

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО МГУ**

На правах рукописи

Бабенко Валентина Андреевна

**Роль межклеточной передачи митохондрий в реализации
нейропротекторного действия мезенхимальных
мультипотентных стромальных клеток**

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук
Плотников Егор Юрьевич

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛАВА 1 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ГЛАВА 2 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	7
ГЛАВА 3 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
3.1. Роль дисфункции митохондрий в неврологических патологиях	12
3.1.1. Острые патологии головного мозга	12
3.1.1.1. Инсульт	12
3.1.1.2. Влияние ишемии/реперфузии мозга на функции митохондрий	13
3.1.2. Нейродегенеративные патологии	18
3.1.2.1. Болезнь Паркинсона	18
3.1.2.2. Болезнь Альцгеймера	23
3.2. Применение стволовых клеток для лечения неврологических патологий	27
3.2.1. Источники клеток и клетки, используемые для терапии	28
3.2.2. Применение стволовых клеток для лечения ишемического инсульта	30
3.2.2.1. Терапевтическое окно	34
3.2.2.2. Использование ММСК для терапии инсульта	34
3.2.3. Применение стволовых клеток для терапии нейродегенеративных патологий	40
3.3. Механизмы реализации терапевтических эффектов мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток	48
3.3.1. Дифференцировка ММСК в клетки нейральных типов	48
3.3.2. Слияние ММСК с нейральными клетками	52
3.3.3. Паракринные механизмы	54
3.3.3.1. Ангиогенные факторы	55
3.3.3.2. Антиапоптотические факторы	57
3.3.3.3. Иммуномодулирующее влияние ММСК	59
3.3.3.4. Миграция и хоуминг ММСК	61
3.4. Межклеточный транспорт митохондрий	67
3.4.1. Способы передачи митохондрий между клетками	69
3.4.2. Транспорт митохондрий по ТНТ	70
3.4.2.1. Механизмы ТНТ-опосредованного межклеточного транспорта митохондрий	72
3.4.2.2. Последствия межклеточного транспорта митохондрий	76
3.4.2.2.1. Восстановление жизнеспособности клеток-реципиентов после повреждения	76
3.4.2.2.2. Перепрограммирование клеток	80
3.4.2.3. Контроль межклеточной передачи митохондрий	81

3.4.2.4. Возможности терапевтического использования транспорта митохондрий	83
ГЛАВА 4 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	85
4.1. Получение первичной культуры нейральных клеток.	85
4.2. Мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки	86
4.2.1. Получение мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток	86
4.2.2. Иммунофенотипирование ММСК	87
4.2.3. Остеогенная и адипогенная дифференцировка	87
4.3. Получение и культивирование первичной культуры астроцитов	88
4.4. Получение ро-нулевых клеток линии PC12	88
4.5. Сокультивирование различных типов клеток и ММСК	88
4.6. Трансфицирование клеток	89
4.7. Оценка транспорта компонентов цитозоля	90
4.8. Проточная цитофлуориметрия	90
4.9. Микроскопическое исследование клеток	90
4.10. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток	90
4.11. Оценка пролиферации клеток	91
4.12. Оценка продукции лактата	92
4.13. Вестерн-блот анализ	92
4.14. Инъекция клеток в головной мозг	93
4.15. Моделирование ишемии головного мозга	94
4.16. Тест постановки конечности на опору	94
4.17. Статистический анализ данных	95
ГЛАВА 5 РЕЗУЛЬТАТЫ	96
5.1. Характеристика культуры ММСК	96
5.2. Нейральная культура, получаемая из эмбрионального мозга крысы	100
5.3. Способность ММСК к дифференцировке в нейральные клетки	101

5.4. Продукция ростовых и нейротрофических факторов ММСК	103
5.5. Межклеточный транспорт компонентов цитозоля	105
5.6. Межклеточная передача митохондрий	115
5.7. Распределение ММСК в головном мозге после внутривенного введения	119
5.8. Нейропротекторный эффект, оказываемый ММСК при лечении экспериментального ишемического инсульта	120
5.9. Усиление передачи митохондрий в клетки-реципиенты с помощью повышения продукции белка Miro1 в ММСК	125
5.10. Нейропротекторный эффект ММСК, гиперпродуцирующих Miro1	126
5.11. Повышение эффективности передачи митохондрий как следствие нарушения функции митохондрий в клетках-реципиентах	128
5.12. Влияние транспорта митохондрий на пролиферацию и дыхание клеток	131
5.13. Транспорт митохондрий в совместных культурах нейральных клеток и ММСК может происходить по туннельным нанотрубкам	133
ГЛАВА 6 ОБСУЖДЕНИЕ	137
ГЛАВА 7 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	145
ГЛАВА 8 ВЫВОДЫ	146
ГЛАВА 9 БЛАГОДАРНОСТИ	147
ГЛАВА 10 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	148

Глава 1 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A β	β -амилоидный пептид
Ang-1	ангиопоэтин-1
ANT	транслокатор адениновых нуклеотидов
APP	предшественник амилоидного белка
BDNF	нейротрофический фактор мозга
bFGF	основной фактор роста фибробластов
CCCP	карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон
Cx	коннексин
CNF	цилиарный нейротрофический фактор
DMEM	Дальбеко модифицированная среда Игла
FACS	флуоресцентно-активируемый клеточный сортинг
FITC	флуоресцеина изотиоцианат
GDNF	глиальный нейротрофический фактор
GFAP	глиальный фибриллярный кислый белок
GFP	зеленый флуоресцентный белок
GLP-1	глюкагоноподобный пептид 1
GSH	восстановленный глутатион
hEDSC	стволовые клетки, полученные из эндометрия
HLA-DR	человеческий лейкоцитарный антиген locus DR
iPSC	индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
LRRK2	обогащенная лейциновыми повторами киназа 1
MACS	магнитно-активируемый клеточный сортинг
MAP2	микротрубочко-ассоциированный белок 2
MAPK	митоген- активируемая протеинкиназа
MCP1	моноцитарный хемотаксический протеин
miR-133b	микроРНК 133b
Miro	митохондриальная Rho-ГТФаза
mitoDsRed	белок из <i>Discosoma sp.</i> , слитый с сигналом митохондриальной локализации
mitoGFP	зеленый флуоресцентный белок, слитый с сигналом митохондриальной локализации
MMP 2	матриксная металлопротеаза 2
MnSOD	супероксид дисмутаза
MPTP	1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин
NAD	никотинамидадениндинуклеотид
NADP	никотинамидадениндинуклеотид фосфат
NBM	нейробазальная среда
NeuN	нейрональные ядра
NGF	фактор роста нервов
PAI-1	ингибитор активатора плазминогена
PC12	линия клеток феохромоцитомы крысы
PE	фикоэритрин

PI3K	фосфоинозитид-3-киназа
PIN1	пролилизомераза 1
PINK	PTEN-индуцированная киназа 1
POLG	митохондриальная ДНК-полимераза γ
SDF-1	фактор стромальных клеток 1
TGF- β 1	трансформирующий фактор роста- β 1
TNF	фактор некроза опухоли
VEGF	фактор роста эндотелия сосудов
АПК	антиген-презентирующие клетки
АФК	активные формы кислорода
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВВ	внеклеточные везикулы
ГСК	гемопоетическая стволовая клетка
ГЭБ	гемато-энцефалический барьер
ДК	дендритные клетки
ДОФА	диоксифенилаланин
И/Р	ишемия/реперфузия
КГД	кислородно-глюкозная депривация
КМ-ММСК	мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, полученные из костного мозга
КМ-МНК	моноклеарные клетки, полученные из костного мозга
ММСК	мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки
мтДНК	митохондриальная ДНК
ОСМА	окклюзия средней мозговой артерии
РС	рассеянный склероз
СК	стволовые клетки
ТНТ	туннельные нанотрубочки
ФСБ	фосфатно-солевой буфер
ФСК	фетальные стволовые клетки
ЦВЗ	церебро-васкулярные заболевания
ЦНС	центральная нервная система
ЩК	щелевой контакт
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПК	эндотелиальные прогениторные клетки
ЭСК	эмбриональные стволовые клетки
ЭТС	эмбриональная телячья сыворотка
ЭТЦ	электрон-транспортная цепь

Глава 2 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Взаимодействие стволовых клеток с другими типами клеток привлекает огромное внимание исследователей из-за широких терапевтических перспектив использования клеточных технологий. На данный момент известно, что донорские стволовые клетки способны достаточно длительное время сохраняться в тканях реципиента, однако их полноценная интеграция и дифференцировка в функциональные клетки остаются во многих случаях недоказанными. В то же время известно, что стволовые клетки активно обмениваются сигналами с окружающей тканью, особенно если речь идет о мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках (ММСК). ММСК могут взаимодействовать с клетками-соседями посредством паракринных факторов [216], которые они продуцируют, внеклеточных везикул [198], прямых контактов с образованием межклеточных цитоплазматических мостиков, способных передавать компоненты цитоплазмы [122]. Последний механизм привлекает все большее внимание исследователей и как фундаментальное явление во взаимодействии различных типов клеток, и как основа для клеточной терапии, особенно с тех пор как в 2004 году была открыта возможность межклеточного транспорта митохондрий [318]. Возможность практического применения явления транспорта митохондрий лежит в области терапии различных заболеваний, сопряженных с повреждением митохондрий, включая наследственные митохондриальные заболевания, нейродегенеративные и нейромышечные заболевания, ишемические и воспалительные повреждения, онкологические заболевания [31]. Известно, что наиболее часто явление межклеточного транспорта митохондрий наблюдается именно в ситуации, когда одна из клеток-партнеров является стволовой. В качестве клетки-реципиента могут выступать самые различные типы клеток: возможность передачи митохондрий из стволовой

клетки была показана для кардиомиоцитов [304], эпителия почки [302], легкого [159], нейральных клеток [300], гладкомышечных клеток сосудов [395].

Наиболее широко описаны механизмы транспорта митохондрий по туннельным нанотрубкам – тонким протяженным межклеточным структурам, ограниченным плазматической мембраной и содержащим в себе цитоплазму [318]. На сегодняшний день существует ряд работ, демонстрирующих передачу митохондрий из стволовых клеток и выраженные терапевтические эффекты при введении клеток *in vivo*. В частности, показана прямая зависимость как транспорта митохондрий, так и реализации положительных эффектов ММСК на альвеолярный эпителий от функционирования Miro1, Rho-ГТФазы, обеспечивающей передвижение митохондрий вдоль цитоскелета туннельных нанотрубочек [4]. Для получения более выраженных терапевтических эффектов актуальным является дальнейшее изучение механизмов передачи митохондрий в клетки-реципиенты с целью поиска способов ее усиления.

Целью работы являлось исследование механизмов взаимодействия мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток с нейральными клетками, а также связи такого взаимодействия с нейропротекторными эффектами ММСК при повреждении головного мозга

Задачи исследования:

1. Изучить терапевтические эффекты ММСК при лечении экспериментального ишемического инсульта у крыс
2. Проанализировать механизмы терапевтического действия ММСК: способность ММСК дифференцироваться в клетки нейральных типов при совместном культивировании, а также продукцию ростовых и нейротрофических факторов
3. Изучить передачу компонентов цитозоля и митохондрий между ММСК и нейральными клетками в модели сокультивирования *in vitro*
4. Изучить роль Rho-ГТФазы Miro1 в передаче митохондрий из ММСК в нейральные клетки и в реализации нейропротекторных эффектов ММСК

5. Изучить влияние повреждения митохондрий в клетках-реципиентах на эффективность межклеточного транспорта митохондрий, и оценить восстановление митохондриальных функций в таких клетках за счет передачи митохондрий из ММСК

Научная новизна работы

В экспериментах по сокультивированию ММСК и нейронов, а также астроцитов впервые была показана передача как низкомолекулярных компонентов цитоплазмы, так и митохондрий, которая носила разнонаправленный характер. При этом транспорт митохондрий происходил только из ММСК в нейроны или астроциты.

Впервые было обнаружено, что после сокультивирования ММСК и нейронов увеличивается количество белка Miro1 в ММСК, опосредующего движение митохондрий по микротрубочкам как внутри клетки, так и между клетками.

Впервые показано, что направленное увеличение продукции Miro1 в ММСК с помощью лентивирусной трансфекции приводит к повышению эффективности транспорта митохондрий из ММСК в астроциты по сравнению с нативными ММСК. Трансплантация ММСК, гиперэкспрессирующих Miro1, животным с экспериментальным ишемическим инсультом приводила к более полному восстановлению функций мозга по сравнению с обычными ММСК, что говорит о значительном вкладе транспорта митохондрий в постишемическую нейропротекцию.

Обнаружено, что эффективность митохондриального транспорта из ММСК в нейральные клетки возрастает, если в последних нарушена функция митохондрий. Также наблюдалось восстановление митохондриальной функции в нейральных клетках-реципиентах после сокультивирования с ММСК

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенные исследования прежде всего раскрывают фундаментальные механизмы, лежащие в основе терапевтического действия экзогенных ММСК и открывают перспективы для изучения возможностей использования ММСК в

терапии ишемического инсульта и других неврологических патологий. Полученные результаты могут быть использованы в качестве основы для разработки способов направленного изменения свойств ММСК для увеличения их способности оказывать нейропротекторное действие и улучшать функционирование головного мозга при различных повреждениях. Результаты данного исследования используются в лекционном курсе «Молекулярная биология митохондрий» факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При сокультивировании ММСК с нейральными клетками *in vitro* происходит однонаправленная передача митохондрий из ММСК в нейроны и астроциты
2. ММСК, предварительно сокультивированные с нейральными клетками, оказывают более выраженный терапевтический эффект у животных с окклюзией средней мозговой артерии, чем нативные ММСК
3. При сокультивировании ММСК с нейральными клетками не происходит дифференцировки ММСК в нейроны или астроциты, но увеличивается продукция нейротрофина BDNF и меняется его внутриклеточная локализация.
4. Увеличение продукции белка Miro1 в ММСК с помощью лентивирусной трансфекции повышает эффективность транспорта митохондрий из ММСК в астроциты. Введение таких ММСК животным с экспериментальным ишемическим инсультом снижает неврологический дефицит.

Методология и методы диссертационного исследования

Используемые в данном исследовании методы являются одним из достоинств диссертационной работы. Благодаря разработке и использованию модели сокультивирования ММСК с первичными культурами нейронов или астроцитов стало возможным изучение феномена межклеточного транспорта митохондрий. Для визуализации митохондрий использовали трансфекцию

клеточных культур лентивирусами, кодирующими гены флуоресцентных белков с сигналом митохондриальной локализации, что исключало межклеточный обмен красителя через культуральную среду. Также в работе был использован метод конфокальной микроскопии со сканированием по z-оси, что позволило однозначно идентифицировать расположение митохондрий внутри конкретной клетки.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были доложены на XVIII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2015), II Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2015), 42 FEBS Congress: from molecules and cells and back (Jerusalem, 2017), VIII Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2017).

Глава 3 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

3.1. Роль дисфункции митохондрий в неврологических патологиях

3.1.1. Острые патологии головного мозга

Ишемия/реперфузия головного мозга является распространенной патологией и существенной медицинской проблемой по причине растущей заболеваемости и смертности, вызванной ею. У взрослых людей причиной ишемии обычно является ишемический инсульт и остановка сердца. У детей ишемия мозга чаще всего является осложнением, полученным в процессе родов, приводя к гипоксически-ишемической энцефалопатии.

В обоих случаях для предотвращения повреждения и гибели нервных клеток необходимо восстановить кровоток и, как следствие, доставку питательных веществ и кислорода в ишемизированный мозг. Однако собственно реперфузия вызывает дополнительное повреждение мозга, называемое «реперфузионным повреждением». Вклад ишемии/реперфузии мозга в структуру смертности населения в значительной степени не зависит от возраста и этиологии.

3.1.1.1. Инсульт

Федеральная служба государственной статистики Российской Федерации рассматривают церебро-васкулярные заболевания (ЦВЗ) как одну нозологическую форму, которая включает как острые нарушения мозгового кровообращения, так и хронические. При этом среди ЦВЗ инсульт отдельно не выделяют, поэтому достоверных статистических данных для инсульта не существует. По данным органов официальной статистики РФ ЦВЗ занимают второе место в структуре общей смертности населения (23,4%). Ежегодная смертность от инсульта в России остается одной из наиболее высоких в мире (374 на 100 тыс. населения) [444].

При своевременной диагностике ишемический инсульт может быть частично обращен введением тромболитических препаратов или физическим удалением эмбола. Нейроны, лежащие дистальнее закупоренного сосуда и кровоснабжаемые только из него, при длительной полной ишемии погибают.

Погибшие нервные клетки образуют зону инфаркта мозга, называемую очагом некроза. Большой клинический интерес представляют группы нервных клеток, находящиеся в зоне, которая окружает очаг некроза, в так называемой зоне ишемической полутени. Эта область частично перфузируется из коллатеральных кровеносных сосудов, и таким образом более устойчива к ишемическому повреждению. В отличие от нейронов зоны очага некроза, нейроны в зоне ишемической полутени погибают отсроченно в течение периода реперфузии путем апоптоза. Отложенность гибели этих клеток позволяет использовать время до ее наступления для терапевтического вмешательства. Таким образом очень важно начинать терапию, направленную на выживание ишемизированных нейронов, до восстановления проходимости по закупоренному сосуду [91].

3.1.1.2. Влияние ишемии/реперфузии мозга на функции митохондрий

Известно, что митохондрии играют важную роль в патогенезе повреждения при ишемии/реперфузии через генерацию активных форм кислорода (АФК), митохондриальную дисфункцию и митохондриальный путь апоптоза.

Ишемия

Митохондрии мозга чувствительны к ишемическому повреждению, активность электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) нарушается даже в условиях умеренно сниженного мозгового кровотока, в то время как еще не происходит немедленных изменений уровня АТФ или фосфокреатина [5; 6].

Хотя митохондрии чувствительны к неполной ишемии, наиболее значительные изменения в транспорте электронов и проницаемости митохондриальной мембраны для ионов происходят уже на первых нескольких минутах полной ишемии. Митохондриальное повреждение в ответ на полную ишемию зависит от длины периода полной ишемии [349].

Большинство биохимических изменений, которые происходят во время ишемии, изучались на моделях тепловой ишемии, при которой температура поддерживалась на уровне физиологической или близкой к ней.

Показано, что кратковременные ишемические эпизоды вызывают увеличение электроотрицательности комплексов электрон-транспортной цепи и утечку электронов [56; 78; 195], хотя и не нарушают антиоксидантную способность митохондрий; таким образом, сохраняется способность нейтрализовать АФК, продуцируемые во время реперфузии [13].

Длительные периоды ишемии могут повреждать комплексы ЭТЦ. Показано, что снижение активности и структурное повреждение субъединиц происходит во всех комплексах дыхательной цепи через 60 минут тепловой ишемии, но комплексы I и III, по-видимому, являются наиболее чувствительными к ишемическому повреждению [313]. Одним из механизмов, обуславливающих митохондриальное повреждение при ишемии, является снижение активности транслокатора адениновых нуклеотидов, функция которого заключается в обеспечении обмена цитоплазматического АДФ на АТФ, произведенный в результате окислительного фосфорилирования. Транспортная активность транслокатора адениновых нуклеотидов снижается в результате накопления ацил-СоА, дезэнергизации внутренней митохондриальной мембраны и потери адениновых нуклеотидов, а также при уменьшении содержания самого аденинового транслокатора [145]. Кроме того, молекулярное повреждение комплекса V (АТФ-синтазы) было показано после ишемического повреждения печени крысы [389]. Поврежденные комплексы ЭТЦ могут быть более подвержены утечке электронов, и это может продолжаться в течение длительного периода после реперфузии [161].

Гидролиз АТФ во время ишемии вызывает повышение концентрации свободного неорганического фосфата, что увеличивает продукцию пероксида водорода, и как следствие, перекисное окисление липидов мембран, что увеличивает проницаемость внутренней мембраны митохондрий [187]. Гидролиз АТФ и анаэробный гликолиз уменьшают внутриклеточный pH, что может влиять на активность многих ферментов и еще больше повреждать клеточные структуры во время ишемии [307]. Тепловая ишемия вызывает прогрессирующее снижение содержания железо-серных белков, связанных с

комплексом I (NADH-дегидрогеназой) или комплексом II (сукцинатдегидрогеназой) ЭТЦ и приводит к освобождению ионов Fe^{2+} , которые во время реперфузии играют решающее значение в образовании гидроксильного радикала путем восстановления H_2O_2 [18] в реакции Фентона.

Ишемия также приводит к нарушению антиоксидантной функции митохондрий и, тем самым, делает клетки более восприимчивыми к окислительному стрессу. Активность митохондриальных глутатионовых ферментов (таких как глутатионпероксидаза), по-видимому, относительно стабильна во время ишемии [12], однако уровень митохондриального восстановленного глутатиона GSH может снижаться во время тепловой ишемии [195]. Митохондриальная изоформа супероксиддисмутазы MnSOD считается более восприимчивой к ишемии, чем цитозольные CuSOD и ZnSOD. Через 60 минут глобальной ишемии органа активность MnSOD значительно снижается [12], что показано, например, на перфузированном сердце крысы.

Во время ишемии происходит ингибирование Na^+/K^+ -обменника с увеличением уровня цитозольного Na^+ . Это затем вызывает повышение цитозольного Ca^{2+} , которое увеличивает митохондриальный Ca^{2+} и, таким образом, провоцирует повышение проницаемости внутренней мембраны [76]. Недавнее исследование показывает, что митохондрии играют определенную роль в регуляции экспрессии фактора индукции гипоксии 1 (HIF-1), фактора транскрипции, регулирующего активацию нескольких чувствительных к гипоксии генов. Полноценное функционирование ЭТЦ необходимо для связывания HIF-1 с ДНК и последующей активации транскрипции таких чувствительных к гипоксии генов, как гены эритропоэтина, VEGF, гликолитических ферментов и переносчиков глюкозы [2].

Реперфузия

В период ишемии конститутивно экспрессируемая ксантиндегидрогеназа превращается в ксантиноксидазу со скоростью, пропорциональной длительности ишемии. Более того, распад АТФ приводит к накоплению гипоксантина, субстрата для ксантиноксидазы. Общеизвестно, что во время

реперфузии продукция супероксид анион радикала на поверхности клетки опосредуется превращением гипоксантина в мочевую кислоту под действием ксантиноксидазы. Кроме того, АФК могут также продуцироваться активированными нейтрофилами, которые инфильтрируют ткани после И/Р [148].

Кроме перечисленных источников АФК, важную роль роль в реперфузионном повреждении могут играть митохондриальные АФК. Волна продукции супероксид анион радикала происходит из ЭТЦ митохондрий во время реперфузии, когда восстанавливается поступление кислорода в клетку. С восстановлением оксигенации во время реперфузии также связано повреждение комплексов ЭТЦ, что приводит к утечке электронов, которые реагируют с кислородом с образованием большого количества супероксид анион радикала [56; 78; 161; 338].

В экспериментальных системах И/Р было показано, что митохондрии могут играть огромную роль в окислительном повреждении. На модели И/Р печени было показано, что митохондрии являются важным источником продукции перекиси водорода при использовании специфических ингибиторов ЭТЦ [128]. Было показано, что воздействие аноксии и реоксигенации на изолированные гепатоциты, приводит к продукции супероксид анион радикала и высвобождению лактатдегидрогеназы. На это не влияло воздействие аллопуринолом, ингибитором ксантиноксидазы, что указывает на то, что митохондрии являлись основным источником продукции супероксид анион радикала [51]. Когда гипоксии и реоксигенации были подвергнуты выделенные митохондрии, происходило снижение дыхания, которое было связано с окислительным повреждением митохондриальных белков и появлением такого маркера перекисного окисления липидов как малоновый диальдегид. Вдобавок к этому инкубация гепатоцитов с растворимыми антиоксидантами эффективно поддерживала дыхание митохондрий после гипоксии / реоксигенации [327].

Многие данные свидетельствуют о том, что в условиях тяжелой ишемии скомпрометированная антиоксидантная система может не справиться с гиперпродукцией АФК. Высокое содержание супероксида при сниженной активности MnSOD может приводить к образованию таких цитотоксических агентов, как пероксинитрит в результате реакции между супероксидом и митохондриальным оксидом азота [281]. Недостаточные уровни GSH могут вызвать накопление H_2O_2 , который, хотя и не является свободным радикалом, может привести к образованию более токсичных форм кислорода (гидроксил радикал) через реакцию Фентона. Было показано, что 90% O_2 , присутствующего в митохондриях вскоре после реперфузии сердца существует в форме гидроксильного радикала [80]. Более того, уровни провоспалительных цитокинов, таких как TNF, могут повышаться после И/Р и стимулировать образование АФК в митохондриях. Продукция АФК, вызванная TNF, как было показано, опосредуется церамидом, который образуется в TNF-сигнальном пути [118] и вызывает гиперпродукцию пероксила водорода-потенциального источника гидроксильного радикала.

Острый окислительный стресс ингибирует митохондриальное дыхание, и АФК (особенно гидроксил радикал и пероксинитрит) вступают в реакцию с митохондриальными и экстрамитохондриальными структурами, включая белки, липиды и ДНК, и повреждают их. При повреждении белков, входящих в комплексы ЭТЦ, происходит дальнейшее ингибирование продукции АТФ и взаимодействий между белками ЭТЦ, что может усилить утечку электронов и последующее образование АФК [441]. Помимо белков АФК также реагируют с фосфолипидами, и, показано, что продукт такой реакции 4-гидроксиноненал, способен вызывать дальнейшее повреждение мембран и оказывать воздействие на проницаемость внутренней мембраны митохондрий [63]. Это еще больше ухудшает электронный транспорт между комплексами ЭТЦ и усиливает образование перекиси водорода. Кроме того, окисление пиридиновых нуклеотидов ($NADH/NAD$ и $NADPH/NADP$) приводит к повышению неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны и

последующему нарушению окислительного фосфорилирования, в результате чего не продуцируется АТФ [72; 256].

Чрезмерный вход Ca^{2+} в митохондрии после реперфузии может также ингибировать окислительное фосфорилирование и увеличивать проницаемость внутренней мембраны [76]. Также на проницаемость внутренней мембраны митохондрий влияет внутриклеточный pH, который, как известно, падает во время ишемии и возвращается к нормальным значениям только спустя длительное время реперфузии, при этом значительно растет гибель клеток [307]. Дефицит GSH негативно влияет на продукцию АТФ, проницаемость внутренней мембраны и жизнеспособность клеток [238].

МтДНК более восприимчива к окислительному повреждению, поскольку она не содержит гистонов и находится сравнительно близко к ЭТЦ, где и происходит продукция АФК. Esteve и коллеги показали прямую зависимость между окислением мтДНК и истощением восстановленного глутатиона [106].

Митохондриальная ДНК имеет менее эффективные механизмы репарации, чем ядерная, и окислительный стресс может приводить к образованию делеций и мутаций в митохондриях, которые приводят к образованию гетероплазмии (накоплению в одной клетке мтДНК дикого типа и мутантной мтДНК) [338]. В мтДНК закодированы тринадцать субъединиц ЭТЦ; остальные белки кодируются геномной ДНК. Потому как мтДНК не имеет интронов, любая мутация затрагивает кодирующую область ДНК, что приводит к инактивации одного или более комплексов ЭТЦ [338]. Это может приводить к ингибированию окислительного фосфорилирования и увеличению продукции АФК путем увеличения утечки электронов с заингибированных комплексов, в результате чего снижается образование АТФ [338; 441].

3.1.2. Нейродегенеративные патологии

3.1.2.1. Болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона с клинической точки зрения характеризуется прогрессирующей ригидностью, брадикинезией и тремором конечностей, а с патологической - гибелью нейронов преимущественно в черной субстанции

мозга и присутствием в нейронах телец Леви, цитоплазматических включений, иммунореактивных на α -синуклеин и убиквитин. Предположительно митохондрии первыми вовлекаются в процесс развития болезни Паркинсона. Так было показано что МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин), чей метаболит MPP⁺ ингибирует комплекс I ЭТЦ митохондрий, вызывает паркинсонизм у героиновых наркоманов. У лабораторных животных, которым систематически вводили ингибиторы первого комплекса ЭТЦ митохондрий, такие как ротенон [33] или МРТР [111], развиваются клинические признаки паркинсонизма, при этом в мозге наблюдалась характерная для болезни Паркинсона дегенерация нейронов черной субстанции. Показано, что окислительный стресс является одним из основных механизмов ротеноновой токсичности при моделировании болезни Паркинсона, так как терапия антиоксидантами тормозила развитие патологии [336]. Также у пациентов с идиопатической болезнью Паркинсона в черной субстанции отмечается снижение количества белков, входящих в состав комплекса I, и истощение глутатиона [325]. Митохондриальные белки, кодируемые как в мтДНК, так и в ядре, связаны с развитием болезни Паркинсона. Было показано, что кодируемые в ядре гены α -синуклеина, паркина, убиквитин-карбокси-терминальной гидролазы L1, *DJ-1*, PTEN-индуцированной киназы 1 (*PINK1*), обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (*LRRK2*), ядерного рецептора *NURR1*, *HTRA2* и tau-белка напрямую или косвенно связаны с нарушением работы митохондрий. Так, в некоторых случаях наследственные мутации в мтДНК приводят к развитию паркинсонизма. Например, мутация G11778A, наблюдаемая при атрофии зрительного нерва Лебера, ассоциирована с паркинсонизмом, чувствительным к l-DOPA, также при этом наблюдали деменцию, дистонию, офтальмоплегию и атаксию [348]. Примечательно, что эта мутация находится в гене субъединицы комплекса I митохондрий. Мутации в гене полимеразы- γ (*POLG*), расположенном в ядерном геноме, нарушают репликацию мтДНК и приводят к множественным делециям в мтДНК, обычно

вызывая хроническую прогрессирующую внешнюю офтальмоплегию и миопатию. Очень часто мутации в POLG также приводят к развитию БП [227].

Участие мтДНК в несиндромном развитии болезни Паркинсона изучено намного менее подробно. Было показано, что нейроны черной субстанции мозга у пациентов с болезнью Паркинсона содержат повышенный уровень соматических делеций в мтДНК, по сравнению с контрольными клетками, хотя высокие уровни делеций также наблюдаются и при клеточном старении [29; 192]. При этом не было обнаружено значимых отличий в частоте наследственных или приобретенных точечных мутаций в генах комплекса I ЭТЦ митохондрий или тРНК между пациентами с БП и контрольными группами [347; 402].

