakova // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – England, 1966. – V. 16, – № 3. – P. 381–390.
81. Fu, Q. Engrafted peripheral blood-derived mesenchymal stem cells promote

- locomotive recovery in adult rats after spinal cord injury. / Y. Liu, X. Liu, Q. Zhang et al. // *Am. J. Transl. Res.* – e-Century Publishing Corporation, 2017. – V. 9, – № 9. – P. 3950–3966.
82. Fu, X. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. / G. Liu, A. Halim, Y. Ju et al. // *Cells.* – 2019. – V. 8, – № 8. – doi: 10.3390/cells8080784.
83. Fujimori, K. Escape from Pluripotency via Inhibition of TGF- β /BMP and Activation of Wnt Signaling Accelerates Differentiation and Aging in hPSC Progeny Cells. / T. Matsumoto, F. Kisa, N. Hattori et al. // *Stem cell reports.* – 2017. – V. 9, – № 5. – P. 1675–1691. – doi: 10.1016/j.stemcr.2017.09.024.
84. Gao, J. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. / J.E. Dennis, R.F. Muzic, M. Lundberg et al. // *Cells. Tissues. Organs.* – Switzerland, 2001. – V. 169, – № 1. – P. 12–20. – doi: 10.1159/000047856.
85. Ge, J. The Size of Mesenchymal Stem Cells is a Significant Cause of Vascular Obstructions and Stroke / L. Guo, S. Wang, Y. Zhang et al. // *Stem Cell Rev. Reports.* – 2014. – V. 10, – № 2. – P. 295–303. – doi: 10.1007/s12015-013-9492-x.
86. Gómez-De Frutos, M.C. Intravenous delivery of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improves brain repair in hyperglycemic stroke rats / F. Laso-García, L. Diekhorst, L. Otero-Ortega et al. // *Stem Cell Res. Ther.* – 2019. – V. 10(1), – № 212. – P. 1–13. – doi: 10.1186/s13287-019-1322-x.
87. Gorin, C. Priming Dental Pulp Stem Cells With Fibroblast Growth Factor-2 Increases Angiogenesis of Implanted Tissue-Engineered Constructs Through Hepatocyte Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Secretion. / G.Y. Rochefort, R. Bascetin, H. Ying et al. // *Stem Cells Transl. Med.* – 2016. – V. 5, – № 3. – P. 392–404. – doi: 10.5966/sctm.2015-0166.
88. Gronthos, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells / J. Brahim, W. Li, L.W. Fisher et al. // *J. Dent. Res.* – 2002. – V. 81, – № 8. – P. 531–535. – doi: 10.1177/154405910208100806.

89. Guo, Y. Progress in Mesenchymal Stem Cell Therapy for Ischemic Stroke / Y. Peng, H. Zeng, G. Chen // *Stem Cells Int.* – 2021. – V. 2021, – № 9923566. – P. 1–24. – doi: 10.1155/2021/9923566.
90. Guzman, R. Intravascular cell replacement therapy for stroke. / R. Choi, A. Gera, A. De Los Angeles et al. // *Neurosurg. Focus.* – United States, 2008. – V. 24, – № 3–4. – P. E15. – doi: 10.3171/FOC/2008/24/3-4/E14.
91. Guzman, R. Intra-arterial delivery of cell therapies for stroke / M. Janowski, P. Walczak // *Stroke.* – Lippincott Williams and Wilkins, 2018. – V. 49, – № 5. – P. 1075–1082. – doi: 10.1161/STROKEAHA.117.018288.
92. Hao, L. Stem cell-based therapies for ischemic stroke. / Z. Zou, H. Tian, Y. Zhang et al. // *Biomed Res. Int.* – 2014. – V. 2014. – P. 468748. – doi: 10.1155/2014/468748.
93. Haynesworth, S.E. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. / J. Goshima, V.M. Goldberg, A.I. Caplan // *Bone.* – United States, 1992. – V. 13, – № 1. – P. 81–88. – doi: 10.1016/8756-3282(92)90364-3.
94. Hirschi, K.K. Pericytes in the microvasculature. / P.A. D'Amore // *Cardiovasc. Res.* – England, 1996. – V. 32, – № 4. – P. 687–698.
95. Holmes, D. Stem cell scientists share 2012 Nobel Prize for medicine // *The Lancet.* – 2012. – V. 380, – № 9850. – P. 1295. – doi: 10.1016/S0140-6736(12)61743-7.
96. Honma, T. Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat / O. Honmou, S. Iihoshi, K. Harada et al. // *Exp. Neurol.* – 2006. – V. 199, – № 1. – P. 56–66. – doi: 10.1016/j.expneurol.2005.05.004.
97. Honmou, O. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke / K. Houkin, T. Matsunaga, Y. Niitsu et al. // *Brain.* – 2011. – V. 134, – № 6. – P. 1790–1807. – doi: 10.1093/brain/awr063.
98. Horita, Y. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic

- factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat / O. Honmou, K. Harada, K. Houkin et al. // *J. Neurosci. Res.* – 2006. – V. 84, – № 7. – P. 1495–1504. – doi: 10.1002/jnr.21056.
99. Hu, W.-B. [Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on acute graft versus host disease and graft versus leukemia after allogeneic bone marrow transplantation]. / Q.-P. Gao, Y.-H. Chen // *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi.* – China, 2005. – V. 13, – № 3. – P. 404–407.
100. Hu, Y. Hypoxic preconditioning improves the survival and neural effects of transplanted mesenchymal stem cells via CXCL12/CXCR4 signalling in a rat model of cerebral infarction / W. Chen, L. Wu, L. Jiang et al. // *Cell Biochem. Funct.* – 2019. – V. 37, – № 7. – P. 504–515. – doi: 10.1002/cbf.3423.
101. Ishizaka, S. Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke / N. Horie, K. Satoh, Y. Fukuda et al. // *Stroke.* – 2013. – V. 44, – № 3. – P. 720–726. – doi: 10.1161/STROKEAHA.112.677328.
102. Jensen, M.B. Survival and differentiation of transplanted neural stem cells derived from human induced pluripotent stem cells in a rat stroke model / H. Yan, R. Krishnaney-Davison, A. Al Sawaf et al. // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* – 2013. – V. 22, – № 4. – P. 304–308. – doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2011.09.008.
103. Jiang, X. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke / A. V. Andjelkovic, L. Zhu, T. Yang et al. // *Progress in Neurobiology.* – 2018. – V. 163–164. – P. 144–171. – doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.10.001.
104. Jiang, Y. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. / B. Vaessen, T. Lenvik, M. Blackstad et al. // *Exp. Hematol.* – Netherlands, 2002. – V. 30, – № 8. – P. 896–904. – doi: 10.1016/s0301-472x(02)00869-x.
105. Jolkkonen, J. Cell-based therapies in stroke / P. Walczak // *Cell-Based*

- Therapies in Stroke. – Springer-Verlag Wien, 2013. – 204 p. – doi: 10.1007/978-3-7091-1175-8.
106. Kalinina, N.I. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. / V.Y. Sysoeva, K.A. Rubina, Y. V Parfenova et al. // *Acta Naturae*. – 2011. – V. 3, – № 4. – P. 30–37.
 107. Kang, S. Characteristic analyses of a neural differentiation model from iPSC-derived neuron according to morphology, physiology, and global gene expression pattern. / X. Chen, S. Gong, P. Yu et al. // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7, – № 1. – P. 12233. – doi: 10.1038/s41598-017-12452-x.
 108. Kang, W.J. Tissue distribution of ¹⁸F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. / H.-J. Kang, H.-S. Kim, J.-K. Chung et al. // *J. Nucl. Med.* – United States, 2006. – V. 47, – № 8. – P. 1295–1301.
 109. Kasahara, Y. Transplantation of hematopoietic stem cells: intra-arterial versus intravenous administration impacts stroke outcomes in a murine model. / K. Yamahara, T. Soma, D.M. Stern et al. // *Transl. Res.* – United States, 2016. – V. 176. – P. 69–80. – doi: 10.1016/j.trsl.2016.04.003.
 110. Kaur, P. Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner in cerebral cortical explants / P.K. Jodhka, W.A. Underwood, C.A. Bowles et al. // *J. Neurosci. Res.* – 2007. – V. 85, – № 11. – P. 2441–2449. – doi: 10.1002/jnr.21370.
 111. Kawai, H. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain / T. Yamashita, Y. Ohta, K. Deguchi et al. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2010. – V. 30, – № 8. – P. 1487–1493. – doi: 10.1038/jcbfm.2010.32.
 112. Keimpema, E. Early transient presence of implanted bone marrow stem cells reduces lesion size after cerebral ischaemia in adult rats / M.R. Fokkens, Z. Nagy, V. Agoston et al. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2009. – V. 35, – № 1. – P. 89–102. – doi: 10.1111/j.1365-2990.2008.00961.x.

113. Kenmuir, C.L. Update on cell therapy for stroke. / L.R. Wechsler // *Stroke Vasc. Neurol.* – 2017. – V. 2, – № 2. – P. 59–64. – doi: 10.1136/svn-2017-000070.
114. Kho, A.R. Administration of placenta-derived mesenchymal stem cells counteracts a delayed anergic state following a transient induction of endogenous neurogenesis activity after global cerebral ischemia / O.J. Kim, J.H. Jeong, J.M. Yu et al. // *Brain Res.* – 2018. – V. 1689. – P. 63–74. – doi: 10.1016/j.brainres.2018.03.033.
115. Kinnaird, T. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. / E. Stabile, M.S. Burnett, C.W. Lee et al. // *Circ. Res.* – United States, 2004. – V. 94, – № 5. – P. 678–685. – doi: 10.1161/01.RES.0000118601.37875.AC.
116. Kokaia, Z. Customized brain cells for stroke patients using pluripotent stem cells / I.L. Llorente, S.T. Carmichael // *Stroke.* – 2018. – V. 49, – № 5. – P. 1091–1098. – doi: 10.1161/STROKEAHA.117.018291.
117. Konno, M. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. / T.S. Hamazaki, S. Fukuda, M. Tokuhara et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – United States, 2010. – V. 400, – № 4. – P. 461–465. – doi: 10.1016/j.bbrc.2010.08.029.
118. Konoplyannikov, M.A. Cell therapy of stroke and spinal cord injury complications / V.P. Baklaushev, V.A. Kalsin, M.A. Tikhonovsky et al. // *J. Clin. Pract.* – 2015. – V. 6, – № 3. – P. 48–58. – doi: 10.17816/clinpract6348-58.
119. Kranz, A. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stromal cells upon experimental stroke in rats / D.C. Wagner, M. Kamprad, M. Scholz et al. // *Brain Res.* – 2010. – V. 1315. – P. 128–136. – doi: 10.1016/j.brainres.2009.12.001.
120. Kucia, M. Cells enriched in markers of neural tissue-committed stem cells

- reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following stroke. / Y.P. Zhang, R. Reza, M. Wysoczynski et al. // *Leukemia*. – England, 2006. – V. 20, – № 1. – P. 18–28. – doi: 10.1038/sj.leu.2404011.
121. Kucia, M. Evidence That CXCR4+ Neural Tissue-Committed Stem Cells (TCSC) Reside/Hide out in the Bone Marrow and Are Mobilized into the Peripheral Blood during Stroke. / Z.Y. Ping, J. Ratajczak, S.T. Ildstad et al. // *Blood*. – 2004. – V. 104, – № 11. – P. 2698–2698. – doi: 10.1182/blood.v104.11.2698.2698.
122. Lalu, M.M. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. / L. McIntyre, C. Pugliese, D. Fergusson et al. // *PLoS One*. – 2012. – V. 7, – № 10. – P. e47559. – doi: 10.1371/journal.pone.0047559.
123. Laso-García, F. Cell-based therapies for stroke: Promising solution or dead end? Mesenchymal stem cells and comorbidities in preclinical stroke research / L. Diekhorst, M.C. Gómez-De Frutos, L. Otero-Ortega et al. // *Frontiers in Neurology*. – 2019. – V. 10, – № 332. – P. 1–8. – doi: 10.3389/fneur.2019.00332.
124. Lazarus, H.M. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. / O.N. Koc, S.M. Devine, P. Curtin et al. // *Biol. blood marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* – United States, 2005. – V. 11, – № 5. – P. 389–398. – doi: 10.1016/j.bbmt.2005.02.001.
125. Lee, J.S. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. / J.M. Hong, G.J. Moon, P.H. Lee et al. // *Stem Cells*. – John Wiley & Sons, Ltd, 2010. – V. 28, – № 6. – P. 1099–1106. – doi: 10.1002/stem.430.
126. Lee, O.K. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. / T.K. Kuo, W.-M. Chen, K.-D. Lee et al. // *Blood*. – United States, 2004. – V. 103, – № 5. – P. 1669–1675. – doi: 10.1182/blood-2003-05-1670.

127. Li, F. Bone marrow stromal cells contribute to bone formation following infusion into femoral cavities of a mouse model of osteogenesis imperfecta. / X. Wang, C. Niyibizi // *Bone*. – 2010. – V. 47, – № 3. – P. 546–555. – doi: 10.1016/j.bone.2010.05.040.
128. Li, L. Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells by tetramethylpyrazine enhances cell migration and improves functional recovery after focal cerebral ischemia in rats / L. Chu, Y. Fang, Y. Yang et al. // *Stem Cell Res. Ther.* – 2017. – V. 8, – № 112. – P. 1–10. – doi: 10.1186/s13287-017-0565-7.
129. Li, W. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Stroke: Current Understanding and Challenges / L. Shi, B. Hu, Y. Hong et al. // *Front. Cell. Neurosci.* – 2021. – V. 15, – № 628940. – P. 1–12. – doi: 10.3389/fncel.2021.628940.
130. Li, Y. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. / J. Chen, X.G. Chen, L. Wang et al. // *Neurology*. – United States, 2002. – V. 59, – № 4. – P. 514–523. – doi: 10.1212/wnl.59.4.514.
131. Li, Y. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. / J. Chen, L. Wang, M. Lu et al. // *Neurology*. – United States, 2001. – V. 56, – № 12. – P. 1666–1672. – doi: 10.1212/wnl.56.12.1666.
132. Li, Z. Bone marrow-mesenchymal stem cells modulate microglial activation in the peri-infarct area in rats during the acute phase of stroke / H. Ye, X. Cai, W. Sun et al. // *Brain Res. Bull.* – 2019. – V. 153. – P. 324–333. – doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.10.001.
133. Liu, Z. Contralesional axonal remodeling of the corticospinal system in adult rats after stroke and bone marrow stromal cell treatment / Y. Li, X. Zhang, S. Savant-Bhonsale et al. // *Stroke*. – 2008. – V. 39, – № 9. – P. 2571–2577. – doi: 10.1161/STROKEAHA.107.511659.
134. Longa, E.Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. / P.R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins // *Stroke*. – 1989. – V. 20,

- № February 1989. – P. 84–91. – doi: 10.1161/01.STR.20.1.84.
135. Lopatina, T. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. / N. Kalinina, M. Karagyaur, D. Stambolsky et al. // PLoS One. – 2011. – V. 6, – № 3. – P. e17899. – doi: 10.1371/journal.pone.0017899.
 136. Lutz, M. Formation of embryoid bodies from Matrigel dots protocol // StemBook. – Harvard Stem Cell Institute, 2014. – doi: 10.3824/stembook.1.59.1.
 137. Maccario, R. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. / M. Podestà, A. Moretta, A. Cometa et al. // Haematologica. – Italy, 2005. – V. 90, – № 4. – P. 516–525.
 138. Makino, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. / K. Fukuda, S. Miyoshi, F. Konishi et al. // J. Clin. Invest. – 1999. – V. 103, – № 5. – P. 697–705. – doi: 10.1172/JCI5298.
 139. Manning, N.W. Endovascular thrombectomy > 24-hr from stroke symptom onset / J. Wenderoth, K. Alshali, D. Cordato et al. // Front. Neurol. – 2018. – V. 9, – № 501. – P. 1–4. – doi: 10.3389/fneur.2018.00501.
 140. de Mara, C.S. Periosteum as a source of mesenchymal stem cells: The effects of TGF- β 3 on chondrogenesis / A.R. Sartori, A.S. Duarte, A.L.L. Andrade et al. // Clinics. – 2011. – V. 66, – № 3. – P. 487–492. – doi: 10.1590/S1807-59322011000300022.
 141. Maximov, A.A. The lymphocyte as a stem cell, common to different blood elements in embryonic development and during the post-fetal life of mammals // Cell. Ther. Transplant. – 2009. – V. 1, – № 3. – P. 14–24. – doi: 10.3205/ctt-2009-en-000032.01.
 142. McCullough, L.D. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: Methods and potential pitfalls / F. Liu // J. Biomed. Biotechnol. – 2011. – V.