Мутации в гене α -синуклеина связаны с аутосомно-доминантной наследственной формой болезни Паркинсона. Альфа-синуклеин является основным компонентом телец Леви, и первичный эффект мутаций в гене α -синуклеина, вероятно, проявится в усиленном образовании олигомерных или фибриллярных агрегатов этого белка. Похоже, существуют взаимосвязи между аномальным накоплением или деградацией белка, окислительным стрессом и дисфункцией митохондрий. Например, у трансгенных мышей избыточная экспрессия α -синуклеина ухудшает митохондриальную функцию, усиливает окислительный стресс и усиливает патологию черной субстанции мозга, индуцированную МРТР [354]. Более того, в недавнем исследовании сверхэкспрессия мутантного (A53T) α -синуклеина у мышей приводила к повреждению митохондрий, при этом в последних иммунохимически выявлялся α -синуклеин. Это позволяет предположить, что мутантный α -синуклеин может напрямую нарушать работу митохондрий [232]. Также показано, что у мышей нокаут по α -синуклеину защищает их от характерных проявлений болезни Паркинсона, вызванных хроническим введением МРТР [111] и других митохондриальных токсинов [179]. Таким образом, α -синуклеин, по-видимому, опосредует токсические эффекты МРТР.

Мутации в гене паркина связаны с аутосомно-рецессивной ювенальной формой болезни Паркинсона. Ген паркина кодирует убиквитин E3-лигазу, и первичная аномалия, таким образом, оказывается локализованной в системе убиквитин-протеасомной деградации. Однако, как указано выше, по-видимому, существуют тесные взаимосвязи между системой убиквитин-протеасомной деградации, окислительным стрессом и дисфункцией митохондрий. С одной стороны, дефицит паркина или мутации в последовательности белка приводят к окислительному стрессу и дисфункции митохондрий. Например, дрозофилы [295] и мыши [283] с дефицитом паркина демонстрируют митохондриальные нарушения и повышенный окислительный стресс, а человеческие лейкоциты с мутациями паркина обладают избирательным нарушением активности комплекса I митохондрий [246]. С другой стороны, митохондриальная дисфункция и окислительный стресс могут влиять на функцию паркина и усугублять проявление имеющихся в нем мутаций. Так, S-нитрозилирование паркина, ингибирует его убиквитин-лигазную активность, нивелируя тем самым его защитные функции. Также известно, что уровень S-нитрозилирования паркина повышен *in vitro* и *in vivo* у мышей с экспериментальной БП, а также у пациентов с БП и с болезнью диффузных телец Леви. Исходя из этого, можно предположить, что ингибирование убиквитин E3 лигазной активности паркина S-нитрозилированием, вероятно, вносит вклад в дегенеративные процессы, нарушая убиквитинирование субстратов паркина [71]. Напротив, сверхэкспрессия глутатион-S-трансферазы, которая играет роль в детоксикации продуктов окислительных повреждений, подавляет нейродегенерацию у дрозофил с мутациями в паркине [418].

Мутации в гене *DJ-1* также связаны с аутосомно-рецессивной ювенальной формой болезни Паркинсона [39]. Мутации, связанные с нарушением функции DJ-1, приводят к раннему началу БП. Сообщается, что DJ-1 взаимодействует с α -синуклеином [239], паркином [243] и PINK1 [379]. Функция DJ-1 неизвестна, но сообщается, что его окисленная изоформа накапливается в нейронах после окислительного стресса. По-видимому,

функция DJ-1 заключается в защите от клеточной гибели, вызванной окислительным стрессом. Он может действовать как редокс-сенсор: окислительный стресс вызывает окисление остатка цистеина (C106), что приводит к перемещению белка в митохондрию. Мутации критического остатка цистеина (C106) нарушают митохондриальную релокализацию этого белка, что отменяет защитный эффект DJ-1 на гибель нейронов [50]. Было также показано, что гиперэкспрессия DJ-1 приводит к гиперфосфорилированию киназы Akt и, как следствие, увеличению выживаемости клеток [172]. Мыши с дефицитом DJ-1 являются сверхчувствительными к MPTP и окислительному стрессу [173]. Более того, у дрозофил DJ-1 подвержен окислительной инактивации при старении, что в свою очередь повышает чувствительность нейронов к окислительному стрессу и, вероятно, может объяснять возникновение спорадической формы БП в пожилом возрасте. Таким образом, DJ-1 в нейронах черной субстанции мозга, вероятнее всего, выполняет защитную функцию при окислительном повреждении, и ингибирование функции данного белка может приводить к развитию БП и синдромов паркинсонизма.

Мутации в гене *PINK1* представляют собой третью форму аутосомно-рецессивной ювенольной формы болезни Паркинсона [392]. *PINK1* представляет собой киназу, локализованную в митохондриях [346], которая, как и DJ-1, по-видимому, защищает клетки от гибели. Гиперэкспрессия белка дикого типа *PINK1* предотвращает апоптоз за счет уменьшения высвобождения цитохрома *c* и активации каспазы, и этот эффект исчезает при наличии мутаций, связанных с развитием болезни Паркинсона, и мутаций, инактивирующих киназу [296]. Было показано, что у дрозофил дефицит *PINK1* вызывает митохондриальную патологию, повышенную чувствительность к параквату и ротенону, а также дегенерацию дофаминергических нейронов. Эта патология напоминает последствия от мутаций в паркине, эффект которых может быть нивелирован гиперэкспрессией паркина, но не DJ-1 [433]. Таким образом, *PINK1*, вероятно, функционирует аналогично паркину.

Мутации в гене *LRRK2* являются наиболее распространенной известной причиной наследственной формы БП с поздним началом, а также составляют 1-2% спорадических поздних случаев заболевания. На основе последовательности *LRRK2* можно предположить, что белок имеет ROC-COR GTP-азный домен, киназный домен MAPK киназы и домены WD40. Недавно West et al показали, что большая часть *LRRK2* в человеческих нейронах локализована в цитоплазме, и 10% ассоциированы с внешней мембраной митохондрий. Также известно, что *LRRK2* по функции является киназой, и что две связанные с развитием болезни мутации R1441C и G2019S, не влияют значительно на уровень экспрессии *LRRK2*, его превращения и локализацию в клетке. Более того, *in vitro* с использованием рекомбинантной *LRRK2* показано увеличение киназной активности, вызванной вышеупомянутыми мутациями [417], что, как полагают, играет центральную роль в развитии *LRRK2*-ассоциированной БП.

Ген *HTRA2* (также известный как OMI), как недавно было показано, также связан с развитием БП [362]. Мутация G399S была обнаружена у 4 из 414 пациентов со спорадической формой заболевания и ни у одного из 313 контрольных пациентов. Дополнительный полиморфизм, A141S, был обнаружен в гетерозиготном состоянии у 3% пациентов контрольной группы и у 6,2% пациентов с БП. В соответствии с ролью *HTRA2* в поддержании функции митохондрий, гомозиготный *Htra2*-нокаут мышей показал развитие стриарной дегенерации и паркинсонизма [234]. Экспрессия в культуре клеток мутаций G399S и A141S, обнаруженных у людей с БП, нарушает нормальную активность протеазы *HTRA2*, вызывает набухание митохондрий, уменьшает потенциал митохондриальной мембраны и увеличивает смертность клеток [362].

3.1.2.2. Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера клинически характеризуется прогрессирующим снижением когнитивных функций и патологическим накоплением сенильных бляшек, состоящих в основном β -амилоидного пептида ($A\beta$), а также

нейрофибриллярных клубков, состоящих из гиперфосфорилированного тау-белка. Около 5-10% случаев болезни Альцгеймера являются наследственными и имеют аутосомно-доминантный тип наследования с ранним началом развития заболевания. Известны три белка, мутации которых, связаны с такими наследственными случаями: предшественник амилоидного белка (APP), который последовательно расщепляется β - и γ -секретазами для получения $A\beta$ -пептида, а также пресенилины 1 и 2 (PS1 и PS2) типов. Спорадическая форма болезни Альцгеймера возникает почти у половины всех людей старше 85 лет и также связана с накоплением цитоксических белков и пептидов. Точный патогенетический механизм развития болезни Альцгеймера не известен, существует несколько гипотез о механизмах развития заболевания, в том числе рассматривающих в качестве ключевого момента наличие хронического воспалительного процесса в головном мозге. Также было показано, что митохондриальная дисфункция и развитие окислительного стресса имеют место в патогенезе болезни Альцгеймера. Окислительное повреждение в головном мозге происходит на ранних этапах развития болезни Альцгеймера еще до начала обширного накопления бляшек [259]. Так, на мутантных мышах с поврежденным APP было показано, что развитие окислительного стресса предшествует накоплению β -амилоидного пептида и повышению экспрессии генов, связанных с митохондриальным метаболизмом и апоптозом, происходящим в нейронах [309]. Кроме того, такое окислительное повреждение и митохондриальная дисфункция, вероятно, имеют причинно-следственную связь с накоплением патологических форм белков и пептидов, ассоциированных с болезнью Альцгеймера. Обработка пероксидом водорода нейронов, выделенных из морской свинки, увеличивала уровень внутриклеточного $A\beta$ [267]. Также снижение митохондриального потенциала за счет добавления разобщителя дыхания и окислительного фосфорилирования, CCCP, в культуру астроцитов приводило к амилоидогенному процессингу APP и как следствие внутриклеточному накоплению $A\beta$, что, например, наблюдается в астроцитах при синдроме Дауна [49]. У трансгенных мышей,

несущих двойную мутацию в генах APP и митохондриальной форме антиоксидантного фермента MnSOD, наблюдалось увеличение уровня A β в головном мозге и отложения бляшек по сравнению с мутацией только в гене APP [208].

Недавно было описано несколько путей, связывающих окислительный стресс с развитием болезни Альцгеймера. Окислительный стресс может активировать сигнальные пути, которые переключают созревание белков APP или тау-белка. Например, было показано, что окислительный стресс увеличивает экспрессию β -секретазы за счет активации c-Jun-амино-терминальной киназы и митоген-активированной протеинкиназы p38 (MAPK) [378] и увеличивает аномальное фосфорилирование белка tau за счет активации гликогенсинтазы киназы 3 β [226]. Также для патогенеза заболевания может быть важна индуцированное окислительным стрессом повреждение важных клеточных молекул. Так, в протеомном исследовании было показано, что пролилизомераза Pin1 особенно чувствительна к окислительному повреждению [365]. Pin1 катализирует конформационные изменения белков, которые влияют на процессинг как APP, так и tau. Нокаут Pin1 увеличивает амилоидогенное созревание APP и повышает внутриклеточные уровни A β у мышей [292]. Также было показано, что у мышей с нокаутом Pin1 обнаруживается гиперфосфорилирование белка tau, моторные и поведенческие отклонения и дегенерация нейронов [220].

В настоящий момент времени имеются свидетельства в пользу того, что мтДНК может участвовать в митохондриальной дисфункции, наблюдаемой у пациентов с болезнью Альцгеймера. Если мтДНК пациента перенести в клеточную линию с дефицитом мтДНК, то полученные гибриды воспроизведут нарушения в работе дыхательной цепи, наблюдаемые в мозге и других тканях у пациентов с болезнью Альцгеймера. Это позволяет предположить, что нарушения, по крайней мере, частично могут переноситься вместе с аномалиями мтДНК [372]. Однако выявление мутаций мтДНК, специфичных для болезни Альцгеймера, является собой достаточно сложную задачу. Полное

секвенирование мтДНК 145 пациентов с болезнью Альцгеймера и 128 контрольных пациентов не выявило значимой связи с митохондриальной гаплогруппой или с наследственными мутациями мтДНК [104]. Однако в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдается увеличение гетероплазматических мутаций контрольной области мтДНК в среднем на 63%, а у людей старше 80 лет наблюдается увеличение мутаций на 130%. Эти мутации преимущественно изменяют известные регуляторные элементы мтДНК и подавляют митохондриальную транскрипцию и репликацию.

Наконец, многие из белков, вовлеченных в патогенез болезни Альцгеймера, непосредственно связаны с митохондриями или митохондриальными белками. Было показано, что APP в своем составе содержит последовательность, имеющую митохондриальный адрес. В трансфицированных клетках и трансгенных мышах, сверхэкспрессирующих APP, данный белок блокирует митохондриальную систему импорта белков, вызывая митохондриальную дисфункцию и нарушая энергетический метаболизм [9]. Было также показано, что A β может связываться с митохондриальным белком матрикса, называемым A β -связывающей алкогольдегидрогеназой (ABAD) [228]. Блокировка взаимодействия A β и ABAD подавляет A β -индуцированный апоптоз и образование свободных радикалов нейронах. Напротив, избыточная экспрессия ABAD у трансгенных мышей (мутантных по APP) увеличивает окислительный стресс и нарушает память. В двух других исследованиях было показано, что A β взаимодействует с митохондриями, ингибируя активность цитохромоксидазы и увеличивая образование свободных радикалов [77; 231]. A β также ингибирует активность α -кетоглутаратдегидрогеназы в изолированных митохондриях [53], а дефицит α -кетоглутаратдегидрогеназы [124] и активности цитохромоксидазы [291] ранее наблюдали в головном мозге и других тканях при болезни Альцгеймера.

3.2. Применение стволовых клеток для лечения неврологических патологий

Неврологические патологии, при которых возможно применение клеточных технологий можно разделить на несколько групп. Первую группу представляют неврологические заболевания, вызванные острым повреждением. Сюда входят такие заболевания как инсульт, повреждение спинного мозга, неонатальная ишемически-гипоксическая энцефалопатия или перинатальная асфиксия и травма головного мозга. Время возникновения нарушений зачастую известно, развитие заболевания достигает своего пика в течение нескольких часов и завершается к концу первых суток.

Другую группу представляют хронические нейродегенеративные патологии. Для них время начала нарушений в мозге неизвестно, они дают о себе знать, когда начинают проявляться клинически. Патологические процессы, включающие повреждение клеток и гибель, развиваются медленно, но необратимо. Этот класс заболеваний включает в себя болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера. Терапия заболеваний первой и второй группы стволовыми клетками будет рассмотрена далее.

Третью группу неврологических заболеваний составляют хронические воспалительные и иммунологически-опосредованные заболевания, например, рассеянный склероз (РС). При РС поражается миелиновая оболочка нервных волокон головного и спинного мозга, при патологоанатомическом исследовании обнаруживается множество рассеянных по всей центральной нервной системе очагов склероза. Считается, что демиелинизация является главной причиной дегенерации аксонов, что свою очередь вызывает появление неврологических нарушений у больных с РС [386].

Наконец, четвертую группу составляют генетически-обусловленные нарушения метаболизма у детей, вызванные дефицитом определенного фермента, что приводит к накоплению гликолипидов или белков в лизосомах. В

эту группу входят нейрональный цереоидный липофусциноз, мукополисахаридозы и лейкодистрофии.

3.2.1. Источники клеток и клетки, используемые для терапии

Огромное разнообразие доступных типов клеток и источников этих клеток формирует большой терапевтический арсенал для лечения последствий инсульта, который требует тщательного рассмотрения доклинических профилей безопасности и эффективности, характеристики самих клеток, механизмов их действия, способов доставки и биораспределения в организме [273; 340].

Источники клеток можно разделить на несколько классов в зависимости от их происхождения: взрослые (постнатальные), эмбриональные (ЭСК), фетальные (ФСК). Данные группы клеток в первую очередь различаются между собой дифференцировочным потенциалом, или потентностью. Так, существуют клетки, обладающие тотипотентностью, т.е. способностью дифференцироваться в клетки всех эмбриональных и экстраэмбриональных тканей. Среди клеток животных тотипотентностью обладает зигота и бластомеры до 8-клеточной стадии (до стадии образования бластоцисты и обособления внутренней клеточной массы).

Источником ЭСК служит внутренняя клеточная масса бластоцисты, что соответствует 5-6 суткам после оплодотворения яйцеклетки. ЭСК обладают плюрипотентностью [107] и могут дифференцироваться в клетки любого из 3-х зародышевых листков (эктодермы, энтодермы и мезодермы).

ФСК получают из абортивного материала плодов на сроке гестации 9-12 недель. Они являются мультипотентными и могут дифференцироваться только в определенные виды специализированных клеток внутри одной ткани. Можно использовать как саму пуповину (Вартонов студень) [169], так и пуповинную кровь [285], плаценту [22; 61], амниотическую жидкость [374], или даже образцы мозга самого плода, включая стриатум или кору головного мозга [79; 363]. В отличие от ФСК, СК взрослого организма чаще всего имеют сниженный

пролиферативный потенциал и обладают меньшей потентностью по сравнению с фетальными.

Несмотря на то, что среди источников взрослых СК чаще всего используют костный мозг [102; 150; 405], альтернативными источниками могут служить жировая ткань [137; 153; 170; 170], периферическая кровь [174; 282; 390; 420], обонятельная слизистая оболочка [342], менструальная кровь [43], ткань мозга [157], грудное молоко [140] или зубная ткань [207].

Еще меньшей потентностью по сравнению с мультипотентными обладают «прогениторные» клетки или «клетки-предшественники». Под этими терминами понимают пролиферирующие клетки, имеющие тенденцию к дифференцировке в конкретный тип клеток и обладающих олигопотентностью или унипотентностью. Олигопотентные СК способны давать начало нескольким клеточным типам, а унипотентные СК способны формировать клетки только одного клеточного типа, примером таких клеток являются сперматогониальные стволовые клетки, ответственные за появление сперматозоидов. Например, к прогениторным клеткам можно отнести сателлитные клетки мышечной ткани, делящиеся клетки эпителия и некоторые другие. Стоит отметить, что на сегодняшний день еще ведутся дискуссии о классификации и терминологии относительно СК.

Обособленно от вышеописанной классификации стоят индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs), полученные путем индукции плюрипотентности в соматических клетках прямым репрограммированием. Авторы во главе с Shinya Yamanaka показали, что iPS клетки могут быть получены из взрослых фибробластов кожи человека или других соматических клеток путем ретровирусной трансдукции четырьмя транскрипционными факторами Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc. Полученные человеческие iPS-клетки сходны с ЭСК человека во многих аспектах, включая морфологию, пролиферацию, фидерную зависимость, поверхностные маркеры, экспрессию генов, активность промотора, активность теломеразы, дифференцировку *in vitro* и образование тератом [376]. Такая возможность получения ЭСК из

человеческих неэмбриональных тканей решает этические проблемы, связанные с использованием человеческих эмбрионов. Однако, стоит сразу оговориться, что ЭСК и iPS клетки из тканей взрослого не могут быть напрямую использованы для терапии из-за высокого риска образования опухолей [181].

3.2.2. Применение стволовых клеток для лечения ишемического инсульта

Как уже указывалось, ишемический инсульт является второй ведущей причиной смертности в мире и наиболее распространенной причиной тяжелых недугов [109; 323]. Нейропротекция и механизмы, поддерживающие эндогенную пластичность мозга, часто недостаточны для обеспечения полного выздоровления пациента, поскольку повреждения после инсульта не ограничиваются только нейронами, но затрагивают все типы клеток мозга, включая внеклеточный матрикс в «глио-нейроваскулярной нише» [90; 245; 431]. Таким образом, введение факторов роста и терапевтических клеток является многообещающей стратегией при лечении последствий ишемического инсульта. Подобная биотерапия может обеспечить нейропротекцию и восстановление нейронов посредством нейро-синаптогенеза, ангиогенеза, олигодендроглиогенеза, аксонального прорастания и проявления иммуномодулирующего эффекта [146; 274; 320]. Сложные механизмы действия ММСК зачастую работают в комплексе и отличаются в зависимости от конкретного фактора роста или введенного типа клеток.

Введенные клетки могут адаптироваться к различным местным условиям в поврежденной ткани мозга, не ограничиваясь единственной целью. Как уже было отмечено, они могут действовать на широкий спектр процессов восстановления, включая иммуномодуляцию, нейральное, васкулярное и глиальное ремоделирование.

Традиционно выделяют две основные стратегии лечения: первая заключается в паракринной трофической поддержке с использованием «периферийных» стволовых или стромальных клеток; вторая заключается в непосредственной нейронной замене с использованием нейральных стволовых

клеток/клеток-предшественников или зрелых нейронов. Вопросы относительно способа введения, дозировки и терапевтическом окне для введения клеток после инсульта до сих пор остаются открытыми. Все зависит от выбранного типа клеток и ожидаемых терапевтических эффектов.

Продукты клеточной терапии, полученные из разных источников, могут быть использованы для ксеногенного, аллогенного или аутологического лечения.

Можно выделить три основных категории:

- 1) стромальные или стволовые клетки - производные мезодермы;
- 2) нейральные стволовые/клетки-предшественники - производные эктодермы;
- 3) гематопоетические/эндотелиальные стволовые клетки.

Стромальные/стволовые клетки, полученные из костного мозга, пуповины, крови или жировой ткани, широко используют для клеточной терапии при лечении последствий инсульта. Мезенхимальные стволовые клетки и мультипотентные клетки-предшественники взрослого организма могут быть использованы при аутологической или аллогенной трансплантации без параллельного введения иммуносупрессивных препаратов благодаря своим иммуномодулирующим характеристикам [55; 102; 150; 164].

В случае использования ММСК в системе *ex vivo* необходимо учитывать, что использование эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в среде культивирования несет не только возможность распространения вирусных и прионных болезней, но также может модифицировать профиль экспрессии генов и конечный фенотип в сторону более дифференцированного состояния после нескольких пассажей. В отличие от ЭТС культивирование ММСК на аутологичной человеческой сыворотке демонстрирует менее дифференцированный фенотип и более стабильный профиль экспрессии генов [333].

Вторая категория включает нейральные стволовые/клетки-предшественники, полученные из ткани мозга, иммортализованные нейральные

клеточные линии или клетки, полученные из эмбриональных стволовых или индуцированных плюрипотентных стволовых клеточных линий [10; 254]. Введение нейрональных стволовых клеток обеспечивает функциональные преимущества, но обычно требует параллельного лечения иммуносупрессорами. В эту же разрозненную группу «нейральных стволовых клеток» можно включить и обонятельные нейроэпителиальные клетки [342], предшественники олигодендроцитов [48] и культивируемые нейроны [185].

Третья категория включает гематопозитические стволовые клетки [330; 373] и эндотелиальные клетки-предшественники [65]. Показано, что введение гематопозитических стволовых клеток приводило к улучшению функциональных показателей у животных с ишемией мозга за счет индукции ангиогенеза и нейрогенеза. В данный момент времени клетки успешно прошли первую фазу клинических испытаний, в которой были доказаны безопасность и целесообразность применения гематопозитических стволовых клеток при остром ишемическом инсульте [19].

Эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) играют важную роль в терапевтической неоваскуляризации [19]. В частности, было показано, что циркулирующие ЭПК способствуют неоваскуляризации после инсульта [442]. Существенным ограничением применения ЭПК в терапевтических целях является их малое количество. Более того, для пациентов с факторами риска в виде сердечно-сосудистых заболеваний или старения это количество еще меньше, что имеет большое значение в патофизиологии церебро-васкулярных заболеваний [108]. Таким образом, введение ЭПК, полученных в системе *ex vivo*, может стать одним из новых направлений лечения ишемических повреждений мозга.

Как уже было упомянуто, оптимальная комбинация типа используемых клеток и дозы и времени введения при терапии инсульта является дискуссионным вопросом. Системное внутрисосудистое введение клеток менее инвазивно и позволяет клеткам более широко распределиться в поврежденной области и эффективнее с ней взаимодействовать в отличие от

внутрижелудочкового и интрапаренхиматозного способов введения [138]. Благодаря цитокиновым, хемокиновым и воспалительным сигналам, высвобождаемым поврежденным мозгом [255; 286], таким как SDF1/CXCR4 [57], внутривенно введенные мезенхимальные стволовые клетки преимущественно мигрируют к поврежденным участкам, несмотря на начальное и временное легочное улавливание [86]. Например, в модели геморрагического инсульта только внутривенное, но не внутричерепное, введение нейральных стволовых клеток оказало эффективное противовоспалительное действие [206]. Сходным образом клетки пуповинной крови оказались более эффективны при внутривенном введении, нежели при внутричерепном [419]. Полученный результат противоречил другим исследованиям, показывающим слабую эффективность при внутривенном введении [41; 276]. Способность стволовых клеток легко проходить из капилляров в ткань легкого и задерживаться там является основным препятствием для внутривенной доставки нейральных стволовых клеток и для больших по размеру ММСК [110]. Более эффективное прохождение через легочные сосуды может быть достигнуто с помощью ингибирования CD49d на ММСК, инфузии через два болюса или премедикации нитропруссидом натрия [329].

Другие методы введения, такие как внутриартериальный или внутричерепной, позволяют избежать проблемы захвата легкими и тем самым увеличить количество клеток, достигающих своей цели. Меченые нейральные стволовые клетки могут быть обнаружены в ишемизированном полушарии при внутриартериальном, но не внутривенном введении [200]. Это подтверждается исследованиями МРТ при остром инсульте у крыс, которые показали проникновение ММСК в мозг только после внутриартериального введения [406]. Однако сообщается о риске окклюзии сосудов после внутриартериальной доставки клеток, что также может быть связано с большим размером ММСК [119].

3.2.2.1. Терапевтическое окно

Как и вопросы дозировки и способа введения, вопрос о терапевтическом окне для клеточной терапии остается открытым. Например, раннее внутриартериальное введение (6-24 ч после инсульта) нейральных стволовых клеток приводит к усиленной дифференцировке в астроциты, тогда как при более позднем введении (7-14 дней) усиливается дифференцировка в нейроны [312]. Мононуклеары из костного мозга или пуповинной крови без предварительного культивирования, могут быть хорошими кандидатами для введения в первые 72 часа после инсульта [38; 152], возможно, выступая в качестве дополнения к тромболизису или механической тромбэктомии [240].

Если одни исследования демонстрируют, что только раннее (3-24 ч) внутривенное введение мезенхимальных стволовых клеток может быть эффективным [409], то другие показывают, что и отсроченное введение вплоть до месяца после инсульта также может способствовать улучшению функций мозга [184]. Так, через месяц после инсульта внутримозговое введение immortalized нейронов [44] или внутривенное введение клеток, полученных из пуповины [439] способствуют восстановлению неврологических функций.

3.2.2.2. Использование ММСК для терапии инсульта

Наиболее активно для терапии используют ММСК, что, вероятно, связано с их способностью выделять большое количество биоактивных молекул, таких как факторы роста, цитокины и хемокины, приводящие к уменьшению воспаления, способностью стимулировать повышенный нейрогенез из зародышевых ниш центральной нервной системы, повышенный ангиогенез, оказывать воздействие на астроциты, олигодендроциты и аксоны.

Использование ММСК на моделях инсульта животных было в целом безопасным и оказывало благоприятное влияние на поведение [404], однако в некоторых работах сообщалось о таких неблагоприятных явлениях, как эмболизация [119; 435], инфекция и образование опухоли [73; 209], а также накопление β -амилоида и кальция в таламусе [241]. Исследования,

проведенные с использованием модели инсульта у крыс, показали, что внутриартериальное введение ММСК может уменьшать кровоток через среднюю мозговую артерию, но это осложнение, по-видимому, является дозозависимым. Доза 1×10^5 является максимально допустимой дозой, которую можно вводить внутриартериально без ущерба для кровотока через среднюю мозговую артерию. Относительно оптимального времени введения для получения неврологического улучшения было показано, что доставка ММСК через 24 часа после инсульта (но не через 1 час после инсульта) значительно улучшала показатели неврологического дефицита и уменьшала средний объем инфаркта через 1 месяц по сравнению с контролем [435].

В другом исследовании сообщалось о накоплении β -амилоида и кальция в таламусе после внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека у крыс с окклюзией средней мозговой артерии [241].

Итак, основная техническая проблема в использовании стволовых клеток состоит во времени, необходимом для сбора, выделения, характеристики, бактериологического тестирования и наращивания необходимого количества ММСК. В среднем, это требует от 3 до 5 недель, что, разумеется, затрудняет введение клеток при остром ишемическом инсульте при аутологической трансплантации. В этом случае использование аллогенных стволовых клеток может стать хорошим вариантом, поскольку эти клетки не содержат антигены HLA II класса [136], что позволяет устранить риск отторжения.

В таблице 1 приведены клинические испытания, проведенные с использованием аутологических мезенхимальных стволовых клеток и моноклеарных клеток костного мозга. В одной из первых работ Bang et al. (2005) [20] трансплантировали аутологические ММСК из костного мозга пациентам внутривенно, дважды в пределах 9 недель после ишемического инсульта средней мозговой артерии. В течение 1 года наблюдения пациенты, получавшие ММСК, показали улучшение индекса Бартела, по сравнению с пациентами в контрольной группе, тогда как повреждение головного мозга, оцененное методом МРТ, не показало отличий. В данной работе выборки

содержали небольшое количество пациентов: в экспериментальную группу входило 5 пациентов (которым вводили ММСК), контрольная группа состояла из 25 пациентов. Доза вводимых клеток составила 1×10^8 . Никаких серьезных побочных явлений клеточной терапии не было обнаружено. Другая группа исследователей [205], провела исследование безопасности и эффективности долгосрочного (в течение 5 лет) внутривенного введения костномозговых ММСК у 85 пациентов с тяжелым инфарктом средней мозговой артерии. Это исследование продемонстрировало, что кумулятивная выживаемость на 260 неделе составляла 72% в группе, получившей терапию ММСК, по сравнению с 34% в контрольной группе. Никаких существенных неблагоприятных эффектов также не было обнаружено.

Bhasin et al. провели 2 открытых исследования (2011, 2013 гг.) [34; 35], в которых пациентам внутривенно вводили костномозговые ММСК при клеточной терапии хронического ишемического и геморрагического инсультов (от 3 месяцев до 1 года после инсульта). В первом исследовании [34] пациенты были разделены на две группы по 6 пациентов в каждой, одна из групп получала $50-60 \times 10^6$ КМ-ММСК, вторая служила контролем. За пациентами наблюдали в течение 24 недель. Клиническое и радиологическое сканирование в экспериментальной группе не выявили отклонений. Смертельных исходов или побочных реакций, связанных с терапией клетками, не было зарегистрировано. Лабораторные тесты также были в пределах нормы у экспериментальной группы, которой вводили ММСК. По шкале Фугл-Мейера и по модифицированному индексу Бартела авторы показали умеренное увеличение у группы, получавшей стволовые клетки, по сравнению с таковыми показателями для контрольной группы пациентов. В экспериментальной группе было обнаружено увеличение активности в Бродмановских полях ВА4 и ВА6 и нижней височной извилине после введения стволовых клеток при анализе с помощью функциональной МРТ, что указывает на восстановление функций соответствующих зон мозга. Во втором исследовании [35] воспроизвели этот же проект исследования, но включили 40 пациентов, которых разделили на две

группы, по 20 пациентов в каждой. Стволовые клетки вводили пациентам внутривенно. Побочных реакций в экспериментальной группе не было зарегистрировано. Однако только модифицированный индекс Бартела показал статистически значимые отличия (на уровне $p < 0,05$) в экспериментальной группе пациентов, которым вводили стволовые клетки. В работе Nonou и др. [149] объектом исследования являлась группа из 12 пациентов с ишемией серого вещества, белого вещества и смешанными поражениями, однако исследование не содержало контрольной группы. Пациентам внутривенно вводили от $0,6 \times 10^8$ до $1,6 \times 10^8$ костномозговых ММСК на 36-133 день после инсульта. Никаких побочных эффектов не было обнаружено, а средний объем поражения, оцененный с помощью МРТ, уменьшался на 20% через 1 неделю после введения ММСК. В работе Savitz и др. [324] пациентам с ишемическим инсультом средней мозговой артерии внутривенно вводили 85×10^6 аутологических костномозговых ММСК в пределах 7-30 дней после инсульта. Серьезных побочных явлений не было обнаружено. Индексы Бартела и шкала Рэнкина демонстрируют статистически значимое улучшение показателей в экспериментальной группе по сравнению с исходным уровнем. В работе Barbosa da Fonseca и соавт. [21] экспериментальная группа включала 6 пациентов с ишемическим инфарктом средней мозговой артерии в интервале 59-82 дня после поражения. Дозировку моноклеарных клеток изменяли с $1,25 \times 10^8$ до 5×10^8 . Приблизительно 2×10^7 клеток были помечены ^{99}Tc и внутриартериально введены вместе с немечеными клетками через катетер, направленный к средней мозговой артерии. В течение 120 дней ни у одного из пациентов не было обнаружено никаких осложнений. С помощью сцинтиграфического исследования всего тела было показано попадание клеток в мозг всех пациентов уже через 2 часа после введения, при этом оставшееся количество было главным образом распределено в печени, легких, селезенке, почках и мочевом пузыре.

В другой работе [242] было показано, что у пациентов с инсультом средней мозговой артерии, получившим внутриартериально аутологические

моноклеарные клетки костного мозга между 5 и 9 днями после инсульта, никаких серьезных побочных явлений также не было зарегистрировано в течение 6 месяцев после введения клеток. В исследовании Suarez-Monteagudo и др. [364] авторы наблюдали за 5 пациентами с последствиями ишемического и геморрагического инсультов (от 1 до 10 лет до введения клеток), заключавшимися в поражении таламуса, стриатума и первичной двигательной коры. Пациентам стереотаксически ввели от $17,3 \times 10^6$ до 55×10^6 аутологических моноклеаров костного мозга. В течение 1 года следили за проявлением возможных побочных эффектов. Однако никаких серьезных осложнений не было отмечено ни во время операции, ни в послеоперационном периоде, но было отмечено дискретное функциональное улучшение. Li и коллеги [214] провели исследование группы пациентов, в которое вошли 100 человек с острым гипертензивным внутримозговым кровоизлиянием. Через 5-7 дней после хирургического дренирования и декомпрессионной краниотомии пациенты в группе лечения получили через дренажную трубку $9,47 \times 10^5$ /л аутологических моноклеарных клеток костного мозга (60 человек в экспериментальной группе лечения и 40 человек в контрольной группе). Субфебрильная температура была зарегистрирована у 5 пациентов в первые 24 часа после операции, у 1 пациента диагностировали рак легкого через 4 месяца после введения клеток. После 6 месяцев наблюдения пациенты в экспериментальной группе лечения показали статистически значимое увеличение индекса Бартела по сравнению с пациентами контрольной группы ($p < 0,01$).

Таблица 1. Клинические испытания с использованием ММСК и моноклеарных клеток костного мозга при инсульте

Авторы	Тип инсульта	Способ введения	Время введения после инсульта	Количество во введений	Тип введенных клеток	Количество во введенных клеток	Время наблюдения	Основные наблюдения в экспериментальной группе
Bang et al [20]	острая ишемия средней мозговой артерии	Внутривенное	5-7 недель	2	КМ-ММСК	$1 \cdot 10^8$	1 год	Улучшения по индексу Бартела, но нет эффекта по МРТ
Lee et al [205]	острая ишемия средней мозговой артерии	Внутривенное	5-7 недель	2	КМ-ММСК	$1 \cdot 10^8$	5 лет	Улучшения по шкале Рэнкина
Bhasin et al [34]	хроническая ишемия средней мозговой артерии	Внутривенное	3 недели	1	КМ-ММСК	$50-60 \cdot 10^6$	24 недель	Нет побочных эффектов. Гипотетическое увеличение нейропластичности
Bhasin et al [35]	хроническая ишемия средней мозговой артерии	Внутривенное	3 месяца – 2 года	1	КМ-ММСК	$50-60 \cdot 10^6$	24 недель	Статистически значимое увеличение индекса Бартела и увеличение нейропластичности Нет побочных эффектов.
Honmou et al [149]	хроническая ишемия средней мозговой артерии	Внутривенное	36-133 дней	1	КМ-ММСК	$0,6-1,6 \cdot 10^8$	1 год	Нет побочных эффектов, уменьшение объема поражения на 20% через неделю
Savitz et al [324]	ишемический инсульт средней мозговой артерии	Внутривенное	7-30 дней	1	КМ-ММСК	$85 \cdot 10^6$	6 месяцев	Нет побочных эффектов, статистически значимое увеличение индекса Бартела, улучшение по шкале Рэнкина
Barbosa da Fonseca et al [21]	ишемический инфаркт средней мозговой артерии	Внутриартериальное	90 дней	1	КМ-МНК	$1,25-5 \cdot 10^8$ ($2 \cdot 10^7$ меченые)	120 дней	Снижено количество клеток в мозге через 24 часа. Никаких существенных побочных эффектов в течение 120 дней
Moniche et al [242]	инсульт средней мозговой артерии	Внутриартериальное	5-9 дней	1	КМ-МНК	$1,59 \cdot 10^8$	180 дней	Нет побочных эффектов, но нет и улучшений
Suarez Monteagudo et al [364]	ишемический и геморрагический инсульты	Внутричерепное стереотаксическое	3-8 лет	1	КМ-МНК	$14-55 \cdot 10^6$	1 год	Нет побочных эффектов, отдельные функциональные улучшения

Li et al [214]	острое гипертензивное внутримозговое кровоизлияние	Внутри черепное по периферии пораженного участка	5-7 дней	1	КМ-МНК	9,47*10 ⁵ /L	6 месяцев	Значительные улучшения индекса Бартела, у 1 пациента развитие рака легких через 4 месяца
----------------	--	--	----------	---	--------	-------------------------	-----------	--

3.2.3. Применение стволовых клеток для терапии нейродегенеративных патологий

Нейродегенеративные заболевания подразумевают прогрессирующее ухудшение функционирования нейронов, атрофию головного мозга и зачастую аномальное депонирование белковых агрегатов. Хотя различные нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз и множественная системная атрофия, затрагивают разные области мозга и обладают различной этиологией, получаемые на данный момент результаты указывают на общие клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе патологических процессов.

Клеточная терапия нейродегенеративных заболеваний направлена на прекращение клинических ухудшений за счет регенерации и обеспечения местной поддержки поврежденных тканей. В этом отношении мезенхимальные стволовые клетки обладают огромным потенциалом, поскольку они могут быть эффективно получены из тканей взрослого, в системе *ex vivo* переведены в клеточную культуру и безопасно аутологически трансплантированы. Также было показано, что мезенхимальные стволовые клетки способны дифференцироваться в нейроны и секретировать широкий спектр факторов, стимулирующих поддержание и восстановление нервной ткани. Результаты использования мезенхимальных стволовых клеток человека в экспериментальных моделях нейродегенерации приведены в таблице 2.

Таблица. 2. Использование нативных ММСК человека в мышинных моделях нейродегенерации

Заболевание	Источник клеток	Животная модель	Клинические улучшения
болезнь Альцгеймера [203]	пуповинная кровь	Аβ-инокулированные мыши	уменьшение активации глии, окислительного стресса и апоптоза
болезнь Альцгеймера [171]	пуповинная кровь	APP/PS1 мыши	понижение активации микроглии, sICAM-1-опосредованное увеличение экспрессии неприлизина
болезнь Альцгеймера [339]	не уточняется	Аβ-инокулированные мыши	индукция Аβ очищения, индукция аутофагии
болезнь Альцгеймера [266]	не уточняется	Аβ-инокулированные мыши	усиление WNT сигнализации, усиление эндогенного нейрогенеза
болезнь Паркинсона [74]	костный мозг	6-OHDA мыши	повышенное выживание дофаминэргических нейронов
болезнь Паркинсона [289]	костный мозг	МРТР-индуцированные мыши	повышенное выживание дофаминэргических нейронов
болезнь Паркинсона [288]	костный мозг	МРТР-индуцированные мыши	повышенное выживание дофаминэргических нейронов
болезнь Паркинсона [287]	костный мозг	α-синуклеин-инокулированные мыши	повышение выживаемости нейронов

Большинство существующих видов терапии фокусируется на подавлении иммунной системы для предотвращения возникновения неврологических повреждений, но подавление иммунной системы не может восполнить уже существующий неврологический ущерб и является несостоятельным для долгосрочного лечения болезни. Таким образом, действительно эффективное лечение требует не только ослабления аутоиммунной компоненты, но и регенерации поврежденных нейронов.

Мезенхимальные стволовые клетки применяются не только для исследований на мышинных моделях, они активно изучаются в качестве терапевтических агентов в клинических испытаниях, направленных на улучшение показателей при патологических нейродегенеративных изменениях, черепно-мозговых травмах, а также в случае различных других патологий человека. Была доказана безопасность использования мезенхимальных стволовых клеток человека при внутривенной и интратекальной

трансплантации. Основные результаты клинических испытаний приведены в таблице 3.

Таблица 3. Мезенхимальные стволовые клетки человека в клинических испытаниях при нейродегенеративных патологиях

Диагноз	Источник клеток	Способ введения	Количество пациентов в экспериментальной группе	Клинический эффект
боковой амиотрофический склероз [46]	аутологические, костный мозг	интратекальное и внутривенное	19	усиление противовоспалительного ответа, замедление прогрессирования заболевания
болезнь Паркинсона [399]	аутологические, костный мозг	стереотаксическое введение в боковые желудочки	7	устойчивое улучшение клинической оценки у 3 из 7 пациентов
боковой амиотрофический склероз [265]	аутологические, костный мозг	интратекальное	8	замедление прогрессирования заболевания, повышение уровня противовоспалительных маркеров
боковой амиотрофический склероз [236]	аутологические, костный мозг	интратекальное	7	замедление прогрессирования заболевания
боковой амиотрофический склероз [297]	аутологические, костный мозг или дифференцированные <i>ex vivo</i>	интратекальное и внутримышечное	26	замедление прогрессирования заболевания

Как уже говорилось, болезнь Паркинсона является прогрессирующим, дегенеративным заболеванием, характеризующимся потерей дофаминергических нейронов в черной субстанции мозга. Несколько исследований доказали наличие стволовых клеток в мозге человека, способных дифференцироваться в дофаминергические нейроны [7; 117]. Была доказана состоятельность терапии, основанной на применении мезенхимальных стволовых клеток, при лечении болезни Паркинсона. В одном исследовании семь пациентов в возрасте 22-62 лет, со средней продолжительностью болезни 14,7 года, получали аутологичные ММСК (1 миллион клеток на кг массы тела) в сублатеральную желудочковую зону посредством стереотаксической хирургии. У трех пациентов наблюдалось устойчивое улучшение по шкале UPDRS. Пациенты также показали улучшение в выражении

лица/походке/эпизодах замирания [399]. Во втором исследовании 12 пациентам (восьми с болезнью Паркинсона и четырем – с болезнью Паркинсона в совокупности с системной атрофией и прогрессирующим супрануклеарным параличом) трансплантировали аллогенные ММСК (2 миллиона клеток на кг массы). У всех пациентов только с болезнью Паркинсона наблюдалось улучшение по шкале UPDRS. Пациенты, которым вводили клетки на ранних стадиях заболевания (менее 5 лет), демонстрировали более значимые улучшения и отсутствие дальнейшего прогрессирования заболевания по сравнению с результатами при клеточной терапии пациентов при стаже болезни Паркинсона от 11 до 15 лет. Четыре пациента из второй группы не улучшили свои показатели после терапии [400].

В ранних работах было показано, что введение фетальных дофаминергических нейронов среднего мозга из абортивного материала улучшает двигательную активность пациентов [141; 219] [45]. Однако в двух исследованиях авторы не обнаружили существенных улучшений, особенно у пожилых пациентов [117; 269] при этом у пациентов отмечали дискинезии (непроизвольные движения, периодически возникающие в различных группах мышц). Эти негативные и менее ожидаемые результаты в сочетании с этическими и материально-техническими проблемами использования абортивного материала привели к отказу от такого подхода.

Стоит отметить, что были найдены и другие источники клеток для получения дофаминергических нейронов. Например, было показано, что эмбриональные стволовые клетки могут дифференцироваться в дофаминергические нейроны в клеточной культуре, а трансплантация недифференцированных эмбриональных стволовых клеток в стриатум грызунов с моделью болезни Паркинсона приводит к дифференцировке в дофаминергические нейроны и улучшению моторного дефицита [36]. Однако одной из проблем, связанных с введением таких недифференцированных клеток, является возможное образование тератом. Трансплантация нейральных прогениторных клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток

человека, в стриатум грызунов привела к частичному восстановлению поведения у грызунов с моделью болезни Паркинсона, но клетки не приобрели полный дофаминергический фенотип в мозге грызунов. Это позволяет предположить, что дифференцировка в дофаминергические нейроны среднего мозга должна проводиться до трансплантации [28]. В МРТР-модели болезни Паркинсона приматов трансплантация нейросфер, состоящих из нейральных прогениторных клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток обезьян, также приводила к функциональным улучшениям [375].

Учитывая сказанное выше, можно сказать, что дофаминергические нейроны, полученные из стволовых клеток взрослых тканей, являются привлекательной альтернативой эмбриональным клеткам. Например, уже было показано, что в культуре ММСК можно индуцировать дифференцировку в клетки, которые будут обладать многими характеристиками дофаминергических нейронов [132]. Так, ММСК, введенные мышам в стриатум в МРТР-модели болезни Паркинсона, сохраняли жизнеспособность, экспрессировали тирозингидроксилазу и индуцировали функциональные улучшения [213].

Было показано, что активация дофамина D3-рецептора увеличивает нейрогенез в черной субстанции у животных с моделью болезни Паркинсона. В 6-гидроксидофаминовой модели заболевания агонист дофамина D3-рецептора восстанавливал количество дофаминергических нейронов в черной субстанции, улучшая стриарную иннервацию и двигательную активность [396]. Использование этого подхода на ранних стадиях развития заболевания кажется привлекательным, поскольку препараты с активностью агониста дофамина D3-рецептора уже доступны.

Было показано, что глиальный нейротрофический фактор (GDNF) оказывает специфический эффект на сохранение и выживаемость дофаминергических нейронов в культуре [218]. Методы доставки генов GDNF в черную субстанцию включали как аденовирусные, так и лентивирусные векторы для тестирования на животных моделях. Так, аденовирусный вектор,

кодирующий человеческий ген GDNF, вводимый в черную субстанцию, уменьшает потерю дофаминергических клеток в 6-гидроксидофаминовой модели заболевания крысы [69]. Лентивирусная векторная доставка GDNF при MPTP модели болезни Паркинсона низших приматов приводила к устойчивой экспрессии белка, полностью предотвращала дегенерацию нейронов nigrostriарной системы и улучшала функциональные показатели [186]. Эти многообещающие результаты на животных моделях привели к началу I-го этапа клинических испытаний у пациентов с болезнью Паркинсона [293],[352]. В этих испытаниях GDNF непрерывно вводили в стриатум с помощью катетера. Однако в исследовании на 34 пациентах с болезнью Паркинсона при двустороннем введении GDNF в кору чечевицеобразного ядра в экспериментальной группе существенного улучшения не наблюдалось [199]. Поскольку доставка GDNF путем непрерывной инфузии не оказала терапевтического эффекта, подход, при котором GDNF будет поставляться через нейральные клетки-предшественники, является привлекательной альтернативой. Человеческие нейральные клетки-предшественники, генетически модифицированные для высвобождения GDNF, трансплантировали в стриатум крыс и низших приматов. Клетки сохраняли жизнеспособность и экспрессировали GDNF в течение длительного периода времени, при этом у экспериментальных животных наблюдались функциональные улучшения [27].

Производные стволовых клеток человека, полученных из эндометрия (hEDSC), представляют собой новый источник клеток для лечения болезни Паркинсона, который может быть легко получен с помощью простых и безболезненных процедур [248]. hEDSC были *in vitro* дифференцированы в дофаминергические нейроноподобные клетки, имеющие пирамидные тела, дендритоподобные и аксоноподобные отростки, а также экспрессировали нейральные маркеры (нестин и тирозингидроксилазу) [422]. После инъекции EDSC в стриатум обезьян с MPTP моделью болезни Паркинсона клетки могут встраиваться в стриатум, мигрировать в черную субстанцию и спонтанно

дифференцироваться *in vivo*. Также наблюдали увеличение количества клеток, экспрессирующих тирозингидроксилазу, и увеличенные концентрации метаболита дофамина [423].

Таким образом, болезнь Паркинсона оказалась более сложной для лечения стволовыми клетками, чем первоначально предполагалось. Нерегулируемое высвобождение дофамина трансплантированными дофаминовыми стволовыми клетками в стриатуме, скорее всего, приведет к уменьшению двигательного контроля и дискинезии. Восстановление регулируемого дофаминергического пути от стволовых клеток к стриатуму является сложной задачей, в решении которой стимуляция эндогенных механизмов восстановления и предотвращения дальнейшей потери нейронов будут иметь самое непосредственное влияние. Кроме того, болезнь Паркинсона включает в себя не только дофаминергическую дегенерацию в черной субстанции мозга, а значит, для лечения потребуется что-то большее, чем трансплантация клеток в средний мозг.

У пациентов с боковым амиотрофическим склерозом после введения ММСК человека также отмечается иммуномодулирующий эффект от введенных клеток [167]. Анализ моноцитов периферической крови через 24 часа после трансплантации выявил увеличение доли иммуносупрессивных CD4⁺ CD25⁺ регуляторных Т-клеток и снижение доли провоспалительных миелоидных дендритных клеток. После введения стволовых клеток также наблюдали значительное увеличение экспрессии транскрипционного фактора FoxP3 в мононуклеарных клетках крови. Поскольку Foxp3 известен как маркер иммуносупрессивных CD4⁺ CD25⁺ регуляторных Т-клеток, это исследование также указывает на противовоспалительную активность введенных ММСК [46].

Исследование 19 пациентов с боковым амиотрофическим склерозом и 15 пациентов с рассеянным склерозом, которым однократно интратекально ввели аутологические ММСК, продемонстрировало безопасность манипуляций и начальные иммуномодулирующие эффекты от введенных клеток. Стволовые клетки поместили магнитными частицами оксида железа, что позволило

определить их конечное местоположение с помощью МРТ. Введенные клетки детектировались в мозговых оболочках, субарахноидальном пространстве и спинном мозге. Двадцать один из 34 пациентов испытали временную лихорадку, возможно, из-за воздействия следовых количеств культуральной среды или материалов для мечения клеток. После введения функциональные показатели по шкале ALSFRS оставались стабильными в течение 6 месяцев, а средние показатели по шкале EDSS улучшились с 6,7 до 5,9 [167].

Было показано, что интраспинальное введение ММСК мышам, мутантным по супероксиддисмутазе 1 G93A-SOD1 (модель бокового амиотрофического склероза) предотвратило развитие астроглиоза в областях дегенерации и снизило активацию микроглии, а также привело к снижению потерь мотонейронов. Все это в конечном итоге привело к улучшению моторных функций [401]. Показано, что введение ММСК SOD1 мутантным крысам приводило к увеличению продолжительности жизни животных, изменению профиля экспрессии генов, нейропротекторным и иммуномодулирующим эффектам [112].

В другой работе использовали ММСК, трансфицированные плазмидным вектором, вызывающим продукцию глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1) и заключенные в альгинатные сферы диаметром 160 мкм по 94 клетки в каждой. Интрацеребровентрикулярное введение таких инкапсулированных GLP-1-ММСК мышам G93A-SOD1 приводит к отсрочке развития заболевания, увеличению продолжительности жизни животных и значительным улучшениям в двигательной активности [180]. Более того, внутримышечная инъекция человеческих ММСК, секретирующих GDNF, крысам G93A-SOD1 привела к повышению продолжительности жизни и восстановлению двигательных функций [371].

Интраспинальное введение аутологических моноклеаров костного мозга 11 пациентам с боковым амиотрофическим склерозом показало высокий уровень образования моторных нейронов [37]. Также было продемонстрировано, что интраспинальное введение аутологических ММСК

было безопасным, и никаких признаков токсичности и побочных эффектов, связанных с введением клеток не было зарегистрировано в течение двух лет после вмешательства [235; 236]. Кроме того, не было обнаружено токсичности или образования опухоли в аналогичных исследованиях, проведенных в Израиле, Индии, Южной Корее и Мексике [17; 167; 233; 305].

Мезенхимальные стволовые клетки пациентов с боковым амиотрофическим склерозом и здоровых людей могут отличаться, несмотря на идентичные поверхностные маркеры и морфологию. Анализ Nanog, Oct-4 и Nestin-1 в качестве общепринятых маркеров плюрипотентности выявил низкую экспрессию Nanog и Oct-4 в ММСК при боковом амиотрофическом склерозе [182]. В работе Koh et al авторы предположили, что β -PIX, внутриклеточный фактор, участвующий в миграции, ответственен за нарушение миграции человеческих ММСК у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом, по сравнению с ММСК здоровых людей [183]. Эти данные выявили некоторые проблемы в применении аутологической терапии стволовыми клетками у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом, что требует дальнейших исследований.

3.3. Механизмы реализации терапевтических эффектов мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток

3.3.1. Дифференцировка ММСК в клетки нейральных типов

В последние годы мнение, что ММСК способны к образованию новых тканей в пределах своего зародышевого листка, изменилось. Во многих работах утверждалось, что разные стволовые клетки способны дифференцироваться в ткани других зародышевых листков, этот процесс называют «трансдифференцировкой». В серии работ авторы предполагают, что ММСК тоже обладают такой способностью [103].

В исследованиях, демонстрирующих предполагаемую трансдифференцировку ММСК в нейроны или глиальные клетки *in vitro*, используют различные протоколы культивирования. В широком понимании эти

протоколы включают индукцию в среде с добавлением химических веществ [85; 151], добавление биологических молекул, вызывающих нейрогенез или генетическую модификацию по этим молекулам [25],[88; 191] сокультивирование ММСК с нейральными клетками, при этом ММСК могут приобретать нейральный фенотип в результате прямых межклеточных контактов и/или воздействия растворимых факторов [70; 321; 421].

Рядом авторов описано, что ММСК могут дифференцироваться в нервные клетки под действием определенных стимулов. Так, после культивирования ММСК с различными химическими веществами и ростовыми факторами, ММСК довольно скоро приобретали морфологические признаки нервных клеток и экспрессировали нейральные маркеры, такие как нестин, нейрофиламенты, микротрубочко-ассоциированный белок (MAP-2), β III-тубулин, GFAP [222; 247; 424]. Однако морфологические и фенотипические изменения не связаны напрямую с наличием определённых электрофизиологических свойств, присущих нервной ткани, а также способностью синтезировать и секретировать нейротрансмиттеры [415]. Появляются новые протоколы культивирования клеток с целью провести *ex vivo* дифференцировку человеческих ММСК в дофамин-секретирующие [388] и ацетилхолин-секретирующие нейроноподобные клетки [215]. Также было сообщено о другом способе достижения максимальной близости дифференцируемых клеток к нейронам через генетическую модификацию костномозговых ММСК, используя экспрессию нейрональных транскрипционных факторов [24; 175]. Dezawa и коллеги [88] продемонстрировали возможность эффективной и специфической индукции крысиных и человеческих ММСК через трансфекцию генетической конструкцией, кодирующей внеклеточный домен рецептора Notch, и последующее культивирование в среде с основным фактором роста фибробластов (bFGF), форсколином, цилиарным нейротрофическим фактором (CNTF), BDNF и фактором роста нервов (NGF). Вследствие трансфекции ММСК начинали экспрессировать нейральные маркеры такие как MAP-2,

нейрофиламент М и β III-тубулин, а культивирование в присутствии трофических факторов позволяло вызывать потенциал-зависимые токи ионов Na и K и потенциалы действия, сравнимые с таковыми у функциональных нейронов. Дальнейшая обработка таких индуцированных нейронов глиальным нейротрофическим фактором (GDNF) повышала долю тирозин гидроксилаза-позитивных и дофамин-продуцирующих клеток, и оказывало терапевтический эффект у крыс с модельной болезнью Паркинсона. Тирозин гидроксилаза является маркером дофаминергических нейронов, необходимым ферментом, катализирующим переход тирозина в дигидроксифенилаланин или ДОФА, предшественник дофамина. Такие работы по получению дофамин-продуцирующих клеток выглядят многообещающими для лечения болезни Паркинсона, главной причиной которой является потеря дофаминовых нейронов в черном веществе мозга. Однако еще требуется подтвердить функциональность дофамина в таких клетках. Также нейроны, обладающие свойством возбудимости и фенотипически максимально приближенные к истинным нейронам, удалось получить в условиях совместного культивирования ММСК со взрослыми нервными клетками или после трансплантации их в мозг [421]. В работе Arnhold [14] по изучению дифференцировки ММСК в нейроны *in vitro* и *in vivo* ММСК трансдуцировали аденовирусным вектором HC-AdFK7, несущим ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), и вводили крысам в боковые желудочки. Через неделю после введения GFP-ММСК наблюдалось прикрепление клеток к эпендиме желудочков или эпителию сосудистого сплетения, отдельные клетки мигрировали через эпендимный слой. Через 2 недели наблюдалась интенсивная миграция GFP-ММСК через эпендимную выстилку и накопление их в субвентрикулярной зоне, а через 3 недели клетки распределялись по субвентрикулярной зоне. Введенные GFP-ММСК морфологически приобретали черты нейронов или астроцитов, что подтверждалось специфической окраской на нестин, MAP-2 и GFAP. Поскольку ММСК вводились в немодифицированном виде, можно предположить, что экспрессия нейральных

маркеров происходила в ответ на взаимодействие с микроокружением в головном мозге. Для оценки вклада слияния клеток срезы опытных мозгов окрашивали Hoechst (интеркалирующий в двухцепочечную ДНК агент, который дает голубое флуоресцентное свечение при возбуждении ультрафиолетовым лазером) и видели, что в GFP-экспрессирующих ММСК наблюдается только одно ядро. Это говорит о том, что слияния с образованием двуядерных гетерокарионов не происходит.

Группа ученых показала возможность дифференцировки ММСК, выделенных из костного мозга, подкожной жировой ткани, селезенки и тимуса, в нейральные клетки, вызванной либо при культивировании в среде с определенными химическими веществами, либо при сокультивировании ММСК со Шванновскими клетками [191]. В случае дифференцировки в специальной среде ММСК из костного мозга, жировой ткани, селезенки и тимуса приобретали морфологические черты астроцитов, нейронов и олигодендроцитов, при этом увеличение экспрессии нейральных маркеров не коррелировало с морфологическими изменениями. Изменения были временными и обратимыми. В противовес этому сокультивирование ММСК с Шванновскими клетками вызывало длительную дифференцировку с экспрессией белков миелина в течение 12 дней.

Хотя в нескольких работах показано функциональное восстановление поврежденного головного мозга после трансплантации полученных из ММСК нейронов [88; 175; 432], совершенно неясно происходит ли полная функциональная интеграция таких нейронов в поврежденную ткань мозга.

Возможность химически индуцированной дифференцировки в клетки нейрального типа до сих пор остается открытым вопросом. В последних работах утверждалось, что морфологические и фенотипические изменения, наблюдаемые в ММСК костномозгового происхождения после химической индукции, являются следствием нарушений в цитоскелете [32; 252; 384]. Вдобавок к этому в работе Krampera было показано, что длительное культивирование в среде с химическими индукторами нейральной

дифференцировки приводило к массивной клеточной гибели, в то время как при смене среды культивирования с индуцирующей на стандартную ММСК сохраняют свою мультипотентность, что говорит об обратимости воздействия. Вероятно, химические факторы вызывают начальные, возможно неспецифичные, изменения в нейральной дифференцировке ММСК, как например полагают авторы в недавнем исследовании нейральной дифференцировки костномозговых ММСК [415]. Дополнительные факторы, присутствующие при сокультивировании с зрелыми нейральными клетками или после трансплантации в головной мозг, необходимы для завершения процессов нейральной дифференцировки, как например показано в работах Bonilla S [40] и Wislet-Gendebien S [421].

Несмотря на то, что дифференцированные из ММСК клетки экспрессируют нейральные маркеры и обладают, по мнению ряда авторов, истинными функциональными характеристиками нейронов, выглядит сомнительным способность такого малого количества получившихся из ММСК нейронов вызывать описанные улучшения при неврологических и нейродегенеративных заболеваниях. Количество ММСК, экспрессирующих маркеры нейральной дифференцировки, относительно общего количества исходно взятых ММСК достаточно низкое [84].

Способность ММСК дифференцироваться в полностью функциональные нейроны окончательно не подтверждена, поскольку их способность к трансдифференцировке и электрофизиологические свойства до сих пор обсуждаются [230]. Эти сложности, длительность получения таких «нейронов», а также сложности в определении оптимального для эффективной трансплантации количества клеток препятствуют дальнейшему продвижению этой стратегии.

3.3.2. Слияние ММСК с нейральными клетками

Одним из возможных способов, благодаря которому стволовые клетки могли бы приобретать черты дифференцированной ткани является слияние

стволовых клеток с дифференцированными клетками *in vivo* или при сокультивировании *in vitro*. Слияние клеток - это процесс, при котором две отдельные клетки сливаются своими цитоплазматическими мембранами с объединением цитоплазм обеих клеток. Слияние клеток является распространенным событием в ходе развития и функционирования многоклеточного организма, начиная от процесса оплодотворения яйцеклетки до образования многоядерного синцития мышечной ткани. Выделяют постоянное и частичное слияние. Результатом постоянного слияния является образование двуядерных гетерокарионов [8] или происходит слияние ядер с образованием одноядерных гиперплоидных синкарионов [411]. Под частичным слиянием клеток авторы понимают временную прямую межклеточную коммуникацию с передачей различных белков, белковых комплексов и клеточных органелл, включая митохондрии. Например, клетки первичной глиобластомы способны образовывать микротрубки (отличные от туннельных нанотрубок), соединяющиеся между собой щелевыми контактами, что образует функциональную сеть [278; 279].