2011. – P. 1–9. – doi: 10.1155/2011/464701.
143. McEwen, B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain // *Physiol. Rev.* – 2007. – V. 87, – № 3. – P. 873–904. – doi: 10.1152/physrev.00041.2006.
144. McKinney, C.E. Using induced pluripotent stem cells derived neurons to model brain diseases. // *Neural Regen. Res.* – 2017. – V. 12, – № 7. – P. 1062–1067. – doi: 10.4103/1673-5374.211180.
145. Méndez-Ferrer, S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche / T. V. Michurina, F. Ferraro, A.R. Mazloom et al. // *Nature.* – 2010. – V. 466, – № 7308. – P. 829–834. – doi: 10.1038/nature09262.
146. Mezey, E. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. / S. Key, G. Vogelsang, I. Szalayova et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2003. – V. 100, – № 3. – P. 1364–1369. – doi: 10.1073/pnas.0336479100.
147. Minenko, I. To The Question of the Cloninig History / D. Serdyukov // *J. New Med. Technol. eJournal.* – 2014. – V. 8, – № 1. – P. 1–9. – doi: 10.12737/2907.
148. Mirza, A. Undifferentiated mesenchymal stem cells seeded on a vascular prosthesis contribute to the restoration of a physiologic vascular wall. / J.-M. Hyvelin, G.Y. Rochefort, P. Lermusiaux et al. // *J. Vasc. Surg. – United States,* 2008. – V. 47, – № 6. – P. 1313–1321. – doi: 10.1016/j.jvs.2007.12.038.
149. Moisan, A. Intravenous injection of clinical grade human MSCs after experimental stroke: Functional benefit and microvascular effect / I. Favre, C. Rome, F. de Fraipont et al. // *Cell Transplant.* – 2016. – V. 25, – № 12. – P. 2157–2171. – doi: 10.3727/096368916X691132.
150. Morizane, A. Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a nonhuman primate / D. Doi, T. Kikuchi, K. Okita et al. // *Stem Cell Reports.* – 2013. – V. 1, – № 4. – P.

- 283–292. – doi: 10.1016/j.stemcr.2013.08.007.
151. Mutlu, L. The endometrium as a source of mesenchymal stem cells for regenerative medicine / D. Hufnagel, H.S. Taylor // *Biol. Reprod.* – 2015. – V. 92(6), – № 138. – P. 1–11. – doi: 10.1095/biolreprod.114.126771.
 152. Namestnikova, D.D. Cell therapy for ischemic stroke. Stem cell types and results of preclinical trials / R.T. Tairova, K.K. Sukhinich, E.A. Cherkashova et al. // *Zhurnal Nevrol. i Psihiatr. Im. S.S. Korsakova.* – Media Sphaera Publishing Group, 2018. – V. 118, – № 9. – P. 69–75. – doi: 10.17116/jnevro201811809269.
 153. Namestnikova, D. Methodological aspects of MRI of transplanted superparamagnetic iron oxide-labeled mesenchymal stem cells in live rat brain / I. Gubskiy, I. Kholodenko, P. Melnikov et al. // *PLoS One* / ed. Boltze J. – Public Library of Science, 2017. – V. 12, – № 10. – P. e0186717. – doi: 10.1371/journal.pone.0186717.
 154. Namioka, T. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a rat model of chronic cerebral infarction / A. Namioka, M. Sasaki, Y. Kataoka-Sasaki et al. // *J. Neurosurg.* – 2019. – V. 131, – № 4. – P. 1289–1296. – doi: 10.3171/2018.5.JNS18140.
 155. Nayler, S.P. Human iPSC-Derived Cerebellar Neurons from a Patient with Ataxia-Telangiectasia Reveal Disrupted Gene Regulatory Networks. / J.E. Powell, D.P. Vanichkina, O. Korn et al. // *Front. Cell. Neurosci.* – 2017. – V. 11. – P. 321. – doi: 10.3389/fncel.2017.00321.
 156. NCT01580839 EXTEND (International): extending the Time for Thrombolysis in Emergency Neurological Deficits (International) // *Extending the Time for Thrombolysis in Emergency Neurological Deficits.* – 2012.
 157. Nekrasov, E.D. Manifestation of Huntington’s disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons / V.A. Vigont, S.A. Klyushnikov, O.S. Lebedeva et al. // *Mol. Neurodegener.* – 2016. – V. 11, – № 27. – P. 1–15. – doi: 10.1186/s13024-016-0092-5.

158. Neuhaus, A.A. Neuroprotection in stroke: The importance of collaboration and reproducibility / Y. Couch, G. Hadley, A.M. Buchan // *Brain*. – 2017. – V. 140, – № 8. – P. 2079–2092. – doi: 10.1093/brain/awx126.
159. Nogueira, R.G. Thrombectomy 6 to 24 hours after stroke with a mismatch between deficit and infarct / A.P. Jadhav, D.C. Haussen, A. Bonafe et al. // *N. Engl. J. Med.* – Massachusetts Medical Society, 2018. – V. 378, – № 1. – P. 11–21. – doi: 10.1056/NEJMoa1706442.
160. Nombela-Arrieta, C. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells / J. Ritz, L.E. Silberstein // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2011. – V. 12, – № 2. – P. 126–131. – doi: 10.1038/nrm3049.
161. Nose, N. [18F]FDG-labelled stem cell PET imaging in different route of administrations and multiple animal species / S. Nogami, K. Koshino, X. Chen et al. // *Sci. Rep.* – 2021. – V. 11, – № 10896. – P. 1–8. – doi: 10.1038/s41598-021-90383-4.
162. Oh, S.H. Early neuroprotective effect with lack of long-term cell replacement effect on experimental stroke after intra-arterial transplantation of adipose-derived mesenchymal stromal cells / C. Choi, D.J. Chang, D.A. Shin et al. // *Cytotherapy*. – Elsevier Inc, 2015. – V. 17, – № 8. – P. 1090–1103. – doi: 10.1016/j.jcyt.2015.04.007.
163. Ohshima, M. Intraperitoneal and intravenous deliveries are not comparable in terms of drug efficacy and cell distribution in neonatal mice with hypoxia-ischemia / A. Taguchi, H. Tsuda, Y. Sato et al. // *Brain Dev.* – 2015. – V. 37, – № 4. – P. 376–386. – doi: 10.1016/j.braindev.2014.06.010.
164. Oki, K. Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain / J. Tatarishvili, J. Wood, P. Koch et al. // *Stem Cells*. – 2012. – V. 30, – № 6. – P. 1120–1133. – doi: 10.1002/stem.1104.
165. Oshita, J. Early transplantation of human cranial bone-derived mesenchymal stem cells enhances functional recovery in ischemic stroke model rats / T. Okazaki, T. Mitsuhashi, T. Imura et al. // *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. – 2020.

- V. 60, – № 2. – P. 83–93. – doi: 10.2176/nmc.oa.2019-0186.
166. Ostrova, I. V. Prognostic value and therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in brain injuries (REVIEW) / N. V. Golubeva, A.N. Kuzovlev, A.M. Golubev // *Obs. Reanimatol.* – 2019. – V. 15, – № 1. – P. 70–86. – doi: 10.15360/1813-9779-2019-1-70-86.
167. Park, B.W. Peripheral nerve regeneration using autologous porcine skin-derived mesenchymal stem cells / D.H. Kang, E.J. Kang, J.H. Byun et al. // *J. Tissue Eng. Regen. Med. – J Tissue Eng Regen Med*, 2012. – V. 6, – № 2. – P. 113–124. – doi: 10.1002/term.404.
168. Park, J.R. Isolation of human dermis derived mesenchymal stem cells using explants culture method: expansion and phenotypical characterization / E. Kim, J. Yang, H. Lee et al. // *Cell Tissue Bank.* – 2015. – V. 16, – № 2. – P. 209–218. – doi: 10.1007/s10561-014-9471-8.
169. Phinney, D.G. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair—Current Views / D.J. Prockop // *Stem Cells.* – *Stem Cells*, 2007. – V. 25, – № 11. – P. 2896–2902. – doi: 10.1634/stemcells.2007-0637.
170. Polentes, J. Human induced pluripotent stem cells improve stroke outcome and reduce secondary degeneration in the recipient brain. / P. Jendelova, M. Cailleret, H. Braun et al. // *Cell Transplant.* – 2012. – V. 21, – № 12. – P. 2587–2602. – doi: 10.3727/096368912X653228.
171. Poltavtseva, R.A. Mesenchymal Stem Cells from Human Dental Pulp: Isolation, Characteristics, and Potencies of Targeted Differentiation / Y.A. Nikonova, I.I. Selezneva, A.K. Yaroslavtseva et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2014. – V. 158, – № 1. – P. 164–169. – doi: 10.1007/s10517-014-2714-7.
172. Powers, W.J. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association / A.A. Rabinstein, T. Ackerson, O.M. Adeoye et al. // *Stroke.* – Lippincott Williams and

- Wilkins, 2019. – V. 50, – № 12. – P. E344–E418. – doi: 10.1161/STR.0000000000000211.
173. Puspitasari, V. Glial fibrillary acidic protein serum level as a predictor of clinical outcome in ischemic stroke / P.Y. Gunawan, H.D. Wiradarma, V. Hartoyo // *Open Access Maced. J. Med. Sci.* – 2019. – V. 7, – № 9. – P. 1471–1474. – doi: 10.3889/oamjms.2019.326.
174. Ra, J.C. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans / I.S. Shin, S.H. Kim, S.K. Kang et al. // *Stem Cells Dev.* – 2011. – V. 20, – № 8. – P. 1297–1308. – doi: 10.1089/scd.2010.0466.
175. Rasmusson, I. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. / O. Ringdén, B. Sundberg, K. Le Blanc // *Transplantation.* – United States, 2003. – V. 76, – № 8. – P. 1208–1213. – doi: 10.1097/01.TP.0000082540.43730.80.
176. Ren, C. Assessment of serum UCH-L1 and GFAP in acute stroke patients / F. Kobeissy, A. Alawieh, N. Li et al. // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 14, – № 6. – P. 1–9. – doi: 10.1038/srep24588.
177. Rochefort, G.Y. Influence of hypoxia on the domiciliation of mesenchymal stem cells after infusion into rats: Possibilities of targeting pulmonary artery remodeling via cells therapies? / P. Vaudin, N. Bonnet, J.C. Pages et al. // *Respir. Res.* – 2005. – V. 6(1), – № 125. – P. 1–13. – doi: 10.1186/1465-9921-6-125.
178. Rochefort, G.Y. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. / B. Delorme, A. Lopez, O. Héroult et al. // *Stem Cells.* – England, 2006. – V. 24, – № 10. – P. 2202–2208. – doi: 10.1634/stemcells.2006-0164.
179. Romanov, Y.A. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. / V.A. Svintsitskaya, V.N. Smirnov // *Stem Cells.* – England, 2003. – V. 21, –