Повреждение и воспаление может стимулировать слияние клеток в органах-мишенях. Клетки миелоидного и лимфоидного ростков могут сливаться с кардиомиоцитами, скелетными миоцитами гепатоцитами и нейронами Пуркинье в ответ на повреждение или воспаление [261]. Однако, было продемонстрировано, что *in vivo* во взрослых дифференцированных тканях или во время нормального развития такое слияние не происходит в значительной степени. Слияние клеток миелоидного и лимфоидного ростков с различными негематопоезическими клетками происходит редко, в большинстве случаев в ответ на повреждение или воспаление в этой ткани. Слияние клеток улучшает регенерацию в печени после трансплантации костного мозга мышам с тирозинемией 1 типа [398]. Инфаркт миокарда также индуцирует слияние между кардиомиоцитами и прогениторными клетками миокарда [264]. Главный вопрос заключается в том, является ли слияние клеток типичным для физиологии, учитывая, что в большинстве исследований в качестве одного из

партнеров слияния фигурируют плюрипотентные или мультипотентные стволовые клетки. Зачастую бывает достаточно сложно оценить реальный вклад стволовых клеток в процессы слияния, происходящие в ткани, поскольку образующиеся в результате синкарионы сложно отличить от остальных клеток ткани, не применяя специальных молекулярных методов исследования.

Применительно к нервным клеткам Alvarez-Dolado и др. с помощью метода сайт-специфической рекомбинации обнаружили, что ММСК спонтанно сливаются с нейральными прогениторными клетками, а именно клетками Пуркинье *in vitro*. Более того, слияние этих клеток происходит и в мозге с образованием мультиядерных клеток [8]. Несмотря на это, многие современные работы указывают на наличие регенеративной пластичности стволовых клеток, не основанной на слиянии.

3.3.3. Паракринные механизмы

Многие авторы отмечают, что функциональное восстановление и регенерация различных органов и тканей после введения ММСК происходит без значительной дифференцировки ММСК в клетки поврежденной ткани/органа. В последнее время все больше сторонников находит мнение, что терапевтическое действие ММСК *in vivo* опосредованно паракринным действием ММСК, т.е. через секрецию различных факторов, участвующих в регенерации ткани реципиента.

Секреция цитопротективных факторов ММСК была впервые описана Gneschi и коллегами [126],[127]. Новые наблюдения о том, что ММСК, гиперэкспрессирующие гомолог 1 вирусного онкогена тимомы v-akt (Akt-ММСК) могут предотвращать ремоделирование желудочков и восстанавливать сердечную функцию уже через 72 ч после инфаркта миокарда. Так, был предложен новый механизм, согласно которому введенные ММСК могут высвобождать трофические факторы, оказывающие протекторное действие при инфаркте миокарда. Затем эта гипотеза была подтверждена улучшением сердечной функции после введения кондиционированной среды, собранной с

Akt-ММСК на модели инфаркта миокарда. В экспериментах *in vitro* такая среда защищала кардиомиоциты, полученные из стволовых клеток, от апоптоза, индуцированного гипоксией. Возможность ММСК оказывать паракринные эффекты выступает не только в качестве механизма действия ММСК, но и вселяют надежду на клиническое применение выделенных цитокинов при ишемическом повреждении. Kinnaird и соавторы [178] сообщили о том, что кондиционированная среда, собранная с ММСК, дозо-зависимо стимулировала рост эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Этот феномен частично объяснялся высоким уровнем VEGF и bFGF, обнаруженных в среде кондиционирования ММСК, тем не менее антитела, ингибирующие эти факторы, не отменяли защитный эффект, что говорит о вкладе других хемокинов или цитокинов. В последующих исследованиях были найдены факторы, более важные для лечения повреждения, о которых будет описано далее.

3.3.3.1. Ангиогенные факторы

Ангиогенез представляет под собой формирование новой кровеносной сети из предсуществующих капилляров за счет разветвления и пролиферации, в то время как ангиогенез происходит за счет расширения коллатералей и укрупнения мелких артериол с образованием более крупных артерий [262]. Ангиогенез четко регулируется балансом между ангиопоэтинами и ингибиторами, известными как «ангиогенный переключатель». Известно, что индукция ангиогенеза включается сигнализацией через фактор, индуцирующий гипоксию (HIF-1) [407]. HIF-1 является нуклеопротеином с транскрипционными свойствами, который регулирует экспрессию большинства целевых генов с целью поддержать клетки и повысить их выживаемость в отсутствии кислорода, включая гликолитические ферменты, которые обеспечивают клетку АТФ, и проангиогенные факторы, такие как VEGF, FGF, NO и инсулино-подобный фактор роста (IGF) [113; 114]

Благодаря своей способности синтезировать VEGF, HGF, моноцитарный хемотаксический протеин 1 (MCP1) и фактор стромальных клеток 1 (SDF-1)

ММСК являются готовым средством для терапии ишемии [177; 178]. VEGF вызывает выраженные ангиогенные изменения в мозге [437] и необходим для инициации образования сосудов [52]. Тем не менее, VEGF увеличивает проницаемость сосудов для белков плазмы крови в течение нескольких минут после ишемического инсульта [26], что способствует отеку мозга. Введение VEGF в ткани центральной нервной системы (ЦНС) приводит к повреждению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Ang-1 участвует в созревании, стабилизации и ремоделировании кровеносных сосудов, и стимулирует ангиогенез в головном мозге. Кроме этого Ang-1 препятствует пропотеванию жидкости через сосуды, что препятствует образованию отека после инсульта. Ang-1, продуцируемый перицитами, действует через Tie2 семейство тирозин киназных рецепторов эндотелиальных клеток, способствует стабилизации кровеносных сосудов и уменьшает их проницаемость [150].

При травме мозга перициты мигрируют из сосудистой стенки [98] и целостность нейроваскулярной единицы (эндотелиальная клетка - астроцит – перицит - нейрон) нарушается. Если аналогичное нарушение нейроваскулярной единицы происходит после инсульта, можно было бы ожидать, что ММСК могут стабилизировать микрососуды через Ang-1 сигнальный путь. Действительно, внутривенное введение ММСК, генетически модифицированных экспрессировать Ang-1, значительно ускоряет неоваскуляризацию и функциональное восстановление по сравнению с немодифицированными ММСК на модели ишемии головного мозга. В отличие от этого внутривенное введение ММСК, генетически модифицированных экспрессировать VEGF, крысам с ишемическим инсультом увеличивает неврологический дефицит [385], что согласуется со способностью VEGF увеличивать проницаемость сосудов. По данным Тоуама и др. наилучший эффект в образовании сосудов и их функциональной целостности оказывали ММСК, генетически модифицированные так, чтобы экспрессировать и VEGF, и Ang-1 [385]. Таким образом, скоординированная экспрессия VEGF и Ang-1

может быть важным фактором, необходимым для оптимальной неоваскуляризации.

Действительно, в нескольких исследованиях, посвященных сосудистой регенерации при введении ММСК показано повышение плотности капилляров и лучшая коллатеральная перфузия, хотя вопрос является ли влияние цитокинов ведущим механизмом действия в этой ситуации еще обсуждается [67; 249; 290]. В частности, в публикации Dong и соавторов сообщается о необходимости экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 на поверхности кардиомиоцитов для обеспечения терапевтического эффекта ММСК при модельном инфаркте миокарда [96]. Исследователи вводили ММСК мышам дикого типа или с нокаутом по CXCR4 кардиомиоцитов после инфаркта миокарда. Они наблюдали повышенное количество кардиомиоцитов, вовлеченных в апоптоз, и снижение прогениторных кардиомиоцитов в отсутствие экспрессии CXCR4, что приводило к отмене эффекта ММСК.

3.3.3.2. Антиапоптотические факторы

Предотвращение программируемой клеточной гибели при действии ММСК идет не только за счет восстановления микрогемодинамики, но также через синтез и секрецию белков, которые являются классическими ингибиторами апоптоза, такие как Bcl-2, сурвивин и Akt [268; 410]. Соотношение антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического Bax определяет чувствительность клетки к патологическим стимулам [270]. Преобладание Bcl-2 предотвращает высвобождение активаторов каспаз и дальнейшее развитие апоптоза [129]. Tang и коллеги детектировали снижение экспрессии Bax в ишемизированном миокарде после трансплантации аутологичных ММСК [381]. В другой работе было показано, что добавление среды культивирования ММСК усиливает пролиферацию и оказывает ингибирующий эффект на апоптоз гепатоцитов линии LO2s, индуцированный перекисью водорода. В частности, в клетках линии LO2s после индукции апоптоза было отмечено снижение экспрессии Bax, Fas-рецептора (относится к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли) и каспазы 3 на

транскрипционном и трансляционном уровнях [284]. Отдельно стоит отметить работу ученых во главе с F.Scheibe, посвященную молекулярным механизмам паракринного действия ММСК на модели кислородно-глюкозной депривации (КГД) нейронов коры (модель ишемии нейронов *in vitro*) [326]. В исследовании ММСК сокультивировали с корковыми нейронами за 48ч до ишемии в планшетах с пористыми мембранами, чтобы предотвратить возможность физических межклеточных контактов, но при этом была возможна диффузия растворимых факторов. Было показано, что сокультивирование ММСК с нейронами за 48 часов до КГД снижает гибель нейронов на 30-35%. Сходный нейропротекторный эффект оказывала и среда, кондиционированная ММСК, и не оказывали нейральные стволовые клетки, что говорит о том, что данное защитное действие специфично для ММСК. Исследуя молекулярные механизмы нейропротекторного действия ММСК, авторы отмечают повышение уровня фосфорилированной формы протеинкиназы В (Akt) в нейронах, которая является ингибитором активатора апоптоза Bad. Добавление в кондиционированную ММСК среду ингибитора Akt полностью отменяет нейропротекторный эффект среды, указывая тем самым, что ММСК повышают выживаемость нейронов посредством активации Akt-зависимого антиапоптотического сигнального каскада. Среди белков, обнаруженных с помощью масс-спектрометрии в среде, кондиционированной ММСК, особое внимание привлекает ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1), известный своей способностью ингибировать апоптоз через Akt-зависимый сигнальный путь. Инкубация нейральной культуры с антителами против PAI-1 до начала КГД частично отменяет нейропротекторный эффект кондиционированной ММСК среды. Таким образом можно утверждать, что нейропротекторный эффект обуславливается паракринным действием белков кондиционированной среды, одним из которых является PAI-1. Также обнаружено, что защитный эффект зависит от доли кондиционированной ММСК среды в составе среды культивирования нейронов при добавлении за 48 ч до КГД, в то время как добавление кондиционированной ММСК среды в нейральную культуру в

различных концентрациях за 30 минут до КГД оказывало значительно менее выраженный нейропротекторный эффект. Это позволяет предполагать, что выраженность нейропротекторного эффекта, оказываемого кондиционированной ММСК средой на поврежденные нейроны, в большей степени зависит от отсроченных процессов, таких как запуск синтеза трофических факторов глиальными клетками или вторичная индукция экспрессии генов и трансляции белков в нейронах.

Также стоит отметить, что ММСК способны действовать либо синтезируя белки, которые напрямую ингибируют апоптоз, либо через секрецию цитокинов, которые в свою очередь либо ингибируют апоптоз, либо повышают выживаемость клеток. Gerber и коллеги установили, что VEGF способен предотвращать апоптоз, вызванный удалением сыворотки из среды, повышением экспрессии Bcl-2 в эндотелиальных клетках сосудов [120]. VEGF также участвует в антиапоптотических процессах, активируя киназу фокальной адгезии (Fak), которая подавляет p53-опосредованный апоптоз [154].

3.3.3.3. Иммуномодулирующее влияние ММСК

Bartholomew и коллеги первыми обнаружили иммуномодулирующую функцию ММСК по дозо-зависимому ингибированию пролиферации митоген-активированных лимфоцитов в смешанной лимфоцитарной культуре [23]. На модели трансплантации кожи была подтверждена лучшая выживаемость кожного трансплантата после внутривенного введения ММСК в сравнении с группой, которой вводили физиологический раствор. В противовес этому данные Di Nicola демонстрируют то, что иммуносупрессорный эффект был частично обусловлен присутствием растворимых факторов, о чем говорит длительный супрессорный эффект на пролиферацию Т-лимфоцитов в системе с пористой мембраной, препятствующей прямому контактированию клеток [89]. Пролиферация Т-лимфоцитов частично восстанавливалась при добавлении моноклональных антител к факторам TGF- β 1 и HGF, что свидетельствует об участии обоих этих цитокинов в ингибировании пролиферации. В отношении такого цитокина как интерферон γ (ИФН γ) известно, что он играет ключевую

роль во взаимодействии ММСК и Т-лимфоцитов, повышая экспрессию гомолога 1 В7 (В7-Н1: также известен как лиганд программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) или кластер дифференцировки 274 (CD274)), известной коингибиторной молекулы иммунного ответа [335]. Selmani и коллеги открыли, что молекулы G5 комплекса гистосовместимости I класса (HLA-G5), которые секретируются и ММСК и могут контактировать с алогенно стимулированными Т-клетками, ответственны за иммуносупрессорное действие ММСК на Т-лимфоциты и натуральные киллеры (NK-клетки), так же как и на экспансию Т-регуляторных клеток [332]. Помимо влияния ММСК на функции лимфоцитов, было показано, что активные вещества ММСК опосредуют переход макрофагов от провоспалительного фенотипа M1 (классически-активированные макрофаги) к противовоспалительному фенотипу M2 (альтернативно-активированные макрофаги). Выделяют 3 основные стадии иммунного ответа: 1) распознавание антигена и презентация его на поверхности; 2) активация Т-клеток пролиферация и дифференцировка; 3) эффекторная стадия. Иммуносупрессорное действие ММСК не только проявляется на 2 стадии иммунного ответа, но и модулирует более раннюю стадию, взаимодействуя с антиген-презентирующими клетками (АПК). Также ММСК ингибируют дифференцировку, созревание и функцию дендритных клеток (ДК), полученных из CD14⁺ моноцитов [440]. На поверхности зрелых ДК после сокультивирования с ММСК снижается экспрессия CD83 и CD1a, которые являются маркерами зрелости ДК. Чтобы различить эффекты, оказываемые ММСК при прямом контактировании, и эффекты цитокинов, авторы использовали систему Transwell, в которой ММСК и моноциты культивировались в различном количественном соотношении. ММСК, находившиеся в нижнем отсеке были способны полностью предотвращать созревание моноцитов при соотношении ММСК/моноциты равном 1:10. Таким образом можно заключить, что ММСК играют роль регулятора на протяжении всего иммунного ответа, включая различные фазы, действуя на различные клеточные типы разными способами.

Совсем недавно было найдено, что ММСК действуют как иммуномодуляторы. Li и коллеги предполагают, что в зависимости от степени продукции оксида азота (NO) ММСК могут вызывать либо иммуносупрессию, либо сильно повышать иммунный ответ [210]. Если заблокировать индуцибельную NO-синтазу (iNOS), иммуносупрессорные свойства ММСК ослабляются, при этом они стимулируют пролиферацию Т-клеток, а также индуцируют гиперчувствительность замедленного типа своим хемотактическим влиянием на иммунные клетки. Этот усиливающий эффект ММСК, вероятно, характерен для таких хемокинов как CXCR3 и CCR5. До некоторой степени это подтверждается свидетельством, что iNOS^{-/-} ММСК не стимулируют пролиферацию CXCR3^{-/-} и CCR5^{-/-} спленоцитов. Эти результаты подчеркивают важность оценки уровней iNOS/IDO перед тем как широко применять для иммунологических заболеваний и на животных моделях, и в клинических испытаниях на пациентах.

3.3.3.4. Миграция и хоуминг ММСК

Миграция клеток играет центральную роль в самых разнообразных биологических явлениях. В эмбриогенезе миграция клеток часто присутствует в важных морфогенетических процессах, таких как гаструляция и развитие нервной системы.

Во многих исследованиях с использованием различных методов отслеживания ММСК показано, что после внутривенного введения ММСК широко распространяются по негематопоезическим тканям, включая желудочно-кишечный тракт, почки, кожу, легкие, тимус и легкие [87]. Предполагается, что ММСК таким образом патрулируют организм, чтобы в случае повреждения оказать помощь в поврежденной ткани или органе. Эта гипотеза косвенно подтверждена на различных моделях заболеваний, в которых ММСК быстро мобилизовывались и значительно долго удерживались в местах повреждения после системной или локальной внутритканевой инфузии клеток [15; 42; 163]. Характерные свойства ММСК мигрировать в опухолевую ткань делают их удобным средством адресной доставки лекарств или генетических

конструктов в орган-мишень при карциномах и метастатических состояниях [101]. Поскольку большинство исследований было посвящено системному введению ММСК для клинического применения, и понимание механизмов хоуминга, возможно, является одним из ключевых моментов усиления интеграции ММСК в ткань при внутрисосудистом введении ММСК.

Процесс направленной миграции клеток и внедрения в ткань называется хоумингом. Хоуминг лейкоцитов изучен достаточно хорошо, при этом механизмы его для прогениторных клеток при ишемии или повреждении менее известны. Хоуминг лейкоцитов включает следующие стадии: 1) адгезивные взаимодействия между циркулирующими клетками и эндотелием сосудов в органе-мишени, включающие снижение скорости клеток, их притяжение к эндотелию и роллинг вдоль сосудистой стенки, этот процесс опосредован взаимодействием «рецепторов хоуминга» лейкоцитов и корецепторов эндотелиальных клеток; 2) активация адгезии интегринов в ответ на локальную секрецию химических веществ, прежде всего хемокинов; 3) плотное контактирование лейкоцитов и эндотелиальных клеток; 4) прохождение сквозь сосудистую стенку в ткань [319].

Одним из ключевых участников клеточной адгезии, миграции и хемотаксиса являются интегрины [310; 416].

В самом начале миграции миелоидных клеток из просвета сосуда в ткань роллинг лейкоцитов стимулируется хемокинами и другими химическими соединениями (такими как N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином fMLP, фактором активации тромбоцитов PAF, лейкотриеном B₄), приводя к взаимодействию их поверхностных интегринов с ко-рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток и адгезии, диапедезу лейкоцита сквозь сосудистую стенку с последующей миграцией и инвазией во внеклеточный матрикс [155]. Привлекаемые хемотактическим градиентом, лейкоциты пересекают внеклеточный матрикс, образуя временные связи между интегриновыми рецепторами и компонентами внеклеточного матрикса, которые служат лигандами для адгезии [202]. Так, показано, что интегрин $\alpha 4\beta 1$

опосредует межклеточное взаимодействие, связываясь с молекулой адгезии VCAM-1 [277], а также взаимодействие клетки и межклеточного матрикса через адгезию с вариабельной областью фибронектина [130]. Взаимодействие $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 влияет на миграцию Т-клеток и натуральных киллеров [425].

Было показано, что ингибирование интегрина $\beta 1$ нейтрофилов (CD29) моноклональными антителами приводит к снижению уровня их миграции в легких при воспалении, что говорит о важности миграции нейтрофилов через легочный интерстиций в альвеолы [310].

Было показано, что VCAM-1 участвует в адгезии эндотелия, лимфоцитов, моноцитов и ДК [358]. В первую очередь VCAM-1 эндотелия является лигандом для интегринов $\alpha 4\beta 1$, $\beta 1$ и $\alpha 4\beta 7$. В исследовании Segers и др. было показано, что адгезия циркулирующих ММСК к эпителию сосудов сердца модулируется $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IL}1\beta$: обработка этими цитокинами и ММСК, и эндотелиальных клеток сердечных сосудов повышает адгезию ММСК. *In vivo* $\text{TNF}\alpha$ -индуцированная активация адгезии может быть полностью заингибирована либо во внутрисердечных эндотелиоцитах, либо в ММСК анти-VCAM-1 моноклональными антителами (но не анти ICAM-1 антителами), что говорит о важности именно VCAM-1 для хоуминга ММСК в сердце [331].

Было показано, что костномозговые ММСК и ММСК, выделенные из жировой ткани, отличаются по профилю экспрессируемых интегринов [83]. Ip и коллеги продемонстрировали значительное снижение общего количества ММСК в ишемизированном миокарде после ингибирования интегрин $\beta 1$ [156]. Также было выявлено, что интегрин $\alpha 4\beta 1$ опосредует роллинг и прикрепление ММСК внутри сосудов костного мозга, принимая участие в передвижении клеток между костным мозгом и кровотоком [160]. Ruster и коллеги показали, что во взаимодействии ММСК и эндотелиальных клеток важно не только взаимодействие интегрин $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 или интегрин $\beta 1$, но и Р-селектин, и секреция MMP-2 [316]. Необходимость интегрин $\alpha 4$ для приживания костномозговых ММСК обоснована в других исследованиях, где костный мозг

овец или мышей инкубировали с анти-интегрин $\alpha 4$ антителами, что нарушало приживание репопулирующих костный мозг клеток [438].

Фибронектин является одним из главных гликопротеинов соединительной ткани, способным связываться с коллагеном фибрином и гепарансульфатами протеогликанов [314]. Также фибронектин играет важную роль в клеточной адгезии, росте, созревании, миграции и дифференцировке, особенно при заживлении ран [391]. Наряду с фибрином, плазменный фибронектин замещается в месте повреждения кровяным сгустком, предотвращающим кровотечение. При дальнейшей регенерации фибробласты и макрофаги деградируют белки, которые составляют матрикс временного кровяного сгустка, замещая его на матрикс, более похожий на нормальную окружающую ткань [359]. Фрагментированный фибронектин экспонирует свою вариабельную область, которая содержит сайты связывания с интегрином $\alpha 4\beta 1$, который экспрессируется на ММСК. Считается, что фрагменты фибронектина усиливают связывание $\alpha 4\beta 1$ -экспрессирующих клеток, позволяя им связываться и сильно сокращать окружающий матрикс [391]. Эти данные подтверждают точку зрения о важной роли взаимодействия интегрина $\alpha 4\beta 1$ с фибронектином в трансмиграции ММСК во внеклеточный матрикс.

Важным хемоаттрактантом для CXCR4-экспрессирующих клеток костного мозга гематопоетической системы является стромальный фактор-1 SDF-1. В других, негематопоетических системах, CXCR4-положительные клетки отвечают на секрецию SDF-1 поврежденными органами и мигрируют в эти области. Так, SDF-1 повышается в пограничной зоне ишемии при введении ММСК в хроническую стадию ишемического инсульта, при этом на самих ММСК показана экспрессия CXCR4, специфического рецептора SDF-1. Это говорит о том, что миграция ММСК в поврежденную зону мозга опосредуется взаимодействием SDF-1/CXCR4 и в хроническую стадию инсульта [334]. Исследователями [54] было идентифицировано, что SDF-1 и его рецептор CXCR4 являются ключевыми посредниками в привлечении циркулирующих прогениторных клеток в область ишемии. Эндотелиальная экспрессия SDF-1

может служить индикатором ишемии в ткани и напрямую регулируется фактором HIF-1. Интересно, что и SDF-1, и гипоксия присутствуют в костном мозге, и можно предположить, что гипоксия служит необходимым условием для функционирования и миграции прогениторных клеток. Резюмируя вышесказанное, можно заключить, что изменение эксперсии SDF-1 является значимым последствием повреждения головного мозга, привлекающим костномозговые ММСК в поврежденную область, что способствует функциональному восстановлению мозга после инсульта. В другой работе было показано, что хемоаттрактант моноцитов MCP-1, макрофагальный белок воспаления 1 (MIP-1 α) и интерлейкин-8 (IL-8), продуцируемые ишемизированной нервной тканью, усиливают миграцию ММСК в область ишемии [408].

Основной фактор роста фибробластов (bFGF) способен повышать миграционную активность ММСК через Akt-сигнальный путь. Интересно, что bFGF может оказывать противоположные эффекты на миграцию ММСК в зависимости от концентрации. В экспериментах с различными градиентами bFGF было показано, что низкие концентрации bFGF оказывают привлекающий эффект на ММСК, в то время как высокие концентрации не оказывают такого эффекта. Эти двойные свойства ММСК позволяют целенаправленно ориентировать ММСК [328].

De Becker и коллеги продемонстрировали, что матриксная металлопротеаза MMP-2, экспрессируемая ММСК, участвует в их миграции через эндотелий костного мозга. Более того, миграция ММСК в значительной степени зависит от плотности клеточной культуры: при относительно высокой плотности культуры повышается продукция ингибитора MMP-2, TIMP-3, что нарушает трансэндотелиальную миграцию ММСК [81].

Толл-подобные рецепторы, экспрессирующиеся на поверхности ММСК, также участвуют в миграции ММСК. Так, *in vitro* было показано, что в присутствии лиганда для TLR миграция ММСК усиливается и наоборот, при

ингибировании TLR нейтрализующими антителами миграция ММСК нарушается [383].

3.3.4. Внеклеточные везикулы.

Везикулы, которые клетки секретируют во внеклеточную среду, имеющие размеры от 40 до 1000 нм, называют внеклеточными везикулами (ВВ). В зависимости от их происхождения, наполнения и состава их содержимого ВВ подразделяют на микровезикулы, экзосомы и апоптотические тельца.

Экзосомы представляют собой малые мембранные везикулы размером от 40 до 150 нм и высвобождаются во внеклеточные жидкости живыми клетками [139; 197]. Они присутствуют в таких биологических жидкостях как кровь и спинномозговая жидкость [139]. Экзосомы содержат в себе белки, липиды и нуклеиновые кислоты и способны транспортировать свои грузы в клетки-мишени, что играет важную роль в межклеточной коммуникации и в физиологических, и в патофизиологических условиях [139; 197].

По сравнению с другими типами клеток культивируемые ММСК продуцируют большее количество экзосом [436]. Накопилось довольно много данных, свидетельствующих о том, что экзосомы ММСК оказывают терапевтический эффект при терапии ишемического инсульта, модулируя микроокружение в мозге [92; 428]. Внутривенное введение экзосом ММСК крысам с фокальной ишемией мозга улучшают неврологические функции, стимулируя нейроваскулярную пластичность [428; 429]. Аналогичное введение экзосом мышам после ишемии мозга снижало моторный дефицит и одновременно усиливало нейрогенез и ангиогенез [92]. Неврологические улучшения в вышеприведенных работах сравнимы с терапевтическими эффектами введения самих ММСК, что дает основание предполагать, что межклеточная коммуникация, опосредованная экзосомами ММСК вносит значительный вклад в терапевтические эффекты ММСК.

В числе веществ, транспортируемых экзосомами, немалую долю занимают микроРНК [294]. МикроРНК являются некодирующими РНК длиной

19-22 нуклеотида, выполняющими широкий спектр функций на пре- и пост-транскрипционном уровнях. Группой авторов был изучен эффект от экзосом ММСК, количество микроРНК в которых было увеличено генно-инженерным способом, на функции мозга после инсульта *in vivo* и *in vitro* [427; 430]. Лечение крыс с ишемией с помощью ММСК значительно увеличивало уровень микроРНК 133b (miR-133b) в поврежденном полушарии мозга. *In vitro* уровни miR-133b в ММСК и их экзосомах повышались после инкубирования ММСК с экстрактами из поврежденного полушария мозга крыс после ОСМА. Внутривенное введение экзосом ММСК с повышенным или сниженным содержанием miR-133b крысам с модельной ишемией приводило к улучшению или ухудшению аксонального ремоделирования и неврологических функций по сравнению с экзосомами нативных ММСК [429]. Ростовой фактор соединительной ткани CTGF и белок RhoA являются общепризнанными мишенями для miR-133b, для них характерно супрессирующее влияние на рост нейритов [427]. *In vitro*, инкубирование корковых нейронов с экзосомами, богатыми miR-133, снижало уровень экспрессии RhoA и усиливало разрастание нейритов, в тоже время культивирование астроцитов с экзосомами, богатыми miR-133b, супрессировало CTGF, главный ингибитор аксонального роста в сайтах повреждения в нервной системе у млекопитающих [99; 427]. Инсульт индуцирует системную иммуносупрессию, в результате чего ухудшается течение инсульта [263]. Кроме взаимодействия с клетками мозга, экзосомы ММСК способны осуществлять коммуникацию с натуральными киллерами и лимфоцитами периферической крови и ослаблять постишемическую иммуносупрессию у мышей с ишемией мозга [93].

3.4. Межклеточный транспорт митохондрий

С тех пор как Rustom и др. было описано, что клетки способны образовывать «нанотрубки», которые в длину могут достигать нескольких диаметров клетки и по которым возможна передача целых органелл [317], в последнее десятилетие значительно возрос интерес к феномену межклеточного

транспорта органелл. Общепринятыми способами межклеточных взаимодействий считаются прямые межклеточные контакты и лиганд-рецепторные взаимодействия, высвобождение и обратный захват синаптических пузырьков и ионные токи через щелевые контакты. Однако транспорт органелл в некоторой степени является другой формой межклеточных взаимодействий, поскольку представляет собой транспорт не только сигналов, но и целых внутриклеточных структур.

Описано более 40 вариантов межклеточного транспорта органелл, включая тельца Гольджи/эндоплазматического ретикулума, эндосомы [135], лизосомы [350] или меланосомы (родственные лизосомам органеллы, содержащие пигмент меланин) [1] и митохондрии [144; 159; 302; 357]. *In vitro* межклеточная передача органелл известна для множества разных типов клеток, включая человеческие и клетки грызунов, дифференцированные и мультипотентные, злокачественные и доброкачественные, эпителиальные, мезенхимальные и нейральные клетки. Таким образом можно с полной уверенностью заключить, что способность одних клеток донировать или получать органеллы от других клеток широко распространена среди различных типов клеток млекопитающих *in vitro*. В то же время важно то, что межклеточный транспорт органелл не универсален. Например, известно, что мезенхимальные стволовые клетки и фибробласты донируют митохондрии клеткам линии аденокарциномы легких с поврежденными митохондриями при совместном культивировании, в то время как у тромбоцитов эта способность отсутствует [356]. Существует множество примеров и гомотипической (например, от мезенхимальной клетки к мезенхимальной клетке [159]), и гетеротипической (например, от мезенхимальной клетки к кардиомиоциту) [304; 434] передачи органелл между клетками, полученными как от одного, так и от разных видов. Несомненно, список клеточных типов и органелл, участвующих в межклеточном транспорте, с каждым годом будет только расти.

3.4.1. Способы передачи митохондрий между клетками

Туннельные нанотрубочки (ТНТ) считаются основными структурами, которые опосредуют межклеточный транспорт митохондрий. Другими вероятными способами передачи митохондрий между клетками *in vitro* являются транспорт посредством внеклеточных везикул (экзосом) и слияние клеток. Транспорт митохондрий по ТНТ будет освещен отдельно, поскольку это явление мы достаточно часто наблюдали и в наших системах сокультивирования.