- № 1. – P. 105–110. – doi: 10.1634/stemcells.21-1-105.
180. Rubina, K.A. [Mechanism of stimulation of angiogenesis in ischemic myocardium with the help of adipose tissue stromal cells]. / N.I. Kalinina, A.I. Efimenko, T. V Lopatina et al. // *Kardiologiya*. – Russia (Federation), 2010. – V. 50, – № 2. – P. 51–61.
181. Rubina, K. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. / N. Kalinina, A. Efimenko, T. Lopatina et al. // *Tissue Eng. Part A*. – United States, 2009. – V. 15, – № 8. – P. 2039–2050. – doi: 10.1089/ten.tea.2008.0359.
182. Rüster, B. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells / S. Göttig, R.J. Ludwig, R. Bistrrian et al. // *Blood*. – 2006. – V. 108, – № 12. – P. 3938–3944. – doi: 10.1182/blood-2006-05-025098.
183. Saleh, F.A. Regulation of mesenchymal stem cell activity by endothelial cells / M. Whyte, P. Ashton, P.G. Genever // *Stem Cells Dev*. – 2011. – V. 20, – № 3. – P. 391–403. – doi: 10.1089/scd.2010.0168.
184. Sammali, E. Intravenous infusion of human bone marrow mesenchymal stromal cells promotes functional recovery and neuroplasticity after ischemic stroke in mice / C. Alia, G. Vegliante, V. Colombo et al. // *Sci. Rep*. – 2017. – V. 7, – № 6962. – P. 1–13. – doi: 10.1038/s41598-017-07274-w.
185. Schaar, K.L. Functional assessments in the rodent stroke model / M.M. Brenneman, S.I. Savitz // *Experimental and Translational Stroke Medicine*. – *Exp Transl Stroke Med*, 2010. – V. 2, – № 13. – P. 1–11. – doi: 10.1186/2040-7378-2-13.
186. Schrepfer, S. Stem Cell Transplantation: The Lung Barrier / T. Deuse, H. Reichenspurner, M.P. Fischbein et al. // *Transplant. Proc*. – 2007. – V. 39, – № 2. – P. 573–576. – doi: 10.1016/j.transproceed.2006.12.019.
187. Scuteri, A. Mesenchymal Stem Cells Neuronal Differentiation Ability: A Real Perspective for Nervous System Repair? / M. Miloso, D. Foudah, M.

- Orciani et al. // *Curr. Stem Cell Res. Ther.* – 2011. – V. 6, – № 2. – P. 82–92. – doi: 10.2174/157488811795495486.
188. Semenza, G.L. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. // *J. Cell. Biochem.* – United States, 2007. – V. 102, – № 4. – P. 840–847. – doi: 10.1002/jcb.21523.
189. Shen, L.H. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke / Y. Li, J. Chen, J. Zhang et al. // *Neuroscience.* – 2006. – V. 137, – № 2. – P. 393–399. – doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.08.092.
190. Shen, L.H. Down-regulation of neurocan expression in reactive astrocytes promotes axonal regeneration and facilitates the neurorestorative effects of bone marrow stromal cells in the ischemic rat brain / Y. Li, Q. Gao, S. Savant-Bhonsale et al. // *Glia.* – 2008. – V. 56, – № 16. – P. 1747–1754. – doi: 10.1002/glia.20722.
191. Shen, L.H. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke / Y. Li, J. Chen, A. Zacharek et al. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2007. – V. 27, – № 1. – P. 6–13. – doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600311.
192. da Silva Meirelles, L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues / P.C. Chagastelles, N.B. Nardi // *J. Cell Sci.* – 2006. – V. 119, – № 11. – P. 2204–2213. – doi: 10.1242/jcs.02932.
193. Snykers, S. In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. / J. De Kock, V. Rogiers, T. Vanhaecke // *Stem Cells.* – 2009. – V. 27, – № 3. – P. 577–605. – doi: 10.1634/stemcells.2008-0963.
194. Son, B.-R. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. / L.A. Marquez-Curtis, M. Kucia, M. Wysoczynski et al. // *Stem Cells.* – England, 2006. – V. 24, – № 5. – P. 1254–1264. – doi:

- 10.1634/stemcells.2005-0271.
195. Song, C.G. Stem cells: A promising candidate to treat neurological disorders / Y.Z. Zhang, H.N. Wu, X.L. Cao et al. // *Neural Regen. Res.* – Wolters Kluwer Medknow Publications, 2018. – V. 13, – № 7. – P. 1294–1304. – doi: 10.4103/1673-5374.235085.
 196. Song, M. Long-term effects of magnetically targeted ferumoxide-labeled human neural stem cells in focal cerebral ischemia / Y.J. Kim, Y.H. Kim, J. Roh et al. // *Cell Transplant.* – 2015. – V. 24, – № 2. – P. 183–190. – doi: 10.3727/096368913X675755.
 197. Steiner, B. Systemically administered human bone marrow-derived mesenchymal stem home into peripheral organs but do not induce neuroprotective effects in the MCAo-mouse model for cerebral ischemia / M. Roch, N. Holtkamp, A. Kurtz // *Neurosci. Lett.* – 2012. – V. 513, – № 1. – P. 25–30. – doi: 10.1016/j.neulet.2012.01.078.
 198. Sułkowski, M. Introduction of Exogenous HSV-TK Suicide Gene Increases Safety of Keratinocyte-Derived Induced Pluripotent Stem Cells by Providing Genetic “Emergency Exit” Switch. / P. Konieczny, P. Chlebanowska, M. Majka // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19, – № 197. – P. 1–16. – doi: 10.3390/ijms19010197.
 199. Takahashi, K. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors / S. Yamanaka // *Cell.* – 2006. – V. 126, – № 4. – P. 663–676. – doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
 200. Tan, G. Differential effect of myocardial matrix and integrins on cardiac differentiation of human mesenchymal stem cells. / W. Shim, Y. Gu, L. Qian et al. // *Differentiation.* – England, 2010. – V. 79, – № 4–5. – P. 260–271. – doi: 10.1016/j.diff.2010.02.005.
 201. Tanaka, E. Dose-dependent effect of intravenous administration of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in neonatal stroke mice / Y. Ogawa, T. Mukai, Y. Sato et al. // *Front. Neurol.* – 2018. – V. 9, – № 133. – P. 1–12. – doi: 10.3389/fneur.2018.00133.

202. Tatarishvili, J. Human induced pluripotent stem cells improve recovery in stroke-injured aged rats / K. Oki, E. Monni, P. Koch et al. // *Restor. Neurol. Neurosci.* – 2014. – V. 32, – № 4. – P. 547–558. – doi: 10.3233/RNN-140404.
203. Tavian, M. The vascular wall as a source of stem cells / B. Zheng, E. Oberlin, M. Crisan et al. // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2005. – V. 1044. – P. 41–50. – doi: 10.1196/annals.1349.006.
204. Telpalo-Carpio, S. iPS cells generation: an overview of techniques and methods. / J. Aguilar-Yañez, M. Gonzalez-Garza, D.E. Cruz-Vega et al. // *J. Stem Cells Regen. Med.* – 2013. – V. 9, – № 1. – P. 2–8. – doi: 10.46582/jsrm.0901002.
205. Tolar, J. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. / K. Le Blanc, A. Keating, B.R. Blazar // *Stem Cells.* – 2010. – V. 28, – № 8. – P. 1446–1455. – doi: 10.1002/stem.459.
206. Tornero, D. Human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons integrate in stroke-injured cortex and improve functional recovery / S. Wattananit, M.G. Madsen, P. Koch et al. // *Brain.* – 2013. – V. 136, – № 12. – P. 3561–3577. – doi: 10.1093/brain/awt278.
207. Toyoshima, A. Intra-Arterial Transplantation of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Mounts Neuroprotective Effects in a Transient Ischemic Stroke Model in Rats: Analyses of Therapeutic Time Window and Its Mechanisms. / T. Yasuhara, M. Kameda, J. Morimoto et al. // *PLoS One* / ed. Arumugam T. V. – Public Library of Science, 2015. – V. 10, – № 6. – P. e0127302. – doi: 10.1371/journal.pone.0127302.
208. Uccelli, A. Mesenchymal stem cells in health and disease. / L. Moretta, V. Pistoia // *Nat. Rev. Immunol.* – England, 2008. – V. 8, – № 9. – P. 726–736. – doi: 10.1038/nri2395.
209. Verkhratsky, A. Neurological diseases as primary gliopathies: A reassessment of neurocentrism / M. V. Sofroniew, A. Messing, N.C. DeLanerolle et al. // *ASN Neuro.* – 2012. – V. 4, – № 3. – P. 131–149. – doi:

- 10.1042/AN20120010.
210. Wagers, A.J. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. / R.I. Sherwood, J.L. Christensen, I.L. Weissman // *Science*. – United States, 2002. – V. 297, – № 5590. – P. 2256–2259. – doi: 10.1126/science.1074807.
 211. Wakao, S. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts / M. Kitada, Y. Kuroda, T. Shigemoto et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2011. – V. 108, – № 24. – P. 9875–9880. – doi: 10.1073/pnas.1100816108.
 212. Wang, H.-S. Mesenchymal stem cells in the Wharton’s jelly of the human umbilical cord. / S.-C. Hung, S.-T. Peng, C.-C. Huang et al. // *Stem Cells*. – England, 2004. – V. 22, – № 7. – P. 1330–1337. – doi: 10.1634/stemcells.2004-0013.
 213. Wang, S. Excess Integrins Cause Lung Entrapment of Mesenchymal Stem Cells. / L. Guo, J. Ge, L. Yu et al. // *Stem Cells*. – England, 2015. – V. 33, – № 11. – P. 3315–3326. – doi: 10.1002/stem.2087.
 214. Wang, X. Diminished expression of major histocompatibility complex facilitates the use of human induced pluripotent stem cells in monkey / M. Lu, X. Tian, Y. Ren et al. // *Stem Cell Res. Ther.* – 2020. – V. 11(1), – № 334. – P. 1–14. – doi: 10.1186/s13287-020-01847-9.
 215. Watanabe, T. A human neural stem cell line provides neuroprotection and improves neurological performance by early intervention of neuroinflammatory system / A. Nagai, A.M. Sheikh, S. Mitaki et al. // *Brain Res.* – 2016. – V. 1631. – P. 194–203. – doi: 10.1016/j.brainres.2015.11.031.
 216. Wei, N. Delayed intranasal delivery of hypoxic-preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhanced cell homing and therapeutic benefits after ischemic stroke in mice / S.P. Yu, X. Gu, T.M. Taylor et al. // *Cell Transplant.* – 2013. – V. 22, – № 6. – P. 977–991. – doi: 10.3727/096368912X657251.
 217. Wei, Z.-J. MicroRNA changes of bone marrow-derived mesenchymal stem