Компоненты митохондрий во внеклеточных везикулах обнаружены, хотя механизмы, по которым митохондриальные белки и митохондриальная ДНК в ВВ загружаются до конца неясны. Экзосомы имеют размер 40-150 нм, содержат в себе генетический материал, по большей части это малые РНК [258], но геномная и митохондриальная ДНК (мтДНК) в них также была обнаружена [131; 382]. Большие по размеру ВВ содержат целые митохондриальные частицы и мтДНК, как например ВВ, образуемые ММСК и астроцитами [142; 298]. В последнем случае показана корреляция между захватом астроцитарных митохондрий нейронами и восстановлением неврологических функций у мышей после окклюзии средней мозговой артерии. Также показано участие ВВ в межклеточном транспорте митохондрий [158; 356]. Горизонтальный перенос митохондрий происходит через передачу как частей митохондрий, так и целых органелл.

На сегодняшний день механизмы межклеточного транспорта свободной мтДНК через обе митохондриальные мембраны и плазматическую мембрану остаются расплывчатыми. Транспорт целых митохондрий в ВВ является более вероятным событием, опосредующим восстановление митохондриальной функции, таким образом клетки могут получить немного митохондрий и увеличить количество копий своей мтДНК.

Другим способом межклеточной передачи митохондрий является слияние клеток. Выше уже упоминалось о слиянии в контексте участия этого процесса в дифференцировке стволовых клеток в нейральные клетки при их

взаимодействии *in vivo* и *in vitro*. Для нескольких клеточных типов костномозгового происхождения показана возможность спонтанного слияния с другими типами клеток, включая кардиомиоциты, гепатоциты и нейроны Пуркинье [8][260; 414]. Поскольку при слиянии две отдельные клетки сливаются своими цитоплазматическими мембранами с объединением цитоплазм обеих клеток, транспорт митохондрий с большой долей вероятности в этих условиях тоже происходит. Так показан транспорт митохондрий при частичном слиянии между клетками астроцитомы [278], когда происходит образование тонких длинных трубок между опухолевыми клетками, соединяющимися между собой щелевыми контактами. Образование такой сети обеспечивает эффективную опухолевую прогрессию, функциональную коммуникацию и устойчивость к радиотерапии.

Однако в работе Spees и др. [356] такой способ передачи митохондрий как слияние клеток не получил своего подтверждения. Анализ 9 коротких tandemных повторов в клонах ро-нулевых клеток линии A549 после сокультивирования с человеческими ММСК выявил ядерные геномы только клеток A549 во всех из 12 проанализированных клеточных клонов.

3.4.2. Транспорт митохондрий по ТНТ

Интересно, что исследование межклеточной передачи органелл изначально развивалось в параллели с изучением ТНТ - сравнительно нового типа межклеточных контактов, для которого явление межклеточного транспорта описано максимально широко.

ТНТ были исходно описаны Ruston и др. [317] как длинные, тонкие структуры (до 100 мкм в длину и 50-200 нм в диаметре), образуемые клетками феохромоцитомы PC12 в культуре, не контактирующие с субстратом. В последующих исследованиях выяснилось, что эти характеристики ТНТ варьируются у разных типов клеток и при определенных воздействиях. Например, ТНТ, образуемые между эндотелиальными прогениторными клетками и крысиными кардиомиоцитами имели диаметр от 50 до 800 нм и в

длину составляли 5-120 мкм [189]. А такие стрессовые воздействия как добавление H_2O_2 и длительное культивирование в среде без сыворотки индуцировали образование ТНТ в культурах первичных гиппокампальных нейронов и астроцитов, при этом длина образуемых ТНТ варьировалась в пределах 21-30 мкм [413].

Особенная морфология ТНТ вызывает вопросы о том как они образуются и что в себе содержат. Используя конфокальную микроскопию в режиме реального времени было обнаружено, что сначала клетка образует выпячивание, похожее на филоподию, по направлению к другой клетке, лидирующий конец которой затем сливается с мембраной соседней клетки, филоподия затем сокращается, образуя цитоплазматический тяж [317]. Bukharestliev и др. отметили, что большинство нанотрубок образуется по описанному выше способу - через выпячивание филоподии, и гораздо реже ТНТ образуются вследствие того, что клетки перемещаются друг от друга после прямого контакта. Такой способ образования ТНТ показан, например, для иммунных клеток после разборки иммунологического синапса [272]. Интересно, что в цитоскелете ТНТ, образующихся между макрофагами, существует гетерогенность, которая лежит в основе различных функциональных свойств ТНТ. Onfelt и др. показали, что помимо «тонких» ТНТ, содержащих F-актин, макрофаги могут контактировать посредством «толстых» нанотрубок диаметром более 700 нм, в составе которых есть и F-актин, и микротрубочки. По «толстым» ТНТ происходит передача органелл, в то время как по поверхности «тонких» перемещаются бактерии к телу макрофага, происходит их интернализация и фагоцитоз [271].

Ряд исследователей считают образование ТНТ необходимым и достаточным условием для межклеточной передачи органелл. Необходимость ТНТ подтверждена в экспериментах, где каким-либо образом нарушалось их образование - в условиях продолжительной вибрации или добавления химических ингибиторов образования ТНТ. Например, присутствие наномолярных количеств цитохалазина В или D, которые, как полагают,

ингибируют полимеризацию актина, приводит к нарушению образования ТНТ, и следовательно, к снижению эффективности межклеточного транспорта органелл [47].

Достаточность ТНТ подтверждена в исследованиях, где клетки крысиной феохромоцитомы и клетки почки крысы культивировали при низких температурах (около 0°C), когда, по-прежнему происходит образование ТНТ, но приостанавливаются другие способы транспорта, такие как эндоцитоз, экзоцитоз и фагоцитоз. Межклеточная передача органелл в данных культурах клеток также наблюдается [133; 317].

Так же была показана зависимость межклеточного транспорта органелл от внутриклеточного содержания АТФ. Например, добавление азида натрия в культуральную среду частично ингибировало межклеточную передачу органелл между клетками почки крысы, при этом количество ТНТ не изменялось [134].

3.4.2.1. Механизмы ТНТ-опосредованного межклеточного транспорта митохондрий

Хотя вопрос о механизмах транспорта по ТНТ остается открытым, предлагаются некоторые возможные варианты. Для органелл преобладает F-актин-зависимый однонаправленный транспорт за исключением ассоциированного с микротрубочками двунаправленного транспорта органелл, происходящего в толстых ТНТ, образуемых макрофагами [271]. Что касается однонаправленного транспорта, то для каждой пары клеток, соединенных ТНТ, строго определено направление передачи органелл: от клетки, которая выпустила нанотрубку (клетка-донор) к клетке, которая эту ТНТ получила, то есть реципиенту [317]. Таким образом, из вышесказанного следует, что транспорт митохондрий по большей части - направленный и энергозависимый процесс.

В частности, в случае ТНТ, не содержащих в себе микротрубочки, предлагаются актин-миозин-зависимый механизм передачи и транспорт, в основе которого лежит ретроградный поток F-актина, так называемый

межклеточный тредмилинг. Gurke и др. исследовали вклад этих механизмов на клетках взрослой почки, используя S-(-)-блеббистатин - высокоаффинный, селективный ингибитор мышечных и немышечных изоформ миозина II [361], действие которого в конечном счёте нарушает ретроградный ток актиновых филаментов [237], и 2,3-бутандион монооксим (БДМ) – низкоаффинный неселективный ингибитор миозинов [147], который ингибирует ретроградный ток F-актина [217], а также миозин-опосредованное движение везикул ([100], секреторных органелл [250], пероксисом [162] и митохондрий [193]. Присутствие S-(-)-блеббистатина в среде значительно повышало транспорт органелл, в то время как БДМ оказывал ингибирующий эффект, хотя оба вещества индуцировали образование ТНТ. Вероятнее всего негативный эффект БДМ обусловлен ингибированием нетрадиционных миозиновых моторных белков наряду с миозином II. Одним из кандидатов среди миозинов, опосредующих движение органелл по ТНТ, является миозин V, поскольку он был обнаружен в ТНТ и частично ко-локализован с синаптическими микровезикулами [317].

Значительную роль в межклеточном транспорте митохондрий играют митохондриальные Rho-ГТФазы Miro, самая известная из которых-Miro1 (митохондриальная Rho-ГТФаза 1, синоним Rhot1). Как и все Rho-ГТФазы, оба гомолога Miro1 и Miro2 синтезируются в цитоплазме, и их активность регулируется связыванием с ГТФ. Miro является достаточно консервативным белком для эукариот и играет критическую роль в морфологии митохондрий, наследовании митохондрий дочерними клетками во время деления, митохондриальном гомеостазе. Также они являются ключевыми регуляторами цитоскелет-опосредованного транспорта митохондрий на довольно большие расстояния в нервных клетках многоклеточных организмов [380]. Их уникальная доменная структура включает 2 ГТФазных домена, которые фланкируют 2 кальций-чувствительных домена типа спираль-петля-спираль (EF-hand) [251] и С-концевой трансмембранный домен. Следует заметить, что Miro необходимы для обеспечения как anterograde, так и retrograde

аксонального транспорта [315]. В случае антероградного аксонального транспорта митохондрий по микротрубочкам у дрозофил, Miro взаимодействует с белком Milton (**Рис.1**). Ранее было обнаружено, что он играет важную роль в митохондриальном транспорте в нейронах [360]. Традиционно Milton в комплексе с Miro с одной стороны взаимодействует с тяжелыми цепями кинезина, а с другой - с митохондрией [125]. Таким образом, Milton/тяжелые цепи кинезина/Miro является функциональным комплексом, обеспечивающим антероградный транспорт митохондрий по микротрубочкам. Самыми близкими ортологами Milton у млекопитающих являются OIP106/TRAK1 и GRIF-1/TRAK2 [115], для которых также показано взаимодействие с Miro млекопитающих. В случае ретроградного транспорта в качестве моторных белков выступают динеин в комплексе с динактином [116].

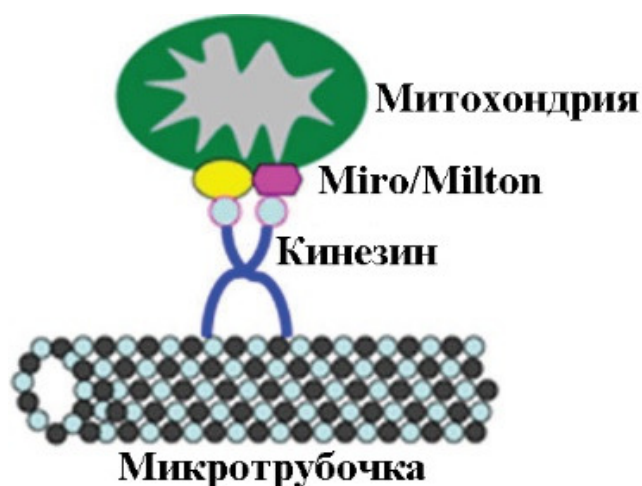


Рис.1. Схема взаимодействия Miro с другими белками при антероградном транспорте митохондрий. Miro образует комплекс с Milton и тяжелой цепью кинезина и опосредует митохондриальный транспорт по микротрубочкам

Miro1 не только участвует в передвижении митохондрий в пределах клеток определенных типов, но и опосредует межклеточную передачу митохондрий. В недавней работе Agrawal и коллег было показано, что ТНТ-опосредованный межклеточный транспорт митохондрий между мезенхимальными стромальными клетками и эпителиальными клетками легких зависит от уровня Miro1 [3]. На сегодняшний день единая картина механизмов регуляции митохондриального транспорта еще не составлена, при этом имеется

некое подобие «протеома ТНТ», состоящего приблизительно из 275 белков [166].

Помимо влияния на механизмы транспорта по ТНТ, наблюдаемое усиление межклеточного транспорта митохондрий при различных воздействиях также обусловлено изменением количества образующихся ТНТ. Lou и др. наблюдали усиление образования ТНТ при повышенном содержании глюкозы, закислении среды и удалении из нее сыворотки [224]. Ключевую роль для образования ТНТ играет проапоптотический белок p53: выключение его функции с помощью малой интерферирующей РНК в гиппокампальных нейронах и астроцитах приводит к ингибированию образования ТНТ [413]. Авторами было показано, что стрессовое воздействие на клетку индуцирует активацию p53, инициируя сигнальный каскад Akt/PI3K/mTOR через усиление экспрессии рецептора эпидермального фактора роста EGFR. Позднее было продемонстрировано, что направление образования ТНТ зависит от градиента концентрации белка S100A4: от клетки с низкой концентрацией S100A4 к клетке с высокой его концентрацией. Активация сигнального пути Akt/PI3K/mTOR в свою очередь активирует каспазу-3, которая расщепляет S100A4, снижая его концентрацию в стрессированной клетке, что приводит к образованию ТНТ по направлению к клетке с высоким содержанием S100A4 [366].

ТНТ были обнаружены не только в культуре клеток, но и в тканях, например между кардиомиоцитами и фибробластами в сердце мыши [143], в таких опухолях как плевральная мезотелиома и низкодифференцированная аденокарцинома легких [225] и в клетках роговицы глаза [66]. Пока существует несколько работ, в которых транспорт митохондрий был продемонстрирован *in vivo* напрямую. В одной из них митохондрии были обнаружены в бронхиальном эпителии после введения ММСК животным с модельным повреждением дыхательной системы ротеноном [3]. В этом случае транспорт митохондрий зависел от образования ТНТ и активности Rho-ГТФазы Miro1. Но в другой работе передача меланосом (мембранных пузырьков, содержащих пигмент

меланин) из меланоцита в кератиноцит происходила без образования ТНТ, путем отшнуровывания от вершущек отростков меланоцита везикул, содержащих меланосомы, и их фагоцитоза кератиноцитом [426].

Эти и другие наблюдения говорят о том, что, возможно, в основе митохондриального транспорта *in vivo* лежат механизмы, отличные от таковых *in vitro*.

3.4.2.2. Последствия межклеточного транспорта митохондрий

3.4.2.2.1. Восстановление жизнеспособности клеток-реципиентов после повреждения

На сегодняшний день накопилось некоторое количество работ, в которых показано восстановление клеточных функций и повышение жизнеспособности клеток после транспорта митохондрий на моделях различных повреждений клеток. В одной из таких работ использовали клетки линии A549, которые длительное время культивировали в присутствии бромистого этидия, нарушая таким образом репликацию митохондриальной ДНК, что практически лишало клетки функциональных митохондрий. Утрата митохондрий приводила к нарушению аэробного дыхания, такие клетки (их называют р-нулевыми) могли пролиферировать только в среде, содержащей пируват и уридин для усиления анаэробного гликолиза и синтеза нуклеотидов. После сокультивирования чММСК с р-нулевыми A549, в культуре обнаруживались A549 с донорскими митохондриями, которые были способны к экспоненциальному росту в среде без пирувата и уридина, аналогично интактным A549, в них восстанавливалась трансляция митохондриальных белков, снижалась продукция лактата и активных форм кислорода, при этом возрастало количество внутриклеточного АТФ и потребление кислорода клеткой [356]. Изменение этих показателей говорит о том, что р-нулевые A549, получившие «здоровые» митохондрии из ММСК, стали получать энергию в результате окислительного фосфорилирования, а не только гликолитического способа.

В другой работе было показано, что мышечные костномозговые ММСК снижают выраженность липополисахарид-индуцированного острого

повреждения легких, что проявляется снижением количества лейкоцитов и альбумина в бронхоальвеолярном секрете и повышении выживаемости мышей. Причем показана строгая зависимость от экспрессии коннексина 43(Cx43) в ММСК: ММСК с мутантным Cx43 или ММСК, несущие малую интерферирующую РНК против Cx43, не оказывают положительного эффекта на лейкоцитоз и выживаемость после острого повреждения легких. Cx43 дикого типа необходим для формирования щелевых каналов и передачи митохондрий между ММСК и альвеолоцитами, в случае ММСК с мутантным Cx43 передачи митохондрий не наблюдалось. Эти данные были подтверждены другими исследователями на моделях повреждения эпителия легких, вызванного ротеноном, и овальбумин-индуцированной астмы, а также была исследована регуляция межклеточного транспорта митохондрий и найдена молекулярная мишень, ответственная за эффективность передачи митохондрий и терапевтические эффекты *in vivo* [3]. Показано, что белок Miro1 регулирует движение митохондрий между клетками из ММСК в эпителиальные клетки. При этом гиперэкспрессия Miro1 в ММСК повышает частоту передачи митохондрий и эффективнее предотвращает развитие повреждения эпителия дыхательных путей по сравнению с нативными ММСК, в то время как нокаут гена этого белка отменяет описанный терапевтический эффект.

Известно, что сигаретный дым вызывает повреждение митохондрий в эпителии дыхательных путей и легких с последующим развитием хронической обструктивной болезни легких. И недавно Li и др. было продемонстрировано, что ММСК, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC-ММСК), способны передавать свои митохондрии в эпителиоциты легких и предотвращать их повреждение сигаретным дымом как *in vivo*, так и *in vitro*, а также проведено сравнение iPSC-ММСК с взрослыми человеческими ММСК, полученными из костного мозга [211]. В группе крыс, которым вводили iPSC-ММСК, уменьшение размера альвеол и снижение выраженности фиброза происходило значительнее, чем в случае взрослых ММСК, при этом *in vitro* наблюдалась более эффективная передача митохондрий из iPSC-ММСК в

эпителиальные клетки бронхов BEAS-2B, а также восстановление уровня внутриклеточного АТФ до значений неповрежденных сигаретным дымом BEAS-2B. Все это указывает на более высокую способность iPSC-ММСК предотвращать повреждение легких, вызванное сигаретным дымом по сравнению с взрослыми ММСК.

Достаточно большое количество работ посвящено механизмам восстановления функций мозга после инсульта. В одной из них было показано, что астроциты могут высвобождать за пределы клетки функционально-активные митохондрии, которые захватываются нейронами. Образование внеклеточных митохондрия-содержащих частиц астроцитами происходит с участием CD38, фермента, катализирующего синтез и гидролиз циклической АДФ-рибозы. Именно при индукции фокальной ишемии мозга у мышей происходит захват астроцитарных митохондрий соседними нейронами, что повышает их выживаемость, а супрессия CD38-опосредованного сигналинга siRNA наоборот ослабляет межклеточный транспорт митохондрий и снижает выраженность неврологических эффектов [142]. Это говорит о наличии нового механизма нейроглиальной коммуникации, лежащего в основе эндогенной нейропротекции после инсульта.

Отдельной, особенно актуальной областью, где знания о транспорте митохондрий очень важны для понимания результатов терапии и выбора эффективной стратегии лечения пациента, является биология опухолей. Эта область динамично развивается, и на данный момент накопилось немало экспериментальных данных. Так, было показано, что мезенхимальные стволовые клетки передают свои митохондрии клеткам остеосаркомы 143В, когда те практически лишены митохондрий в результате длительной обработки бромистым этидием. При этом в клетки-реципиенты, накопившие патогенные мутации митохондриальной ДНК, транспорта митохондрий не наблюдалось [68].

Ро-нулевые клетки линии В16, пересаженные подкожно сингенным мышам, не давали рост опухоли до тех пор, пока не получали

митохондриальную ДНК от клеток хозяина (мышь). Причем восполнение пула митохондриальной ДНК происходило за счет передачи целых мышинных митохондрий, вследствие чего восстанавливались дыхательные функции митохондрий в подсаженных клетках линии В16 [97].

Также недавно стало известно, что передача митохондрий служит еще и механизмом резистентности от радио- и химиотерапии у опухолей [244; 278]. Так в одной работе [278] клетки астроцитомы, характеризующейся диффузным инфильтрирующим ростом и в связи с этим неоперабельной, образуют между собой соединения по типу ТНТ, которые служат для инвазии, пролиферации и коммуникации на большие расстояния. Повреждение такой сетевой опухоли вследствие радиотерапии предотвращается благодаря ТНТ, по которым происходит транспорт митохондрий, ядер и белков из неповрежденных клеток. Более того защита от радиотерапии таким образом происходит лишь в тех клетках астроцитомы, которые соединены между собой ТНТ, неинтегрированные в астроцитому одиночные клетки погибали. Таким образом нарушение сообщения между клетками астроцитомы является новым возможным способом преодоления радиорезистентности у данного вида опухолей.

Наряду с вышеописанным транспорт митохондрий способствует формированию резистентности к химиотерапии при острой миелоидной лейкемии [244]. Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга передают свои митохондрии лейкемическим клеткам путем эндоцитоза, что показано как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. При этом химиотерапевтическое воздействие приводит к усилению митохондриальной передачи в лейкемические клетки, повышению в них продукции АТФ, клетки менее подвержены митохондриальной деполяризации, демонстрируя более высокую выживаемость. Из этого следует, что транспорт митохондрий может служить мишенью для предотвращения химиорезистентности у опухолевых клеток

Таким образом, митохондриальная дисфункция клеток-доноров служит главным триггером для передачи митохондрий. Более того в большинстве

случаев для передачи митохондрий необходим сигнал бедствия в виде выраженной митохондриальной дисфункции в клетках-реципиентах или полной их элиминации.

3.4.2.2.2. Перепрограммирование клеток

Показана корреляция между межклеточной передачей митохондрий и дифференцировкой [301]. На модели сокультивирования ММСК и кардиомиоцитов был продемонстрирован транспорт митохондрий в направлении из ММСК в кардиомиоциты, при этом в ММСК начали экспрессироваться кардио-специфичные белки, в частности, тяжелая цепь бета-миозина. В другом аналогичном исследовании при сокультивировании почечного эпителия и ММСК также происходил направленный транспорт митохондрий и появлялись признаки дифференцировки ММСК по пути эпителиоцитов.

Возможность дифференцировки ММСК была также проанализирована при сокультивировании их с гладкомышечными клетками [394]. В этих условиях не происходит ожидаемой дифференцировки ММСК, однако наблюдается усиление их пролиферации, как следствие передачи митохондрий по ТНТ. Блокирование образования ТНТ химическими агентами латрункулином В или цитохалазином Д или сокультивирование с ММСК, несущими нефункциональные митохондрии, приводило к отмене эффекта на пролиферацию.

В совместных культурах мышинных кардиомиоцитов и человеческих ММСК наблюдался обратный эффект – возврат в более незрелое состояние [394]. Сокультивирование зрелых кардиомиоцитов и стволовых клеток, выделенных из жировой ткани, приводило к образованию контактов, передаче митохондрий в кардиомиоциты и последующему частичному слиянию клеток. Полученные гибриды имели более прогениторный фенотип, нечто среднее между стволовой клеткой и дифференцированным кардиомиоцитом. Эффект дедифференцировки отменялся в случае предварительной обработки ММСК

бромистым этидием, что говорит о необходимости транспорта митохондрий для его реализации.

3.4.2.3. Контроль межклеточной передачи митохондрий

Количество работ, в которых сообщается о положительных последствиях транспорта митохондрий *in vivo* хоть и небольшое по сравнению с *in vitro*, но с каждым годом растет. Так же известно, что транспорт митохондрий из собственных здоровых клеток ткани восстанавливает митохондриальные функции в поврежденных в результате ишемии клетках, например после ишемического инсульта астроциты донируют митохондрии в нейроны, нормальное функционирование митохондрий которых сильно нарушено [142]. Возникает вопрос, почему транспорт митохондрий в таком варианте (от своих здоровых к своим поврежденным клеткам) не происходит настолько эффективно, чтобы обеспечить восстановление функций до уровня, который удастся достичь, прибегая к другим видам терапии (медикаментозной, физиотерапевтической и др.) Вероятное объяснение этих несоответствий лежит в системе контроля качества митохондрий, ярким примером работы которой является материнское наследование митохондрий у млекопитающих.

Известно, что у млекопитающих митохондрии наследуются по материнской линии. Митохондрии сперматозоида в процессе оплодотворения попадают в яйцеклетку и некоторое время отцовская мтДНК обнаруживается в клетках развивающегося эмбриона. Однако в период с 1 по 4 деление зиготы (у разных животных эти сроки варьируются), до начала имплантации отцовские митохондрии полностью элиминируются из клеток эмбриона [355]. Эта элиминация заключается в мечении отцовских митохондрий убиквитином и направлении их в фагосому или протеасому для последующей протеолитической деградации. На резус-макаках, мышах и коровах показано, что митохондрии сперматозоида, подвергаются убиквитинированию и последующей протеолитической деградации сразу после попадания в цитоплазму ооцита [368; 369]. Убиквитинированные белковые комплексы или белки мембранных органелл могут либо подвергаться деградации в 26S

протеасоме, мультимерном белке-протеазе, либо окружаться фагофором, образуя аутофагосому, с последующим слиянием с лизосомой и протеолитической деградацией [355]. Интересно, что убиквитин-зависимый контроль качества сперматозоидов происходит и во время сперматогенеза [367] в семенниках млекопитающих. Убиквитин секретируется эпителием семенника, связывается с поверхностью дефектного сперматозоида, в результате большинство «меченных» сперматозоидов фагоцитируются эпителиальными клетками семенника. Часть дефектных сперматозоидов избегает такой селекции, обнаруживается в эякуляте, и, вероятно, могут участвовать в оплодотворении.

In vitro у эмбриона коровы отцовские митохондрии элиминируются между 4 и 8 стадиями [370]. Однако при межвидовом скрещивании этого не происходит, отцовские митохондрии не убиквитинируются и присутствуют на стадии 8-клеточного эмбриона [368]. Эти наблюдения согласуются с данными о длительном присутствии отцовской мтДНК в клетках межвидовых гибридов у мышей [341], что говорит о том, что при селективной элиминации митохондрий помимо половой принадлежности учитываются и видо-специфические особенности.

Стоит заметить, что в экспериментах по сокультивированию клетки, тем более перевиваемые, часто имеют разную видовую принадлежность, что может объяснить сохранение донорских митохондрий в клетках реципиента. К примеру в исследованиях, где проводили сокультивирование мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток с кардиомиоцитами [303] или эпителиальными клетками канальцев почки [301], наблюдали именно межвидовую передачу митохондрий. Для того, чтобы отличать стволовые клетки от других клеток в совместных культурах, в экспериментах использовались ММСК человека и кардиомиоциты и эпителиальные клетки почек крысы.

3.4.2.4. Возможности терапевтического использования транспорта митохондрий

Количество изученных заболеваний, при которых нарушение митохондриальной функции является важным звеном патогенеза, постоянно растет. Причинами проявления патологических синдромов являются мутации в митохондриальной и геномной ДНК, а также воздействие внешних факторов. Для восстановления функции митохондрий уже активно применяются и разрабатываются фармакологические средства митохондриально-направленного действия [351; 353]. Сравнительно новым и иногда альтернативным способом терапии митохондриально-ассоциированных болезней является пополнение пула митохондрий поврежденных клеток здоровыми донорскими митохондриями.

Стоит заметить, что в большинстве описанных случаев передачи митохондрий между соматическими клетками донорами митохондрий являются стволовые или прогениторные клетки [30; 299]. Это открывает еще один, сравнительно новый механизм терапевтического действия этих клеток. Вдобавок к способности передавать свои митохондрии, такое свойство стволовых клеток как направленная миграция (хоуминг) в поврежденную ткань или в очаг воспаления позволяет рассматривать их как готовое средство для трансплантации здоровых митохондрий в органы-мишени.

Для пренатального предупреждения митохондриальных заболеваний могут быть эффективны разные варианты замены дефектных митохондрий на ранних стадиях эмбриогенеза, например микроинъекция донорских митохондрий в ооцит или перенос ядра, окруженного митохондриями из здорового ооцита в ооцит реципиента [377]. Наряду с методами механической замены митохондрий в ооцитах с помощью микроманипуляций, часто используемых в репродуктологии, отдельного внимания заслуживает транспорт митохондрий, происходящий при сокультивировании разных типов клеток. Таким образом можно сокультивировать стволовые клетки с зиготой, и, есть

вероятность того, что митохондрии стволовых клеток не будут элиминированы, как это происходит на ранних стадиях эмбриогенеза.

Опираясь на последние данные о повышении терапевтического потенциала ММСК за счет воздействия на белок системы транспорта митохондрий Miro1 [3], следует искать другие фармакологические агенты, вызывающие усиление транспорта митохондрий через воздействие на эту молекулярную мишень. Более широкое представление о регуляции системы транспорта митохондрий в ММСК даст основание для максимально эффективной клеточной терапии многих синдромов и болезней.

Дальнейшее развитие в области движения митохондрий между клетками повлияет на базовые представления как о межклеточном транспорте и способах межклеточной коммуникации, так и о многих состояниях, патогенез которых связан с повреждением митохондрий: митохондриальные болезни, нейродегенеративные и нейромышечные заболевания, ишемические и воспалительные повреждения, рак и даже старение.

Глава 4 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

4.1. Получение первичной культуры нейральных клеток.

Культура нейральных клеток крысы была получена из мозга эмбрионов крыс на 16–18 сут гестации. Беременную крысу усыпляли эфирным наркозом. Матку извлекали в асептических условиях; выделение из нее эмбрионов и дальнейшие этапы получения нейронов осуществляли стерильно. Извлеченную матку с эмбрионами помещали в стерильный физиологический раствор.

Эмбрионы обрабатывали в течение 3 мин 70% раствором спирта. После обработки стерилизующим раствором у эмбрионов отделяли голову, выделяли полушария головного мозга и переносили их в чашку Петри, заполненную холодным (+4°C) фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Отмывали этим же раствором 3 раза, меняли ФСБ на теплую смесь 0,05% трипсин-ЭДТА, инкубировали в ней в течение 15 мин при 37°C. После инкубации ткань промывали в трех сменах теплого ФСБ и подвергали механической диссоциации в 7 мл бессывороточной нейробазальной среды (NBM) с 2% содержанием В-27 и 1% глутамина (далее – нейробазальная среда) в 15 мл пробирке, трижды осаждали (4 мин стояния на столе), забирая верхние 2 мл суспензии в отдельную пробирку. Полученную суспензию клеток доводили до нужного объема средой NBM/2% В-27/1% глутамин, переносили на 5 мин на пластиковые чашки Петри (диаметром 35 мм), а также в шестилуночные пластиковые планшеты и культуральные флаконы, предварительно покрытые раствором поли-D-лизина в концентрации 10 мкг/мл. Затем суспензию сливали, к прикрепившимся клеткам добавляли свежую среду NBM/2%В-27/1% глутамин. Плотность культуры составляла 160 кл/мм² в опытах по сокультивированию и 320 кл/мм² для фенотипирования нейральной культуры. Культура развивалась в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и относительной влажности 98%. Нейральную культуру включали в эксперимент, начиная с 8 сут *in vitro*.

В течение всего времени культивирования в нейральной культуре производили смену половины объема нейробазальной среды раз в неделю.

Подложки для культивирования нейральной культуры перед использованием покрывали раствором поли-D-лизина в концентрации 10 мкг/мл на ФСБ в течение 1 ч, затем отмывали в 3-х сменах ФСБ.

Для подсчета содержания нейронов и астроцитов нейральную культуру предварительно окрашивали антителами к β III-тубулину и глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP), подсчет проводили с помощью программного пакета ImageJ.