- cells differentiated into neuronal-like cells by Schwann cell-conditioned medium. / B.-Y. Fan, Y. Liu, H. Ding et al. // *Neural Regen. Res.* – 2019. – V. 14, – № 8. – P. 1462–1469. – doi: 10.4103/1673-5374.253532.
218. Weimann, J.M. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. / C.A. Charlton, T.R. Brazelton, R.C. Hackman et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2003. – V. 100, – № 4. – P. 2088–2093. – doi: 10.1073/pnas.0337659100.
219. Wislet-Gendebien, S. Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4. / F. Bruyère, G. Hans, P. Leprince et al. // *BMC Neurosci.* – 2004. – V. 5. – P. 33. – doi: 10.1186/1471-2202-5-33.
220. Wislet-Gendebien, S. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. / G. Hans, P. Leprince, J.-M. Rigo et al. // *Stem Cells.* – England, 2005. – V. 23, – № 3. – P. 392–402. – doi: 10.1634/stemcells.2004-0149.
221. Wu, J. Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats / Z. Sun, H.S. Sun, J. Wu et al. // *Cell Transplant.* – 2008. – V. 16, – № 10. – P. 993–1005. – doi: 10.3727/000000007783472435.
222. Wu, R. Transplantation of neural progenitor cells generated from human urine epithelial cell-derived induced pluripotent stem cells improves neurological functions in rats with stroke. / S. Luo, H. Yang, X. Hu et al. // *Discov. Med.* – United States, 2020. – V. 29, – № 156. – P. 53–64.
223. Wu, X. Regulation of differentiation in trabecular bone-derived mesenchymal stem cells by T cell activation and inflammation / W. Wang, C. Meng, S. Yang et al. // *Oncol. Rep.* – 2013. – V. 30, – № 5. – P. 2211–2219. – doi: 10.3892/or.2013.2687.
224. Xie, P. Therapeutic effect of transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on neuron regeneration in a rat model of middle cerebral artery occlusion. / M. Deng, Q.-G. Sun, Y.-G. Ma et al. // *Mol. Med.*

- Rep. – 2019. – V. 20, – № 4. – P. 3065–3074. – doi: 10.3892/mmr.2019.10536.
225. Yang, L. Challenges and Improvements of Novel Therapies for Ischemic Stroke / J. Qian, B. Yang, Q. He et al. // *Front. Pharmacol.* – 2021. – V. 12, – № 721156. – P. 1–14. – doi: 10.3389/fphar.2021.721156.
226. Yuan, T. Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurologic function in a rat model of middle cerebral artery occlusion. / W. Liao, N.-H. Feng, Y.-L. Lou et al. // *Stem Cell Res. Ther.* – 2013. – V. 4, – № 3. – P. 73. – doi: 10.1186/scrt224.
227. Zhang, H. Ili Comparisons of the therapeutic effects of three different routes of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in cerebral ischemic rats / X. fang Xie, Y. qiong Xiong, S. min Liu et al. // *Brain Res.* – Elsevier B.V., 2018. – V. 1680. – P. 143–154. – doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.017.
228. Zhang, J. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy / X. Huang, H. Wang, X. Liu et al. // *Stem Cell Res. Ther.* – 2015. – V. 6, – № 234. – P. 1–7. – doi: 10.1186/s13287-015-0240-9.
229. Zhang, X. Cotransplantation of HLA-identical mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in Chinese patients with hematologic diseases. / J.-Y. Li, K. Cao, H. Lu et al. // *Int. J. Lab. Hematol.* – England, 2010. – V. 32, – № 2. – P. 256–264. – doi: 10.1111/j.1751-553X.2009.01181.x.
230. Zheng, B. Quantitative magnetic particle imaging monitors the transplantation, biodistribution, and clearance of stem cells in vivo / M.P. Von See, E. Yu, B. Gunel et al. // *Theranostics.* – 2016. – V. 6, – № 3. – P. 291–301. – doi: 10.7150/thno.13728.
231. Zheng, W. Therapeutic benefits of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow after global cerebral ischemia / O. Honmou, K. Miyata, K. Harada et al. // *Brain Res.* – 2010. – V. 1310. – P. 8–16. – doi:

10.1016/j.brainres.2009.11.012.

232. Zuk, P.A. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. / M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2002. – V. 13, – № 12. – P. 4279–4295. – doi: 10.1091/mbc.e02-02-0105.
233. The top 10 causes of death [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (дата обращения: 09.05.2022).
234. Efficacy and Safety of MRI-based Thrombolysis in Wake-up Stroke - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Электронный ресурс]. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01525290> (дата обращения: 09.05.2022).