4.2. Мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки

4.2.1. Получение мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток

Культура ММСК человека была предоставлена НЦ Акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова. Работа с использованием этих клеток была одобрена Комиссией по биоэтике и проводилась в соответствии с законодательством РФ (приказ МЗ №302 от 28.12.1993 и приложения №3 от 05.04.1994). Клетки выращивали в питательной среде, состоящей из DMEM/F-12 (в соотношении 1:1), 10% эмбриональной телячьей сыворотки, по 1% глутамина, витаминов (ПанЭко, Россия) и аминокислот (Gibco, США) на культуральных флаконах (Corning, USA).

Культуру крысиных ММСК получали из костного мозга трубчатых костей 10-дневных крысят. Крысята усыплялись эфиром, в стерильных условиях выделялись бедренная и берцовая кости из задних конечностей. Клетки вымывали из костного мозга средой DMEM/F-12 (в соотношении 1:1), ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из DMEM/F-12 (в соотношении 1:1), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), по 1% глутамина, витаминов (ПанЭко, Россия) и аминокислот (Gibco, США), и высаживали на культуральные флаконы (Corning, USA). После прикрепления ММСК к пластику (через 24 ч) неприкрепившиеся клетки отмывали, а

адгезивную культуру культивировали в течение нескольких пассажей на полной питательной среде.

4.2.2. Иммунофенотипирование ММСК

Для иммунофенотипирования ММСК диссоциировали с помощью 0,05% трипсин-ЭДТА, отмывали в ФСБ/1% БСА, осаждали центрифугированием в течение 5 минут со скоростью 2000 об/мин. Клетки в концентрации 10^6 кл/мл инкубировали в течение 30 минут с антикрысиными антителами к CD44, CD90, CD45, CD34, CD31, меченными FITC, и к CD105, CD31, меченными PE, в разведении 1:100 при комнатной температуре (RT). В качестве изотипического контроля использовали мышиные иммуноглобулины G1, меченные FITC или PE. После инкубации клетки отмывали в PBS, центрифугировали в течение 5 минут со скоростью 2000 об/мин и анализировали на проточном цитометре (CyFlow, Partec).

После 3 пассажа фенотип ММСК был подтвержден позитивной окраской на маркеры CD44, CD90 и CD105, CD73 и негативной на маркеры CD34, CD45, CD31.

4.2.3. Остеогенная и адипогенная дифференцировка

Кроме того, клетки, полученные из костного мозга крыс, были охарактеризованы по дифференцировочному потенциалу – исследовали дифференцировку клеток культуры в адипогенном и остеогенном направлении. Для этого клетки (пассаж 3) в течение 3 недель инкубировали в фирменных дифференцировочных средах GIBCO: STEMPRO® Adipogenesis Differentiation Kit (адипогенность), STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit (остеогенность). Каждые 4-6 дней проводили смену половины объема среды культивирования. Через 3 недели клетки фиксировали с помощью 4% формальдегида в течение 15 минут при температуре +4°C. После этого клетки, культивированные на адипогенной среде, инкубировали с 0,5% красителем Судан III в течение 20 минут, докрашивали гематоксилином в течение 20 мин. Клетки, культивированные на остеогенной среде, инкубировали в течение 20

минут с 1 % Ализариновым красным. Затем клетки анализировали на фазово-контрастном микроскопе.

4.3. Получение и культивирование первичной культуры астроцитов

Культуры астроглиальных клеток получали в соответствии с модифицированным методом МакКарти и де Веллис из головного мозга 1-2 суточных крысят. Из головного мозга выделяли кору больших полушарий, очищали от мозговых оболочек и инкубировали в растворе 0,05% трипсина-ЭДТА, при 37°C в течение 30 мин. После ферментативной диссоциации ткани промывали дважды в ФСБ и далее пипеткой Пастера механически диссоциировали в полной питательной среде, состоящей из DMEM/F-12 (в соотношении 1:1), 10% ЭТС (РАА, США), с добавлением глутамина, витаминов (ПанЭко, Россия) и аминокислот (Gibco, США). Суспензию клеток высевали на вентилируемые культуральные флаконы (Costar, США), предварительно покрытые поли-D-лизином. Клетки выращивали на полной питательной среде в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO₂. Через 8-10 дней культуры подвергали воздействию вибрации на орбитальном шейкере при 250 об/мин в течение 16 ч для открепления и удаления микроглии. В эксперимент включали культуры на 3-4 пассажах.

4.4. Получение ро-нулевых клеток линии PC12

Ро-нулевые клетки получали путем длительного культивирования клеток феохромоцитомы крысы PC12 в питательной среде, состоящей из DMEM/F-12 (в соотношении 1:1), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА, США), с добавлением глутамина, витаминов (ПанЭко, Россия) и аминокислот (Gibco, США), 110 мкг/мл пирувата натрия (ПанЭко, Россия), 50 мкг/мл уридина (Carl Roth, Германия) и 100 нг/мл бромистого этидия в течение 4-6 недель.

4.5. Сокультивирование различных типов клеток и ММСК

Для сокультивирования ММСК диссоциировали раствором 0,05% трипсин-ЭДТА и полученную суспензию добавляли к культуре нейральных

клеток или астроцитов, или PC12 в соотношении 1:1. Смешанная культура нейральных клеток и ММСК содержалась в нейробазальной среде с 2% содержанием сыворотки, а смешанная культура ро-нулевых клеток и ММСК - в питательной среде, состоящей из DMEM/F-12 (в соотношении 1:1), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА, США), с добавлением глутамина, витаминов (ПанЭко, Россия) и аминокислот (Gibco, США), 110 мкг/мл пирувата натрия (ПанЭко, Россия), 50 мкг/мл уридина (Carl Roth, Германия). Совместные культуры находились в CO₂ -инкубаторе в течение суток или сразу включались в эксперимент.

4.6. Трансфицирование клеток

Для экспрессии в клетках флуоресцентных белков использовалась инфекция лентивирусными частицами, кодирующими зеленый флуоресцентный белок (GFP) или GFP, слитый с сигналом митохондриальной локализации субъединицы VIII цитохром с оксидазы (mitoGFP), или красный флуоресцентный белок DsRed, слитый с сигналом митохондриальной локализации субъединицы VIII цитохром с оксидазы (mitoDsRed). Для получения лентивирусных частиц лентивирусные конструкции были внесены в клетки 293Т с помощью трансфекции с использованием Lipofectamin LTX (Invitrogen, USA) вместе с упаковочными плазмидами pCMV-deltaR8.2 и pCMV-VSV-G, как описано ранее [308]. Культуральная среда, содержащая готовые лентивирусные частицы, несущие гены нужных флуоресцентных белков, собиралась не ранее чем через 24ч после трансфекции и использовалась для инфицирования нейронов, астроцитов, ММСК или PC12. Объем среды, содержащий количество вирусных частиц равное количеству трансфицируемых клеток, доводили соответствующей типу клеток питательной средой, инкубировали с клетками в течение 3 сут, после чего трижды отмывали средой. Через 24ч после смены среды проводили сокультивирование.

Гиперэкспрессию Miro1 индуцировали с помощью трансфекции ММСК лентивирусными частицами, кодирующими Miro1, в количестве 10⁶ TE/мл

(изготовлены в «Евроген» с помощью человеческой кДНК гена *RHOT1*, RC214409, OriGene Technologies, USA).

4.7. Оценка транспорта компонентов цитозоля

Для оценки транспорта цитоплазматического содержимого клетки окрашивались флуоресцентным зондом Calcein Red-Orange и Calcein Green AM. Живые клетки инкубировали с 2,5 мкМ Calcein в течение 40 минут при 37°C в среде DMEM/F-12, затем отмывали средой. Визуализацию Calcein проводили с помощью конфокальной микроскопии, для Calcein Green использовали возбуждающий лазер 488 нм и измеряли флуоресценцию в диапазоне 505-530 нм, флуоресценцию Calcein Red-Orange возбуждали HeNe лазером с полосой излучения 543 нм и измеряли флуоресценцию в диапазоне выше 560 нм.

4.8. Проточная цитофлуориметрия

Сравнительный анализ содержания красителя Calcein Green AM, в клетках на разных этапах сокультивирования проводили с помощью проточного цитометра CyFlow, Partec. Использовали возбуждающий лазер 488 нм и измеряли флуоресценцию в диапазоне выше 530 нм.

4.9. Микроскопическое исследование клеток

В данной работе использовалась методика микроскопического исследования живых клеток на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM510 (Carl Zeiss, Германия) с фирменным программным обеспечением. Изображение получали с помощью компьютера путем усреднения результатов четырех сканирований. Скорость сканирования, уровень усиления сигнала и разрешение получаемого изображения были одинаковы для всех экспериментов каждой серии. Толщина конфокальной плоскости составляла около 5 мкм (pinhole 150).

4.10. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток

Все этапы иммуноцитохимической окраски, а также анализ флуоресценции проводились на клетках, предварительно культивированных в

чашках с стеклянным дном (World Precision Instruments, USA). Клетки фиксировали 4% формалином на фосфатно-солевом буфере (ФСБ) 15 мин при 4°C и пермеабилизовали в растворе 0,5% Triton X-100/1% БСА на ФСБ. Затем отмывали 3 раза 0,5% БСА на ФСБ и инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C. Были использованы кроличьи поликлональные антитела к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF) (1:100) и нейротрофическому фактору мозга (BDNF) (1:50), козы поликлональные антитела к трансформирующему фактору роста- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (1:50), мышинные поликлональные антитела к β III-тубулину (1:50), антитела разводили на ФСБ с 1% БСА. По окончании инкубации с первичными антителами клетки трижды отмывали буфером ФСБ с 0,5% БСА в течение 5, 15 и 25 мин, инкубировали 1 ч со вторичными антителами (анти-кроличьи антитела, конъюгированные Cy-3 (Jackson ImmunoResearch, США); анти-мышинные антитела, конъюгированные с FITC (Jackson ImmunoResearch, США) при RT в недоступном для света месте. Для экспериментов по фенотипированию нейральной культуры ядра докрашивали интеркалирующим красителем ToPro-3, разведенным 1:500 на ФСБ, в течение 30 мин. Затем клетки отмывали в трех сменах ФСБ в течение 5, 15 и 25 мин и анализировали флуоресценцию с помощью конфокального микроскопа.

4.11. Оценка пролиферации клеток

Для анализа пролиферации клетки высевали на специальные 8-луночные планшеты E-Plate L8 и анализировали пролиферацию в системе iCELLigence (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA), у которой встроены микроэлектродные датчики в нижней части лунок. Анализ клеток в такой системе проходил при 37 ° C с 5 % CO₂ в течение 150 ч. Когда клетки пролиферируют в системе iCELLigence, меняется их адгезия к микроэлектродам, при этом изменяется электрический импеданс, который отражают биологический статус клеток. Поэтому система позволяет

контролировать зависящие от времени эффекты в культуре клеток. Состояние клетки выражалось как клеточный индекс (CI), и оценивалось удвоение клеток.

4.12. Оценка продукции лактата

По причине того, что функционирование митохондрий в ро-нулевых РС12 нарушено, в процессе анаэробного гликолиза в культуральную среду вырабатывается большое количество лактата. Мы измерили концентрацию лактата в культуральной среде на биохимическом анализаторе A25 BioSystems (Испания) с использованием фирменного набора Hospitecs Diagnostics. Принцип метода состоит в том, что лактат окисляется лактатоксидазой до пирувата и перекиси водорода, которая в присутствии пероксидазы реагирует с субстратом TOOS с образованием окрашенного соединения, интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации лактата в пробе. Концентрация лактата была нормализована на количество клеток.

4.13. Вестерн-блот анализ

Для анализа с помощью Вестерн-блота клетки диссоциировали раствором 0,05% трипсин-ЭДТА, полученную суспензию разводили в физиологическом растворе, центрифугировали 8 минут при 600g, разведение и центрифугирование повторяли дважды, осадок ресуспендировали в 100 мкл фосфатно-солевого буфера с добавлением 1 mM ингибитора протеаз PMSF. Полученную суспензию смешивали с 4-кратным буфером для образцов, содержащем 0.125 M Трис-HCl (pH 6.8), 4 % додецилсульфата натрия, 40 % глицерина, 0.05 % бромфенола синего и 10 % 2-меркаптоэтанола, кипятили в течение 5 мин, а затем замораживали. Полученные образцы анализировали с помощью вестерн-блотинга. Аликвоту суспензии клеток использовали для определения концентрации общего белка с помощью коммерческого набора на основе бицинхониновой кислоты (Sigma, США). Содержание белка в образце определяли по оптической плотности стандартных растворов БСА, измеренной при 541 нм. На каждую дорожку в геле наносили одинаковое количество общего белка.

Электрофорез белков проводили в псевдоградиентном (10, 15, 20 %) полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Лэммли. Образцы кипятили 5 мин и вносили в лунки геля. Для проведения электрофореза использовали трис-глициновый электродный буфер, содержащий 25 мМ Трис-HCl, 192 мМ глицина, 0.1 % додецилсульфата натрия, pH 8.3. Электрофорез проводили при постоянном токе 20 мА и максимальном напряжении 200 В. По окончании электрофореза переносили белки на мембрану PVDF (Amersham Pharmacia Biotech, Rainham, Великобритания) согласно стандартной методике. Перенос проводили полусухим методом в течение 45 мин при 300 мА, 25 В. Качество переноса оценивали визуально по переносу окрашенных маркеров. Блокировку мест неспецифического связывания на мембране проводили в течение 1 ч при 25 °C в PBS, содержащем 5 % обезжиренного сухого молока и 0.05 % Tween-20. Затем мембраны промывали PBS 3 раза по 10 мин и инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными антителами в PBS, содержащем 0.1 % бычьего сывороточного альбумина (фракция V, fatty acids free, Calbiochem, США) и 0.05 % Tween-20. Мембраны три раза по 5 мин промывали в PBS, содержащем 0.05% Tween-20 и инкубировали 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:10000 в PBS с Tween-20. После финальной отмывки от несвязавшихся антител, полосы детектировали с помощью хемилюминесцентного субстрата пероксидазы хрена ECL (Enhanced chemiluminescence system, Amersham Pharmacia Biotech, Великобритания), используя прибор ChemiDoc MP Imaging System, (Bio-Rad, США). Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageLab. Данные обсчетов представлены в виде средних значений и их стандартной ошибки.

4.14. Инъекция клеток в головной мозг

Операцию проводили под общим наркозом, который вызывали внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Крысу фиксировали в стереотаксисе, делали продольный разрез кожи. В левом

полушарии сверлили отверстие в области сенсомоторной коры. Клетки инъецировали в кору головного мозга в объеме 5 мкл физиологического раствора в количестве 10^4 . Скорость инъекции составила 1 мкл в течение 3-х минут.

4.15. Моделирование ишемии головного мозга

Ишемию головного мозга крысы вызывали введением покрытой силиконом нейлоновой нити через внутреннюю сонную артерию до перекрытия средней мозговой артерии [223]. Перекрытие кровотока сохранялось в течение 60 мин, после чего нить извлекали из сосуда, восстанавливая кровоснабжение в бассейне средней мозговой артерии. Во время и после операции поддерживалась постоянная температура тела животного ($37 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Ложнооперированных животных подвергали тем же процедурам, за исключением перерезания сосудов и введения нити. Объем инфаркта головного мозга определяли на 8 сут. Эта оценка проводилась морфометрическим анализом цифровых изображений, полученных методом магнитно-резонансной томографии (МРТ). Все МРТ-эксперименты были выполнены, как описано ранее [345], на приборе BioSpec 70/30 («Bruker», Германия) с индукцией магнитного поля 7 Т и градиентной системой 105 мТ/м.

Животных случайным образом делили на 3 группы: крысы с окклюзией среднемозговой артерии (группа «инсульт», $n=8$), крысы с окклюзией среднемозговой артерии, которым через 1 сутки внутривенно трансплантировали ММСК (ММСК, $n=9$), крысы, которым через 1 сутки внутривенно трансплантировали ММСК, предварительно сокультивированные с нейронами (ММСКсокульт, $n=9$). ММСК вводили через 24 ч после моделирования инсульта в количестве 3×10^6 клеток в левую яремную вену.

4.16. Тест постановки конечности на опору

Тест постановки конечности на опору проводили за 1 сут до начала операции и на первые сутки после индукции ишемии. Для оценки неврологических нарушений, вызванных перекрытием средней мозговой

артерии, использовали 14-балльную шкалу [82], в модификации [165]. Итоговый балл в ней формируется как сумма баллов в семи тестах, оценивающих ответ задних и передних конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию. Для оценки нарушений в работе конечностей использовали следующую систему подсчета: 2 балла – крыса полностью выполняла испытание, 1 балл – крыса выполняла испытание с задержкой > 2 с или неполностью, 0 баллов – крыса не отвечала на стимулирование конечности. Обращение с животными и экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с общепринятым международным руководством по заботе о животных.

4.17. Статистический анализ данных

Все эксперименты производились минимум в трех повторях. Статистический анализ проводили с использованием программы STATISTICA, версия 7.0 для Windows (StatSoft Inc., США). Результаты выражали как среднее $\pm$ стандартная ошибка измерения. Сравнение групп проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Критический уровень статистической значимости (*p*) принимали равным 0,05. Нормальность распределения признака в выборке оценивали с использованием *W*-критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения данных в поведенческих тестах использовали *U*-критерий Манна–Уитни (для независимых выборок).

Глава 5 РЕЗУЛЬТАТЫ

5.1. Характеристика культуры ММСК

Выделенные из моноклеарной фракции костного мозга ММСК имели характерную фибробластоподобную морфологию (**Рис. 2**), которая сохранялась в течение всего времени культивирования (5-6 пассажей).

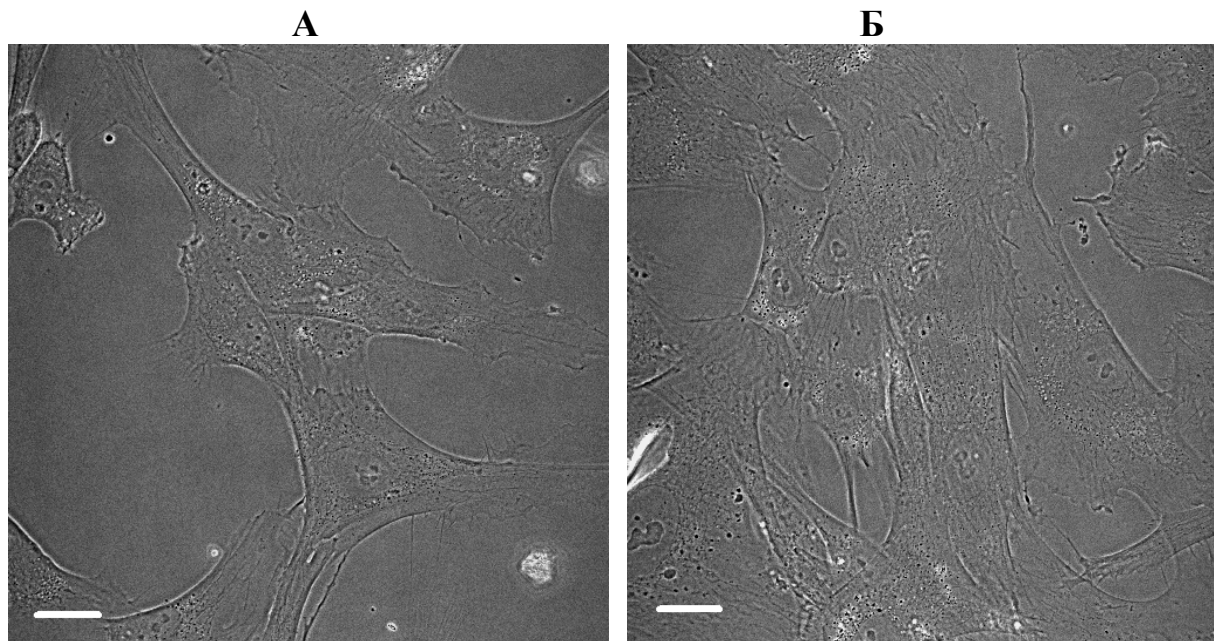


Рис.2. Культура клеток ММСК, полученная из костного мозга 10-дневных крысят, фазово-контрастная микроскопия. Масштабные отрезки равны 20 мкм. **А:** 48 ч после выделения, **Б:** 6 сут после выделения.

После 3-го пассажа был определен фенотип культуры клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. Клетки были позитивны по маркерам CD44, CD90, CD73, CD105 (>95% позитивных клеток) и негативны по маркерам гематопозитических стволовых клеток (CD34, CD45) и маркеру эндотелиальных клеток CD31(<2% позитивных клеток) (**Рис.3**).

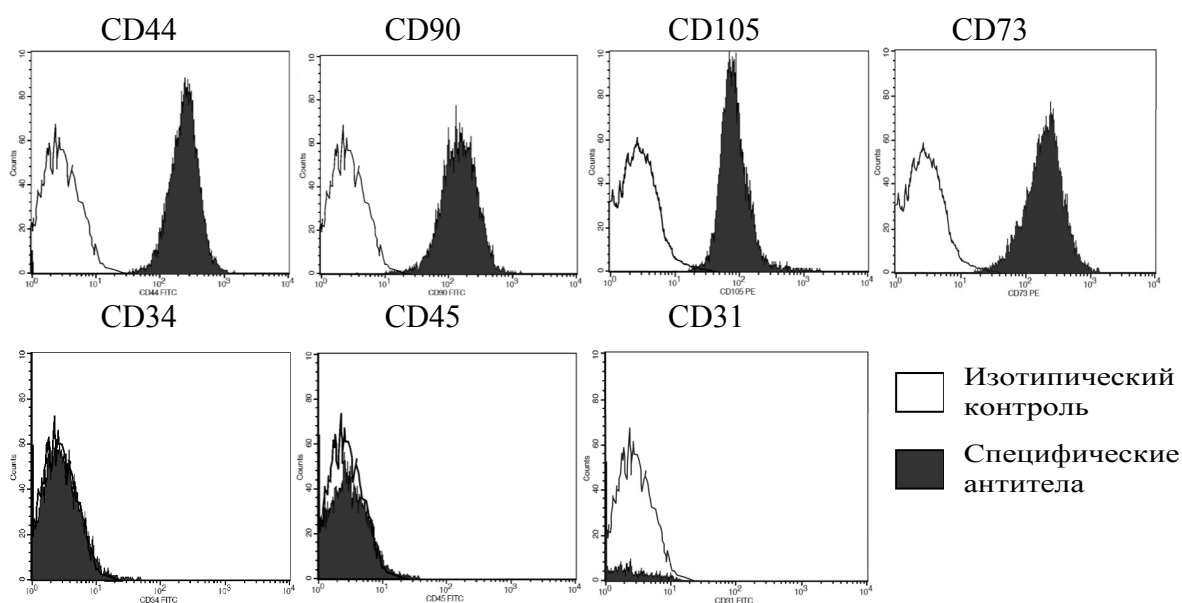


Рис.3. Фенотипирование культуры клеток костного мозга крыс после 3-го пассажа. Проточная цитофлуориметрия после иммуноцитохимической окраски клеток антителами к CD44, CD73, CD90, CD105, CD34, CD45, CD31.

Результаты фенотипирования представлены в таблице 4.

Таблица 4. Соотношение клеток, полученных из костного мозга, несущих различные маркеры после 3-го пассажа.

Название маркера	% клеток, несущих данный маркер
CD34	0
CD90	98,0
CD44	98,0
CD45	1
CD105	99,5
CD45/105	1
CD73	99,0
CD31	0

Кроме того, клетки были охарактеризованы по дифференцировочному потенциалу, для этого использовали классический подход индукции дифференцировки клеток культуры в остециты и адипоциты *in vitro* с

помощью коммерческих дифференцировочных сред. После 3 недель культивирования клеток в дифференцировочных средах GIBCO наблюдали появление признаков дифференцировки ММСК в соответствующие клетки. В случае среды для адипогенной дифференцировки примерно в 70 % клеток появлялись жировые капли, что подтверждалось при специфическом окрашивании фиксированных клеток Суданом III (**Рис.4Б**). В случае остеогенной дифференцировки после окрашивания ализариновым красным наблюдалось специфическое красно-оранжевое крашение клеток, что говорит о появлении солей кальция, то есть дифференцировки в клетки кости (**Рис.4Г**). Таким образом, и в случае адипогенной, и в случае остеогенной дифференцировки в культуре ММСК появлялись признаки адипоцитов и остеоцитов, соответственно.

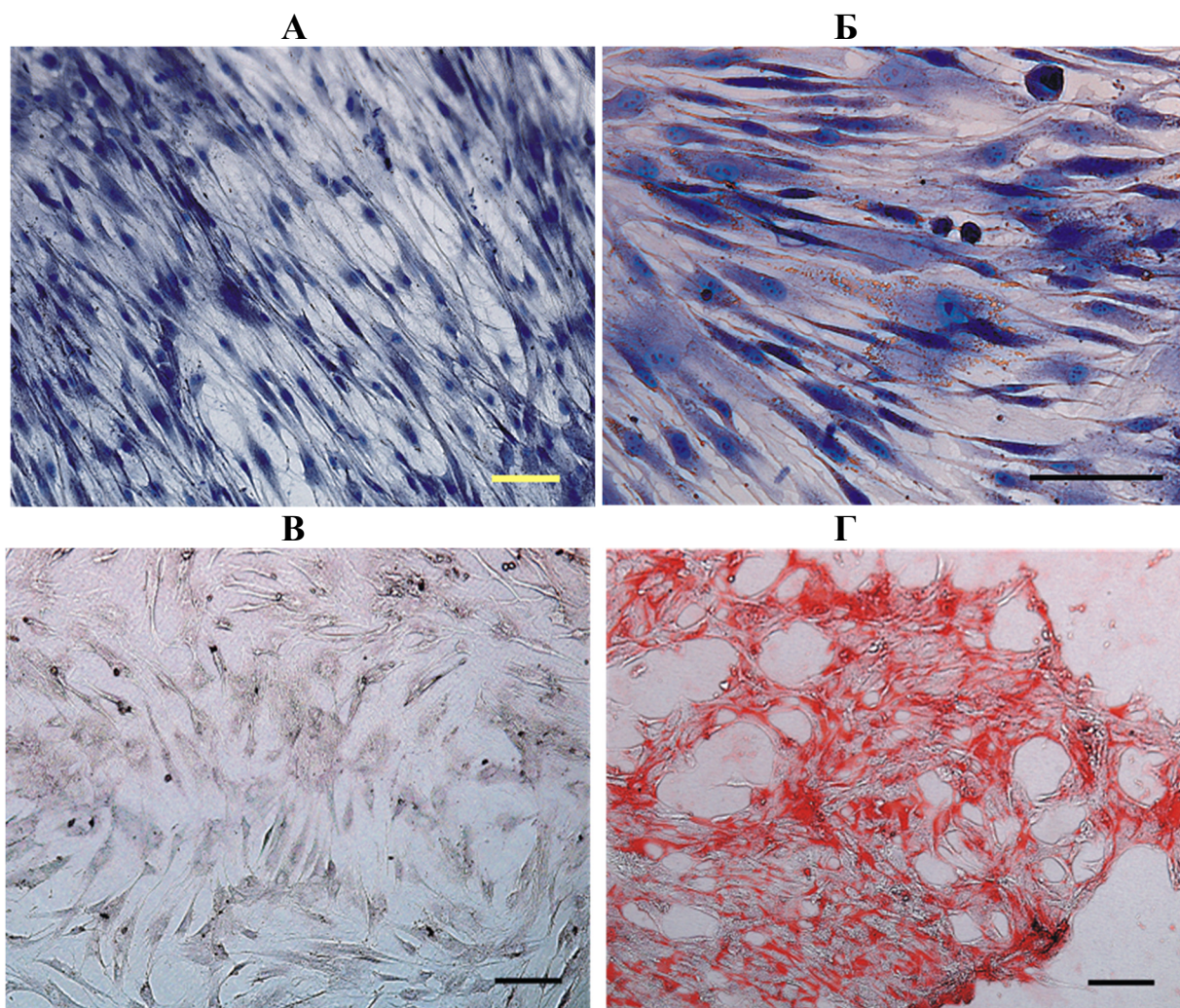


Рис.4. Дифференцировка клеток костного мозга крыс в адипоциты и остеоциты. **А, В:** клетки, полученные из костного мозга, не стимулированные к дифференцировке; **Б:** клетки костного мозга, стимулированные к дифференцировке в адипоциты; **Г:** клетки костного мозга, стимулированные к остеогенной дифференцировке. Окраска Суданом III, ядра докрашены гематоксилином (А, Б), окраска Ализариновым красным (В, Г). Наблюдаются типичные признаки дифференцировки: появление жировых капель (Б) и накопление солей кальция (Г). Масштабные отрезки равны 50 мкм.

Таким образом, мы доказали, что используя описанный выше метод получения клеток из костного мозга, мы получали клетки, которые по всем классическим признакам могут быть охарактеризованы как ММСК: (1) клетки обладают адгезией к пластику; (2) позитивны по поверхностным маркерам CD44, CD90, CD73 и CD105 и негативны по маркерам гематopoэтических стволовых клеток — CD34 и CD45; культура обладает потенциалом к адипогенной и остеогенной дифференцировке *in vitro*. Согласно положениям Международной Ассоциации

по клеточной терапии[95], используемые в данной работе клетки костного мозга соответствуют признакам ММСК.

5.2. Нейральная культура, получаемая из эмбрионального мозга крысы

Культуру клеток, полученную из головного мозга эмбрионов крыс охарактеризовали на 7 день *in vitro* с помощью иммуноцитохимической окраски специфическими антителами к нейронспецифическому β III-тубулину (маркеру нейронов) и глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) – маркеру астроцитов. После количественной обработки конфокальных изображений было выявлено, что данная культура является гетерогенной по клеточному составу: в культуре присутствуют нейроны (зеленая флуоресценция β III-тубулина, **Рис.5Б**) и астроциты (красная флуоресценция GFAP, **Рис.5В**). При этом нейроны составляют подавляющее большинство клеток культуры ($95\pm 3\%$), астроцитами представлено $4\pm 0,8\%$ клеток нейральной культуры.

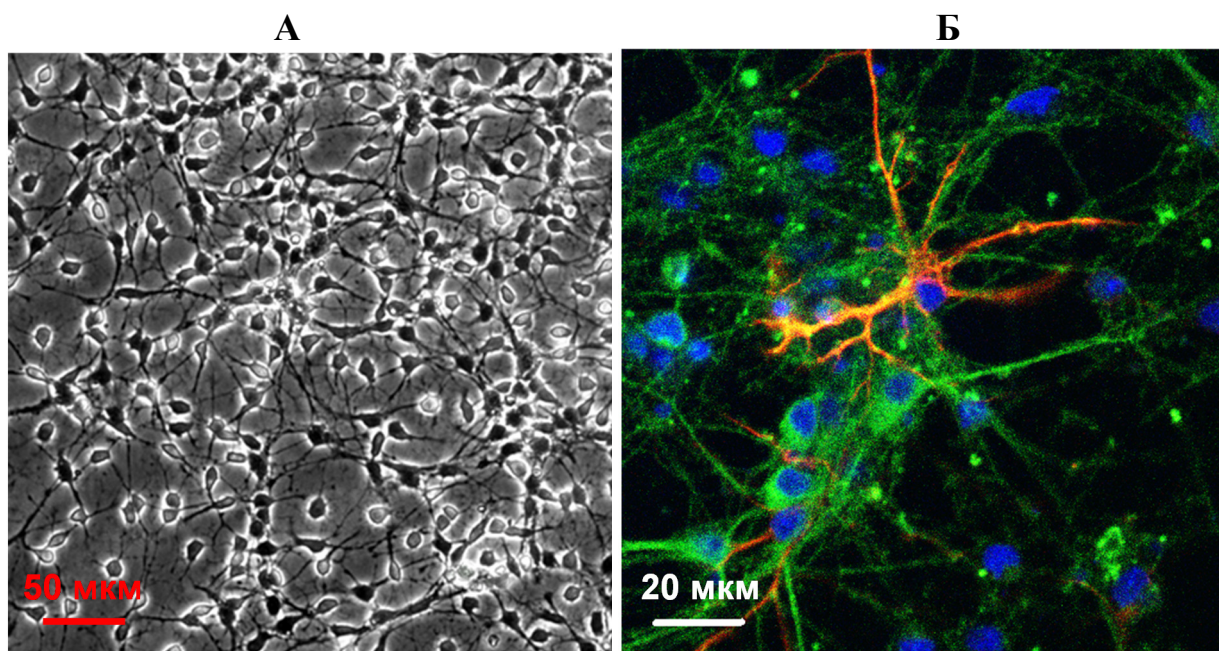


Рис.5. Фенотипирование культуры клеток, полученной из коры головного мозга крысы (А, Б). А: фазово-контрастное изображение нейральных клеток крысы на 7 день культивирования. Б: конфокальное изображение нейральной культуры на 7-й день культивирования *in vitro* после иммуноцитохимического окрашивания антителами, специфичными к β III-тубулину (зеленая флуоресценция) и GFAP (красная флуоресценция). Ядра окрашены ToPro-3 (синяя флуоресценция). Показано, что большая часть клеток культуры представлена нейронами (β III-тубулин-позитивные клетки), астроциты присутствуют в меньшем количестве (GFAP-позитивные клетки). Масштабные отрезки равны 50 мкм (А) и 20 мкм (Б).

5.3. Способность ММСК к дифференцировке в нейральные клетки

Поскольку дифференцировка ММСК в клетки поврежденной ткани может являться одним из механизмов терапевтического действия ММСК при различных патологиях [168], мы проверили возможность направленной дифференцировки ММСК в нейроны и астроциты после сокультивирования. И через 24 ч, и через 72 ч сокультивирования ММСК с нейральными клетками мы не обнаружили экспрессии нейрон-специфического β III- тубулина (**Рис.6А**) и GFAP, маркера астроцитов, в ММСК (**Рис.6В**), которые отличали по позитивной окраске на NuNu.

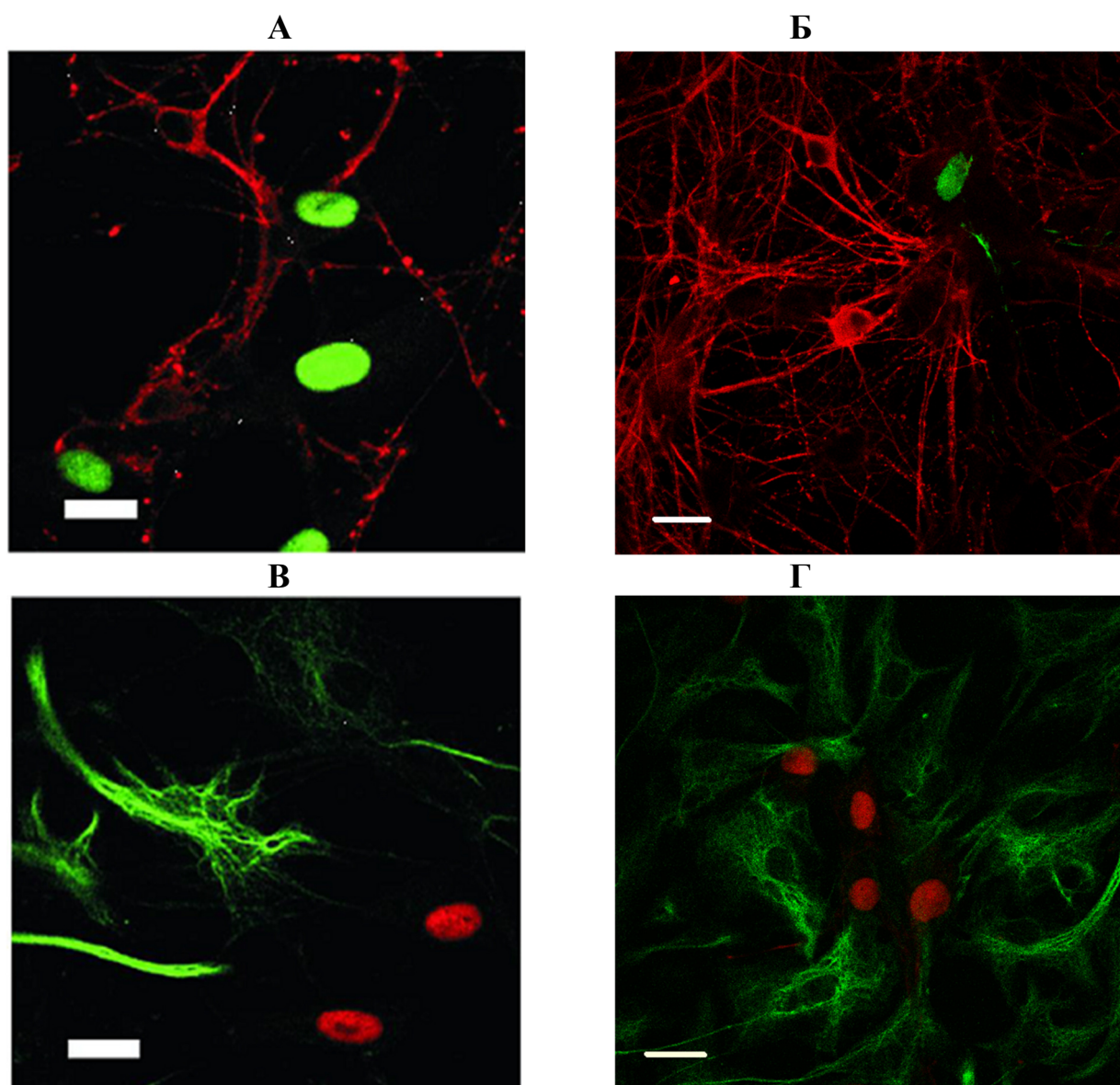


Рис.6. Отсутствие у ММСК признаков специфической дифференцировки в нейроны или астроциты после сокультивирования с нейронами, **А, Б:** после сокультивирования в течение 24ч и 72ч клетки окрашивались иммуноцитохимическим методом на β III-тубулин (красная флуоресценция) и белки человеческих ядер HuNu (зеленая флуоресценция). Красная флуоресценция ММСК не наблюдалась в ММСК, позитивных по маркеру HuNu; **В, Г:** клетки окрашивались на маркер астроцитов GFAP (зеленая флуоресценция) и белки человеческих ядер HuNu (красная флуоресценция). Зеленая флуоресценция ММСК не наблюдалась в HuNu-позитивных ММСК при сокультивировании в течение 24ч (В) и 72ч (Г). Конфокальная микроскопия. Масштабные отрезки равны 20 мкм.

Таким образом, на выбранных сроках сокультивирования в совместной культуре не происходит дифференцировки ММСК в нейрональные или астроглиальные клетки.

5.4. Продукция ростовых и нейротрофических факторов ММСК

Терапевтическое действие ММСК может быть связано также с продукцией ростовых и нейротрофических факторов. В связи с этим, мы проанализировали продукцию таких факторов как нейротрофический фактор мозга (BDNF), трансформирующий фактор роста- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF) в ММСК до и после сокультивирования. Было обнаружено, что в нативных ММСК продуцируются все три вышеперечисленные фактора (**Рис.7А, В, Д**), в ММСК через 24 ч сокультивирования уровень продукции этих факторов менялся по-разному. Так, через 24 ч сокультивирования продукция TGF- $\beta 1$ и VEGF практически не изменялась (**Рис.7Б, Г**), тогда как количество BDNF в клетке слегка возрастало (**Рис.7Ж**). При этом менялось его внутриклеточная локализация: равномерное распределение BDNF в нативных ММСК (**Рис.7Д**) сменялось на локализованное у плазматической мембраны после сокультивирования ММСК с нейронами (**Рис.7Е**). Возможно, продукция BDNF и его паракринное действие в мозге наряду с другими механизмами может вносить вклад в реализацию терапевтических эффектов ММСК.

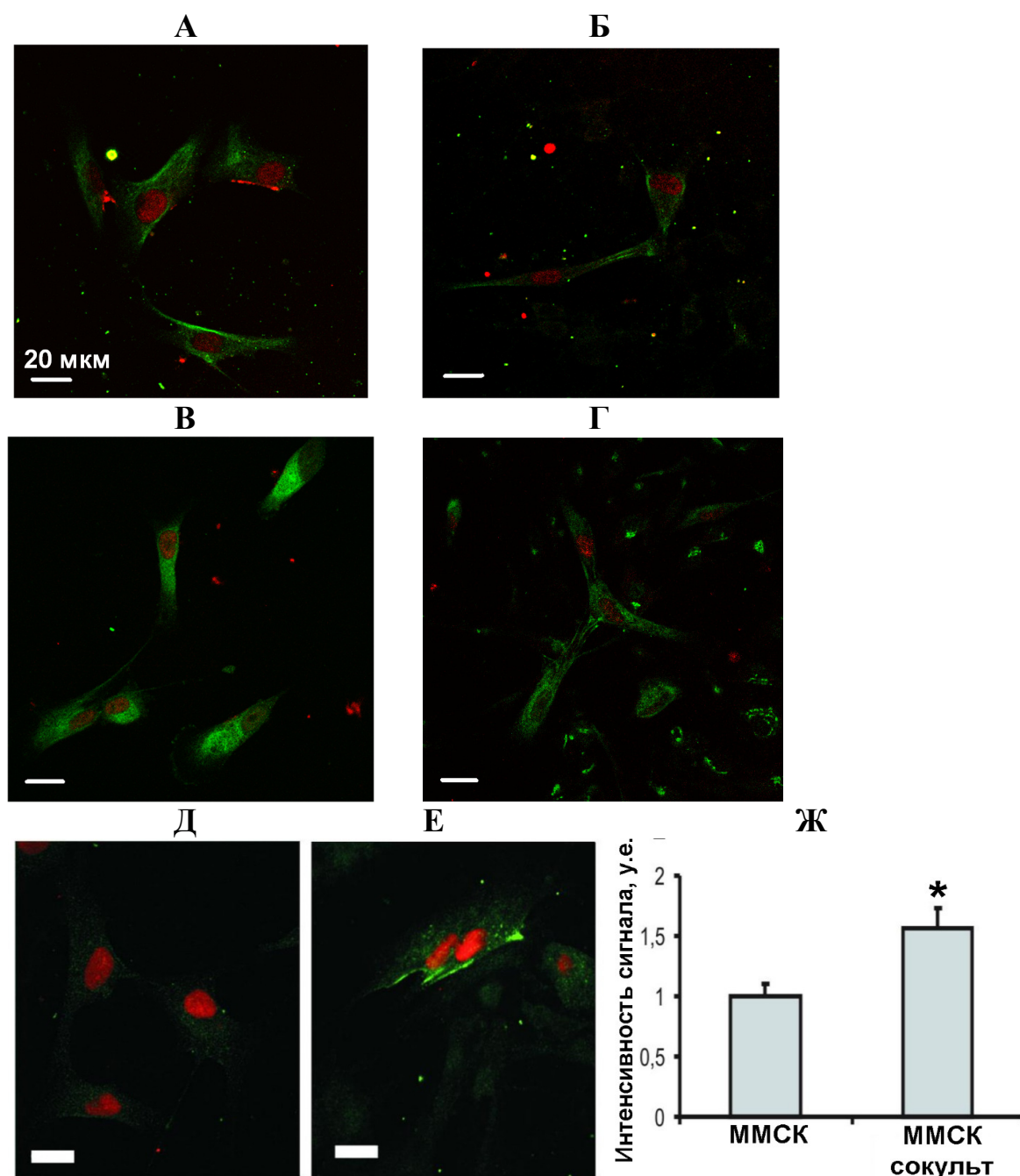


Рис.7. Изменение продукции ростовых и нейротрофических факторов в нативных ММСК и ММСК после сокультивирования с нейронами в течение 24ч. Иммуноцитохимическое окрашивание нативных ММСК (А, В, Д) и ММСК, выделенных из совместной культуры с нейронами (Б, Г, Е) на такие факторы как TGF- β 1 (А, Б), VEGF (В, Г) и BDNF (Д, Е). А-Г: через 24ч сокультивирования продукция TGF- β 1 и VEGF в ММСК практически не изменялась; Д-Ж: показано равномерное распределение BDNF в цитоплазме нативных ММСК (Д) и локализация у плазматической мембраны в ММСК после сокультивирования с нейральными клетками (Е), а также увеличение относительного содержания BDNF в клетке, оцененное по интенсивности его флуоресценции в клетке (Ж). Масштабные отрезки равны 20 мкм.

5.5. Межклеточный транспорт компонентов цитозоля

В работе использовалась модель совместного культивирования двух различных типов клеток с целью смоделировать поведение стволовых клеток в ткани после трансплантации. Для сокультивирования использовались ММСК крысы, полученные из костного мозга (пассаж 3) и первичная культура нейральных клеток крысы (срок культивирования *in vitro* 4 дня). Возможность межклеточного транспорта компонентов цитозоля между клетками в совместной культуре была исследована с применением флуоресцентных зондов Calcein Green AM и Calcein Red-Orange AM. Кальцеин является низкомолекулярным флуоресцентным красителем, который свободно проникает через липидные мембраны, накапливается в цитоплазме и органеллах клетки, а затем после отщепления ацетоксиметильной группы теряет способность проходить через мембраны. Таким образом, по флуоресценции можно следить за транспортом несущих кальцеин компонентов цитозоля: Calcein-Green AM испускает флуоресценцию в зеленой области спектра, а Calcein Red-Orange AM – в красной. Транспорт компонентов цитозоля между ММСК и нейральными клетками в совместной культуре был проанализирован с помощью проточной цитофлуориметрии. Было проведено две серии экспериментов, в каждой из которых Calcein Green AM нагружали либо ММСК, либо нейральные клетки перед сокультивированием. В обеих сериях анализ на проточном цитофлуориметре проводили через 25 мин и через 24ч сокультивирования. В одной серии экспериментов к неокрашенным нейральным клеткам подсаживали окрашенные ММСК. При анализе и через 25 мин, и через 24ч наблюдалось деление клеток на 2 субпопуляции (**Рис.8А, Б**). Пик в области низкой интенсивности флуоресценции формировали ненагруженные зондом клетки, что было определено предварительной калибровкой контрольных (ненагруженных) клеток. Другая субпопуляция, обладающая высокой интенсивностью флуоресценции, соответствовала клеткам, нагруженным Calcein. Через 24ч появлялось больше клеток с промежуточной интенсивностью флуоресценции, такие клетки попадали в

область между популяцией нагруженных Calcein MMCK и нейронами (**Рис.8Б**). В другой серии экспериментов нейральные клетки нагружали Calcein Green AM, и к ним пересевали неокрашенные MMCK. При анализе через 25 мин сокультивирования смешанная культура клеток состояла из 2 субпопуляций клеток по интенсивности флуоресценции Calcein (**Рис.8В**), при этом через 24ч вместо 2 субпопуляций клеток наблюдалось равномерное распределение с одним пиком (**Рис.8Г**). По сравнению с распределением клеток через 25 мин сокультивирования уменьшалось количество клеток с высокой интенсивностью флуоресценции зонда.

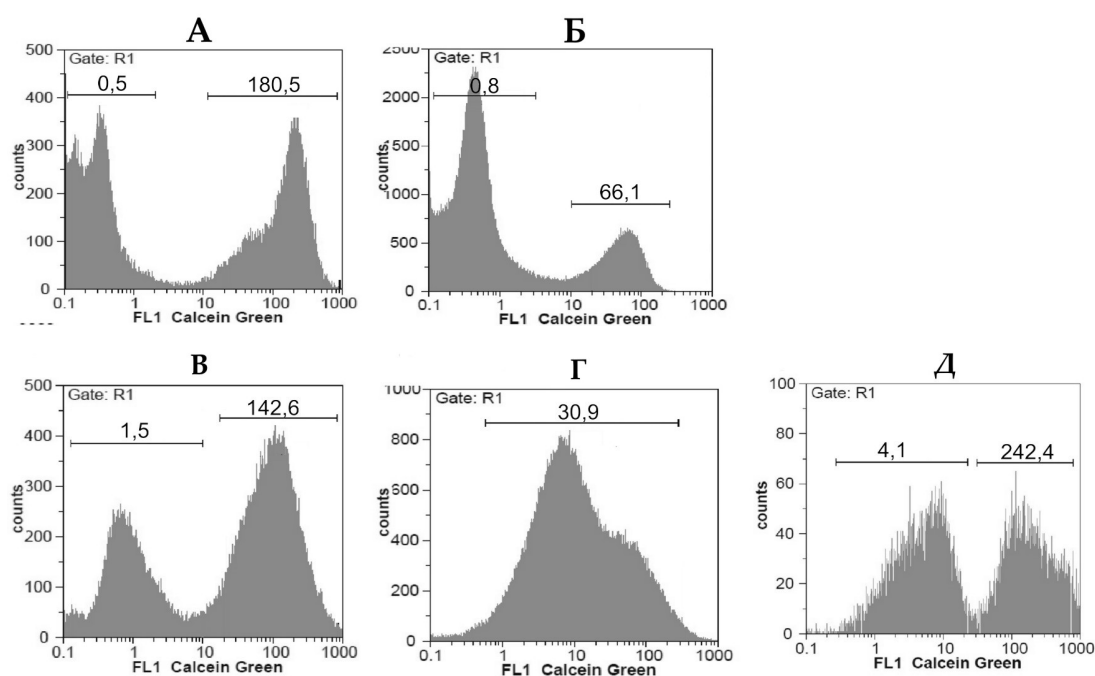


Рис.8. Передача нагруженного Calcein Green AM цитозоля между нейральными клетками и MMCK, исследованная по изменению соотношения окрашенной и неокрашенной популяций клеток в совместной культуре. Цитофлуориметрия. **А, Б:** Calcein Green нагружена культура MMCK; **В–Д:** Calcein Green нагружена нейральная культура. Показано деление клеток на 2 субпопуляции через 25 мин сокультивирования (**А, В**), заметное сближение пиков или даже их слияние через 24 часа совместного культивирования (**Б, Г**); также отсутствие объединения популяций в условиях культивирования на раздельных стёклах через 24 часа (**Д**).

Результаты статистической обработки полученных гистограмм, выполненной с помощью стандартного программного обеспечения цитофлуориметра, приведены в таблице 5.

Таблица 5. Изменение интенсивности флуоресценции Calcein Green в различных популяциях клеток при сокультивировании ММСК и нейральных клеток

	Среднее значение интенсивности флуоресценции (бимодальное распределение), 25 мин		Среднее значение интенсивности флуоресценции, 24 часа	Среднее значение интенсивности флуоресценции, 24 часа, отдельные стекла	
	Популяция неокраш. клеток	Популяция окраш. клеток			
Смешан. культура, окрашены ММСК	0.52	180.50	Бимодальное распределение	Не изучалось	
			Популяция неокраш. клеток		
			0.75		
Смешан. культура, окрашены нейральные клетки	1.49	142.60	Унимодальное распределение	Бимодальное распределение	
			30.92	Популяция неокраш. клеток	Популяция окраш. клеток
				4.13	242.41

По значениям, представленным в таблице 5, видно, что интенсивность флуоресценции окрашенных ММСК через 24 ч сокультивирования упала с 180.5 до 66.02, в то же время интенсивность флуоресценции неокрашенных нейронов возросла с 0.52 до 0.75. Таким образом можно заключить, что часть нагруженного Calcein цитоплазматического содержимого была передана из

ММСК в неокрашенные нейральные клетки. Во второй серии экспериментов, где были окрашены нейральные клетки и сокультивированы с неокрашенными ММСК, бимодальное распределение клеток, наблюдавшееся через 25 мин, исчезало через 24 ч, вместо 2 субпопуляций клеток наблюдалась одна с медианой пика 30,92. Из этого следует, что при совместном культивировании нагруженных нейральных клеток и неокрашенных ММСК так же происходит передача компонентов цитозоля. При контрольном сокультивировании ММСК и нейральных клеток в условиях, препятствующих прямому контактированию (нейроны и ММСК находились на отдельных покровных стеклах, которые помещались в чашку Петри со средой культивирования) наблюдалось бимодальное распределение клеток по интенсивности флуоресценции даже через 24 ч сокультивирования. Эти наблюдения сводят к минимуму возможность транспорта нагруженных Calcein компонентов цитозоля без образования межклеточных контактов, хотя в принципе передача через среду культивирования посредством внеклеточных везикул тоже возможна. Однако эффективность такого способа передачи цитозоля, если он и присутствует, намного меньше, чем передача через прямые межклеточные контакты. Мы можем заключить, что в совместных культурах нейральных клеток и ММСК наблюдается передача компонентов цитозоля, опосредованная прямым контактированием клеток. Этот процесс более интенсивно происходит в направлении из нейральных клеток в ММСК.

Проводились аналогичные эксперименты по сокультивированию астроцитов с ММСК. В первой серии ММСК загружали Calcein Green и сокультивировали с астроцитами в течение 25 мин и 24 ч. Через 25 мин наблюдалось 2 отдельных пика, соответствующих окрашенным ММСК и неокрашенным астроцитам (**Рис.9А**). Через 24ч пики сближались, но не сливались (**Рис.9Б**). Это говорит о том, что в совместной культуре так же происходит транспорт нагруженного Calcein цитозоля из ММСК в астроциты, но эффективность его низкая, как и в случае передачи цитозоля из ММСК в нейроны.

В другой серии экспериментов астроциты загружали Calcein Green и подсеивали к неокрашенным ММСК. Анализ на проточном цитофлуориметре так же проводился через 25 мин и 24 ч от начала сокультивирования. Картина распределения клеток по интенсивности флуоресценции была схожей с предыдущей серией экспериментов, где сокультивировали окрашенные ММСК с неокрашенными астроцитами: через 25 мин наблюдалось 2 пика (**Рис.9В**), а через 24ч эти пики сближались, но не сливались (**Рис.9Г**). Таким образом при сокультивировании ММСК и астроцитов в обоих вариантах окрашивания клеток Calcein Green происходит низкоэффективный транспорт митохондрий в обоих направлениях. Эти данные отличаются от результатов экспериментов с окрашиванием нейронов, где пики полностью сливались, указывая на более высокую эффективность транспорта нагруженных Calcein компонентов цитозоля из нейронов в ММСК.

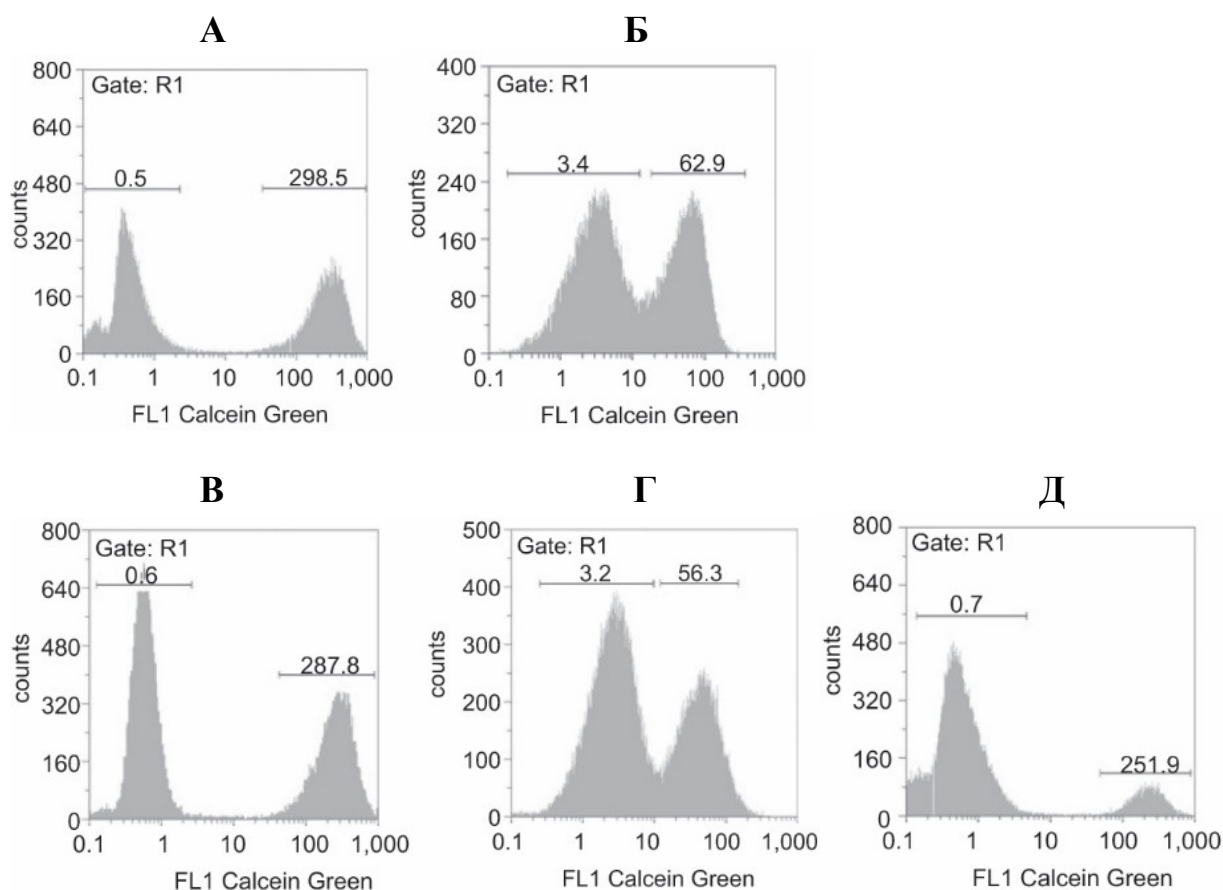


Рис.9. Передача нагруженного Calcein Green AM цитозоля между астроцитами и ММСК, исследованная по изменению соотношения окрашенной и неокрашенной популяций клеток в совместной культуре. Цитофлуориметрия. **А, Б:** ММСК нагружали Calcein Green и сокультивировали с астроцитами; **В –Д:** астроциты нагружали Calcein Green и сокультивировали с ММСК в условиях прямого контактирования (В, Г) или разделения клеток полупроницаемой мембраной (Д). Проточная цитофлуориметрия проводилась через 25 мин (А, В) и 24ч (Б, Г, Д) сокультивирования.

Сравнивая данные бесконтактного транспорта красителя из нейронов в ММСК и из астроцитов в ММСК (**Рис.9Д**) можно заключить, что в случае нейронов возможна передача некоторого количества зонда посредством внеклеточных везикул, в противовес этому в случае астроцитов такой способ транспорта практически исключен.

Транспорт компонентов цитозоля также был проанализирован на конфокальном микроскопе через 24 часа сокультивирования. Для этого культуру ММСК диссоциировали с помощью трипсина-ЭДТА, нагружали Calcein Red-Orange и пересаживали к нейральным клеткам, предварительно

окрашенным Calcein Green, и сокультивировали. Клетки были проанализированы через 1,5 и 24 часа сокультивирования. Было обнаружено, что через 1,5 часа сокультивирования окрашенных ММСК с окрашенными нейронами, наблюдались клетки, несущие либо красную флуоресценцию, либо зеленую (**Рис.10А**). Через 24 часа сокультивирования наблюдались клетки, в которых присутствовали оба флуоресцентных зонда (указаны стрелками на **Рис.10**). Основываясь на морфологии клеток (**Рис.10В**) мы сделали вывод, что клетками, несущими оба красителя, являются ММСК, а нейроны оставались нагруженными одним флуоресцентным зондом. Стоит отметить, что мы наблюдали различное распределение Calcein в клетках. Чаще всего Calcein распределялся диффузно в цитозоле клетки (**Рис.10Г, Д**), но наблюдалось и компартментализованное распределение (**Рис.10А, Б**), в том числе и в ядре (**Рис.11Б, В**). Известно, что это может зависеть от свойств клеток и условий инкубации с Calcein AM [105].

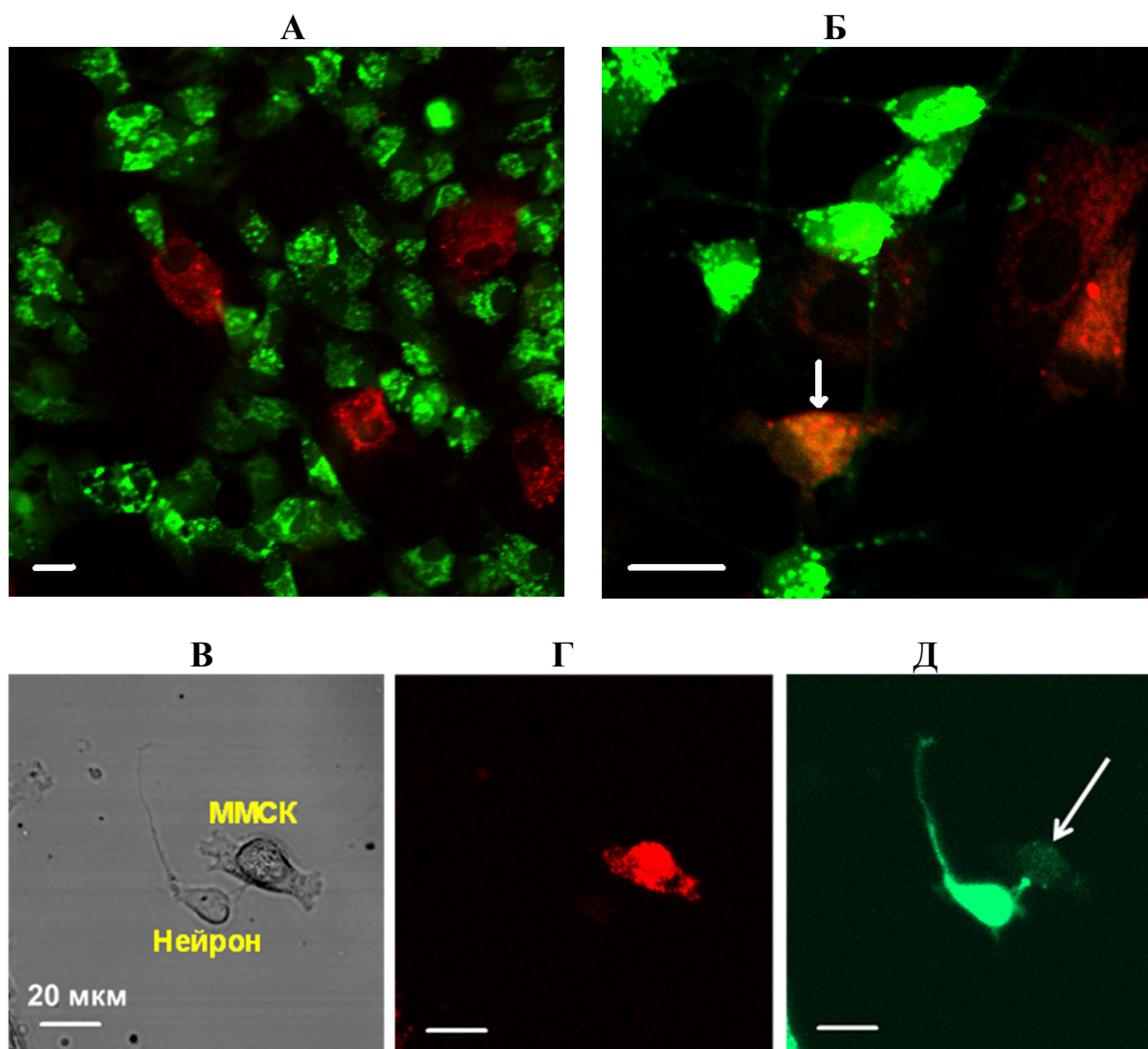


Рис.10. Передача компонентов цитозоля из нейральных клеток в ММСК через 1,5 часа после пересева ММСК к нейральным клеткам (А); и через 24 часа сокультивирования (Б, В, Г, Д); перед сокультивированием ММСК нагружены флуоресцентным зондом Calcein Red-Orange AM; нейральные клетки окрашены флуоресцентным красителем Calcein Green AM. Через 24 часа зеленая флуоресценция Calcein наблюдается не только в нейральных клетках, но и в контактирующих с ними ММСК (стрелки). Представлены флуоресцентные (А, Б, Г, Д) и фазово-контрастные изображения (В). Масштабные отрезки равны 20 мкм.

Данные о предпочтительном транспорте компонентов цитозоля из нейронов в ММСК были подтверждены сокультивированием ММСК человека с крысиными нейронами и последующим иммуноцитохимическим окрашиванием. Нейроны нагружали Calcein Green и сокультивировали с неокрашенными ММСК в течение 24 ч, затем проводилось

иммуноцитохимическое окрашивание к маркеру человеческих ядер Human Nuclei, чтобы человеческие ММСК и отличать их от крысиных клеток. В клетках, позитивных по Human Nuclei, визуализировалась флуоресценция Calcein Green, свидетельствующая о том, что ММСК получили несущий Calcein цитозоль из нейральных клеток (**Рис.11А**)

В другой группе экспериментов ММСК, нагруженные Calcein Green, подсекали к неокрашенным нейронам. Окрашивание на специфические нейральные маркеры (GFAP для астроцитов и β III-тубулин для нейронов) выявило, что флуоресценция Calcein наблюдалась только в ММСК даже через 24 ч сокультивирования (**Рис.11Б**). Нейроны, позитивно окрашивающиеся на нейронспецифический тубулин (красная флуоресценция), не содержали в себе Calcein Green (зеленая флуоресценция). Астроциты, которые присутствуют в нейральной культуре в малом количестве, были позитивны по GFAP и, так же как нейроны, не содержали в себе Calcein Green (**Рис.11В**)

Выводы о транспорте компонентов цитозоля основываются не только на наблюдениях, полученных с использованием Calcein, имеющего относительно низкую молекулярную массу (около 800 Да). Мы провели дополнительные эксперименты, где нейральные клетки трансфицировали лентивирусной конструкцией, несущей GFP, и сокультивировали с ММСК. Нейроны, экспрессирующие GFP, эффективно транспортировали его в ММСК (**Рис.11Г**). Таким образом нами был подтвержден однонаправленный транспорт (из нейронов в ММСК) не только низкомолекулярных компонентов цитозоля, но и белков.

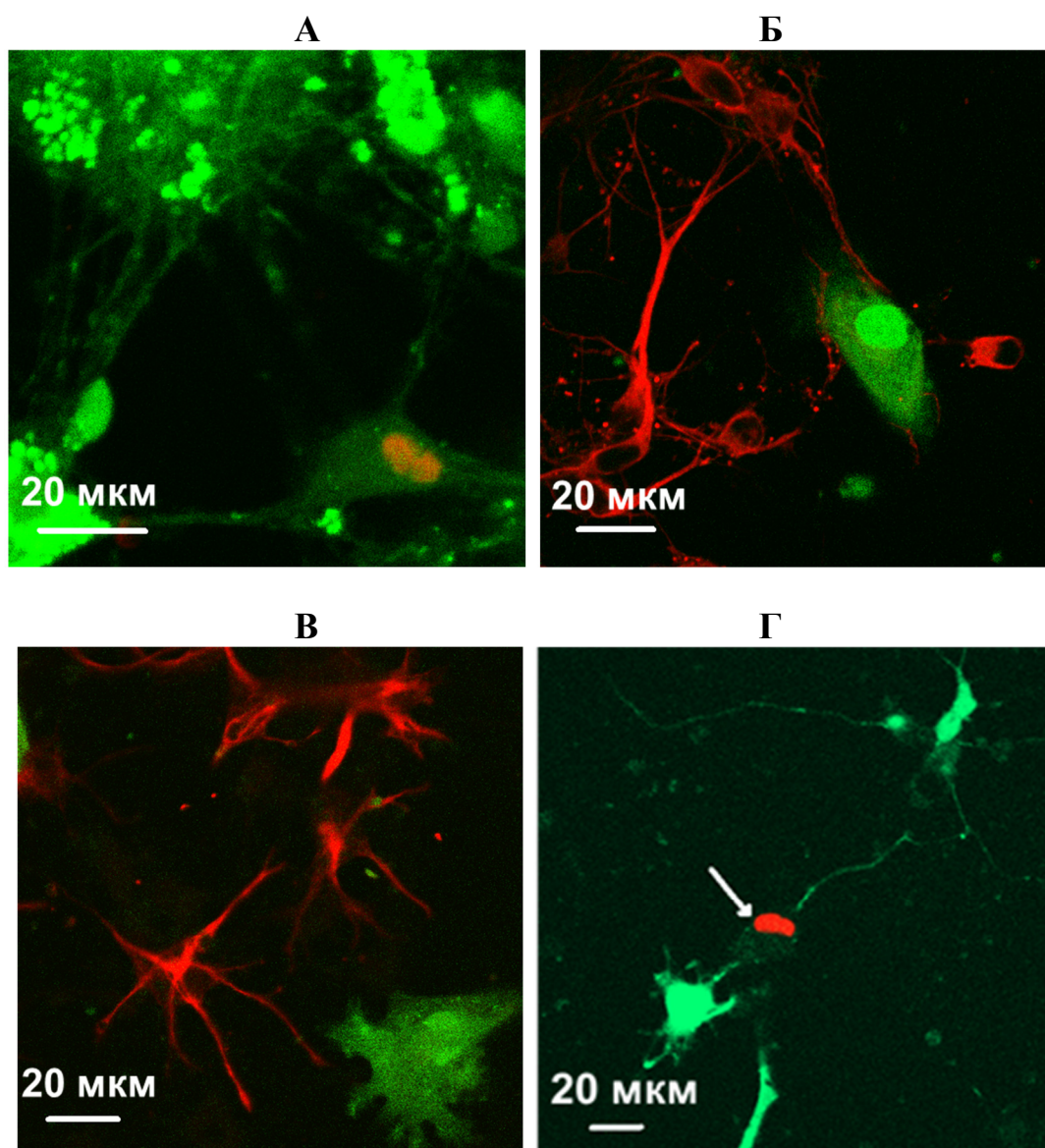


Рис.11. Однонаправленный транспорт компонентов цитозоля из нейронов в мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки (ММСК) при сокультивировании в течение 24 часов. **А:** передача Calcein Green из нейронов в ММСК, наблюдаемая через 24ч сокультивирования. В нейронах наблюдалась яркая зеленая флуоресценция, слабая зеленая флуоресценция наблюдалась в ММСК, позитивных по маркеру HuNu (красная флуоресценция); **Б:** Нейроны, позитивные по β III тубулину (красная флуоресценция), не получили Calcein Green из ММСК, нагруженных этим же красителем (зеленая флуоресценция); **В:** астроциты, позитивные по глиальному фибриллярному кислому белку (красная флуоресценция) не получили Calcein Green из нагруженных им же ММСК; **Г:** передача зеленого флуоресцентного белка (GFP) из клеток нейральной культуры в ММСК. Яркая зеленая флуоресценция GFP, наблюдается в нейронах, а слабую флуоресценцию имеют ММСК, позитивно окрашивающиеся антителами против HuNu (красная флуоресценция). Масштабные отрезки равны 20 мкм.

5.6. Межклеточная передача митохондрий

После сокультивирования также наблюдался транспорт митохондрий из ММСК в нейроны. Для наблюдения за митохондриями мы трансфицировали ММСК лентивирусными конструкциями, кодирующими красный флуоресцентный белок, слитый с сигналом транспорта в митохондрии (mitoDsRed), а нейроны-аналогичным зеленым флуоресцентным белком (mitoGFP), а затем провели сокультивирование. Через 2 сут мы наблюдали митохондрии с красной флуоресценцией в нейронах, собственные митохондрии которых имели зеленую флуоресценцию (**Рис.12 А**). В то же время в ММСК не обнаруживались митохондрии, обладающие зеленой флуоресценцией, после сокультивирования. Аналогичные эксперименты по сокультивированию были проведены и с астроцитами в качестве партнера для ММСК. В этом случае через 24 ч так же наблюдались митохондрии ММСК в астроцитах, однако свидетельств передачи митохондрий в обратном направлении не обнаружено (**Рис.12 Б**).

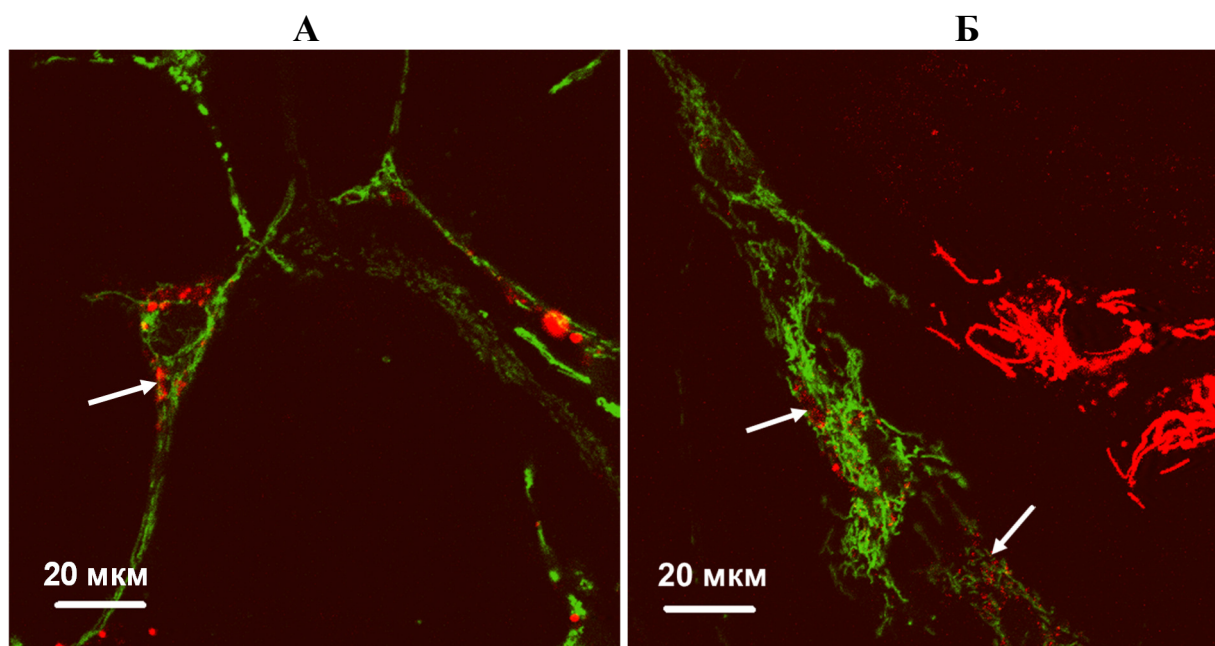


Рис.12. Транспорт митохондрий из ММСК в нейроны и астроциты. ММСК трансфицировали конструкцией, кодирующей красный флуоресцентный белок, слитый с сигналом митохондриальной локализации в субъединице VIII цитохром с оксидазы (mitoDsRed, красная флуоресценция), нейральную культуру и астроциты трансфицировали лентивирусной конструкцией, кодирующей зеленый флуоресцентный белок, слитый с сигналом митохондриальной локализации (mitoGFP, зеленая флуоресценция). Сокультивирование mitoDsRed-ММСК с mitoGFP-нейронами проводилось в течение 48ч, а mitoDsRed-ММСК с mitoGFP-астроцитами — в течение 24 ч. Показаны митохондрии с красной флуоресценцией в нейронах (А, стрелка) и астроцитах (Б, стрелки). Конфокальная микроскопия, масштабные отрезки равны 20 мкм.

Для подтверждения межклеточного транспорта митохондрий проводили сканирование по линии вдоль z-оси астроцита, имеющего помимо своих зеленых митохондрий митохондрии с красной флуоресценцией. (**Рис.13**). Такое сканирование подтвердило, что митохондрии с красной флуоресценцией действительно находятся внутри астроцита, а не являются наложением изображений астроцита и вышележащей клетки ММСК.

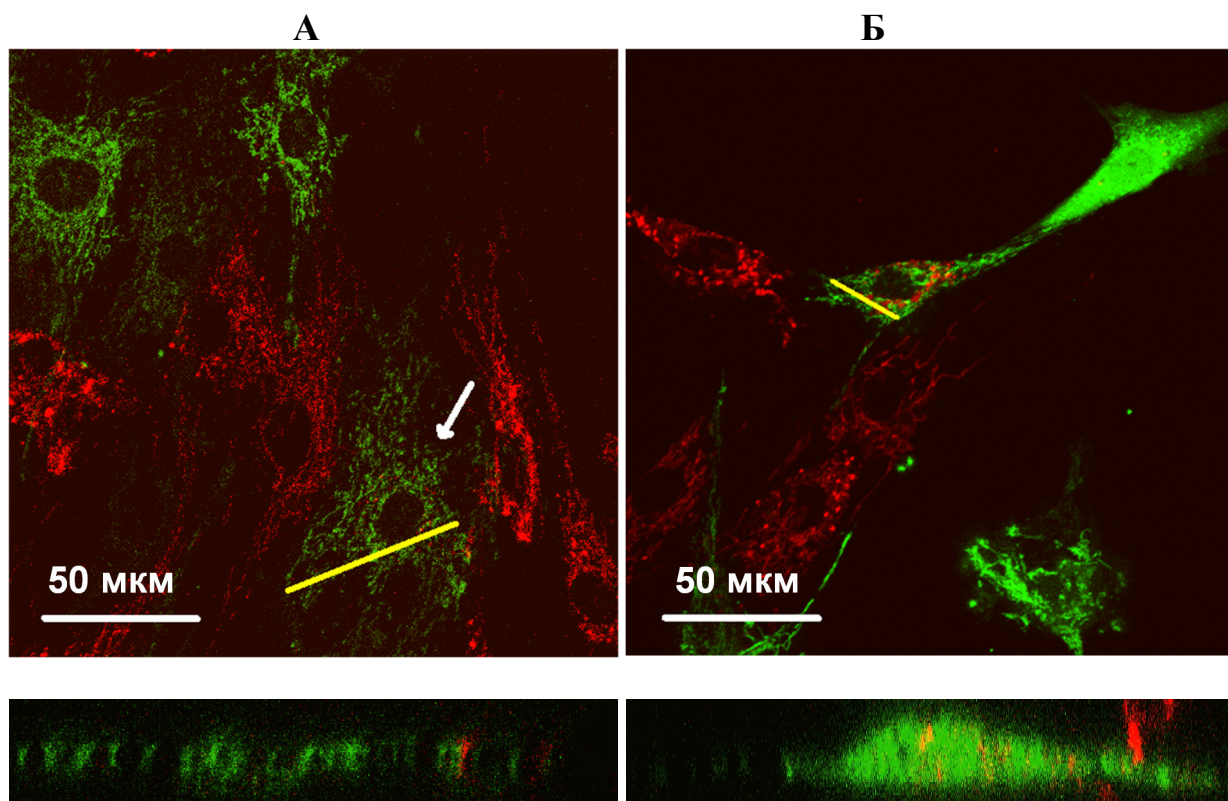


Рис.13. Транспорт митохондрий из ММСК в астроциты. ММСК трансфицировали конструкцией, кодирующей mitoDsRed (красная флуоресценция), астроциты трансфицировали лентивирусной конструкцией, кодирующей mitoGFP (зеленая флуоресценция). Показаны астроциты, получившие митохондрии из ММСК (верхние изображения на А и Б), на нижних изображениях, полученных в результате сканирования вдоль желтой линии по *Z*-оси, видно, что и собственные митохондрии астроцита (зеленые), и митохондрии ММСК (красные) находятся на одном уровне, т.е. находятся в астроците. Конфокальная микроскопия, масштабные отрезки равны 50 мкм.

Кроме того, было оценено количество важного внутриклеточного фактора, ассоциированного с транспортом митохондрий, митохондриальной Rho-ГТФазы Miro1. Известно, что этот белок ответственен и за внутриклеточный, и за межклеточный транспорт митохондрий [94]. Miro1 экспрессируется в нативных ММСК, но его количество возрастает вдвое после сокультивирования ММСК с нейральными клетками (Рис.14А).

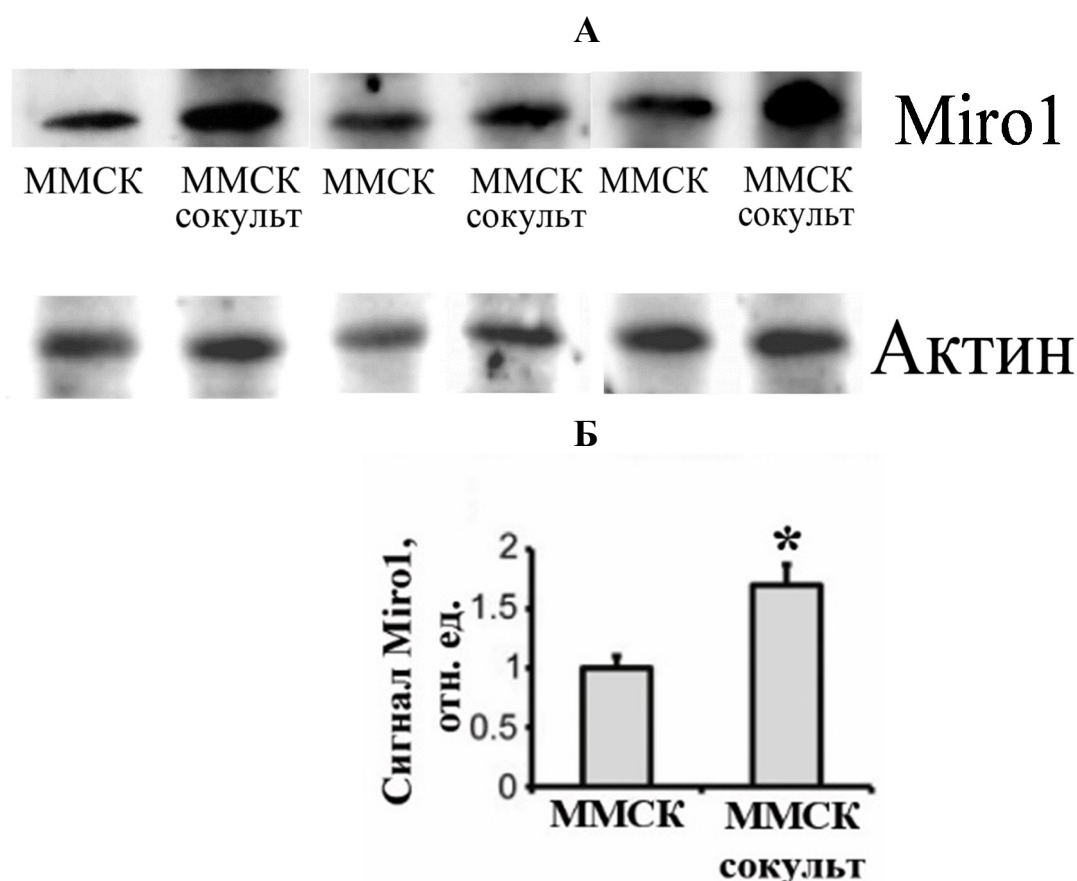


Рис.14. Оценка уровня Miro1 в нативных MMCK и MMCK, предварительно сокультивированных с нейронами. **А:** увеличение количества белка Miro1 в MMCK, участвующего в транспорте митохондрий, после сокультивирования их с нейронами в течение 24 ч, результаты вестерн-блоттинга; **Б:** на диаграмме отображены средние значения плотности пятен, полученные в результате вестерн-блоттинга 3-х различных культур MMCK и MMCK, выделенных после сокультивирования с нейронами. Аббревиатуры: MMCK-мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, MMCKсокульт - MMCK, предварительно сокультивированные с нейронами в течение 24 ч.

Эти данные говорят о том, что помимо того, что при сокультивировании *in vitro* происходит транспорт митохондрий из MMCK в нейральные клетки, системы, ответственные за такой транспорт, начинают активнее экспрессироваться именно при сокультивировании. Для оценки возможности передачи митохондрий *in vivo* мы провели инъекцию MMCK, экспрессирующих mitoGFP, в мозг крысы. В срезах области крысиного мозга, в которую вводили клетки, мы наблюдали GFP-позитивные компартменты в телах нейронов (позитивны по

β III-тубулину), прилегающих к ММСК (Рис.15А, Б).

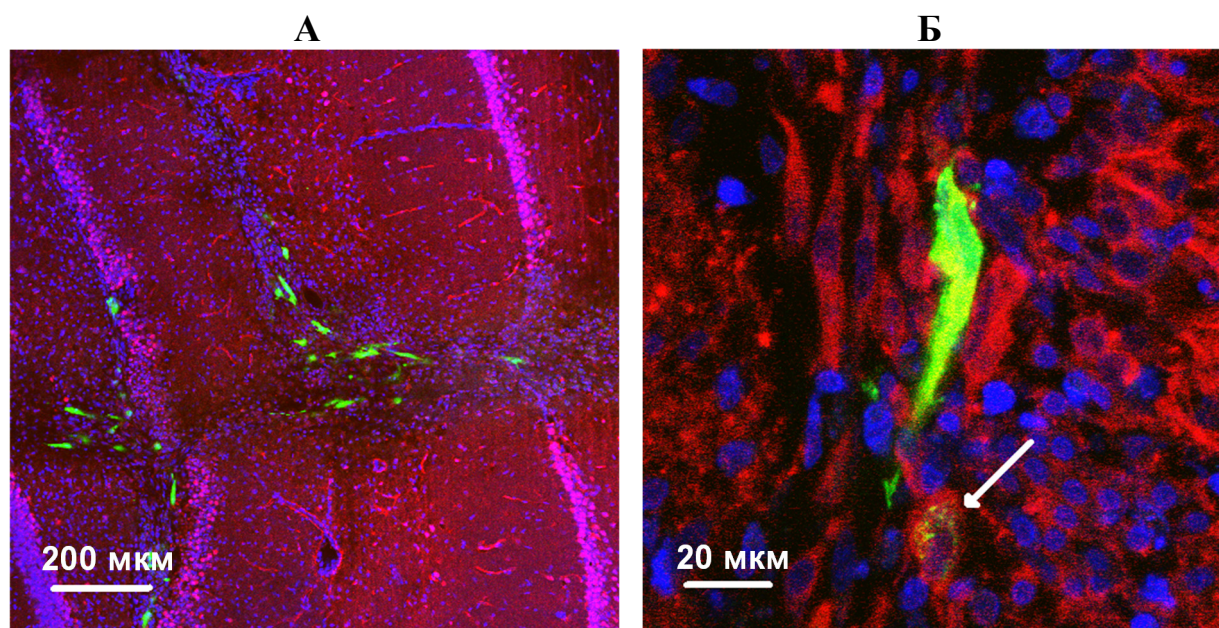


Рис.15. Транспорт митохондрий из ММСК в нейральные клетки *in vivo*. Срезы мозга, в который ввели mitoGFP-экспрессирующие ММСК. Нейроны окрашены антителами против β III-тубулина (красная флуоресценция). Стрелкой указан нейрон (позитивный по β III-тубулину), содержащий зеленые митохондрии из ММСК. Ядра окрашены ToPro-3 (синяя флуоресценция). Масштабные отрезки равны 200 мкм (А) и 20 мкм (Б).

Следует отметить, что для визуализации GFP-позитивных митохондрий в нейронах коэффициент усиления детектора на конфокальном микроскопе был выбран достаточно большим, поэтому при этом флуоресценция митохондрий в ММСК, где таких митохондрий очень много, находится в насыщении и отдельные митохондрии в ММСК не разрешаются. Таким образом, мы подтвердили, что возможность передачи митохондрий из ММСК в нейроны не является феноменом, наблюдаемым исключительно *in vitro*, но подобная передача имеет место и *in vivo*, хотя такие события являются достаточно редкими.

5.7. Распределение ММСК в головном мозге после внутривенного введения

Анализ распределения ММСК в головном мозге после внутривенного введения проводили на срезах мозга методом конфокальной микроскопии. При внутривенном введении некоторое количество меченных Calcein Green ММСК

обнаруживалось через 24 ч после введения в ипсилатеральном полушарии, тогда как через 1 час после введения клетки выявлялись лишь единичные клетки (**Рис.16**).

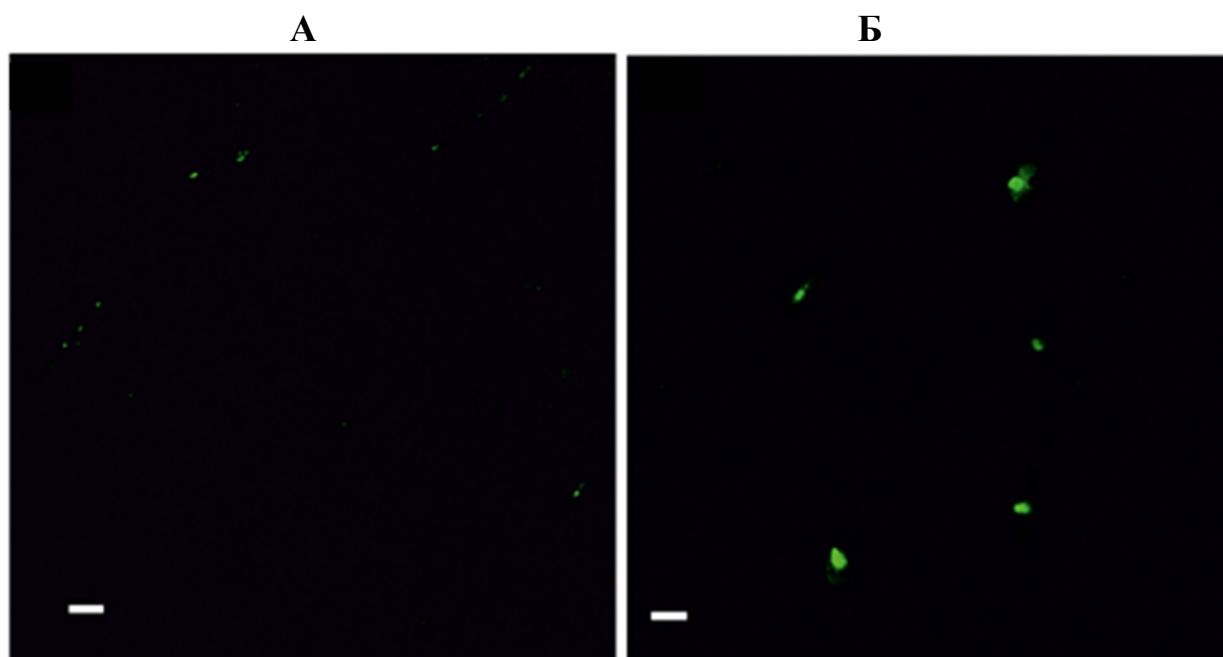


Рис.16. Оценка миграции ММСК в головной мозг. Выявление ММСК с помощью конфокальной микроскопии в паренхиме полушарий. ММСК, меченые Calcein Green (зеленая флуоресценция), вводили внутривенно через 24 часа после повреждения мозга. Через 1 час после введения выявлялись лишь единичные клетки (А), тогда как наибольшее количество ММСК обнаруживалось через 24 часа (Б). Масштабные отрезки равны 20 мкм.

5.8. Нейропротекторный эффект, оказываемый ММСК при лечении экспериментального ишемического инсульта

Мы проанализировали способность ММСК до и после сокультивирования снижать ишемическое повреждение мозга у крыс с модельным ишемическим инсультом. Было обнаружено, что при введении через 24 ч после ишемического инсульта нативные ММСК снижают объем очага повреждения (**Рис.17**) и выраженность неврологического дефицита (**Рис.18**). Аналогичное введение ММСК, сокультивированных с нейронами в течение 24 ч, демонстрировало более выраженное снижение неврологического дефицита по сравнению с нативными ММСК, начиная с 4-го дня лечения (**Рис.18**). Однако объемы очага повреждения и в случае нативных ММСК, и в случае ММСК после сокультивирования, оставались практически одинаковыми (**Рис.17Б**).

Поскольку культура ММСК после сокультивирования может содержать нейральные клетки, в качестве контроля мы проводили внутривенное введение первичных культур нейральных клеток экспериментальным животным. Однако в этом случае не было отмечено улучшения неврологического статуса (**Рис.18**) и/или снижения объема ишемического повреждения в головном мозге (**Рис.17**).

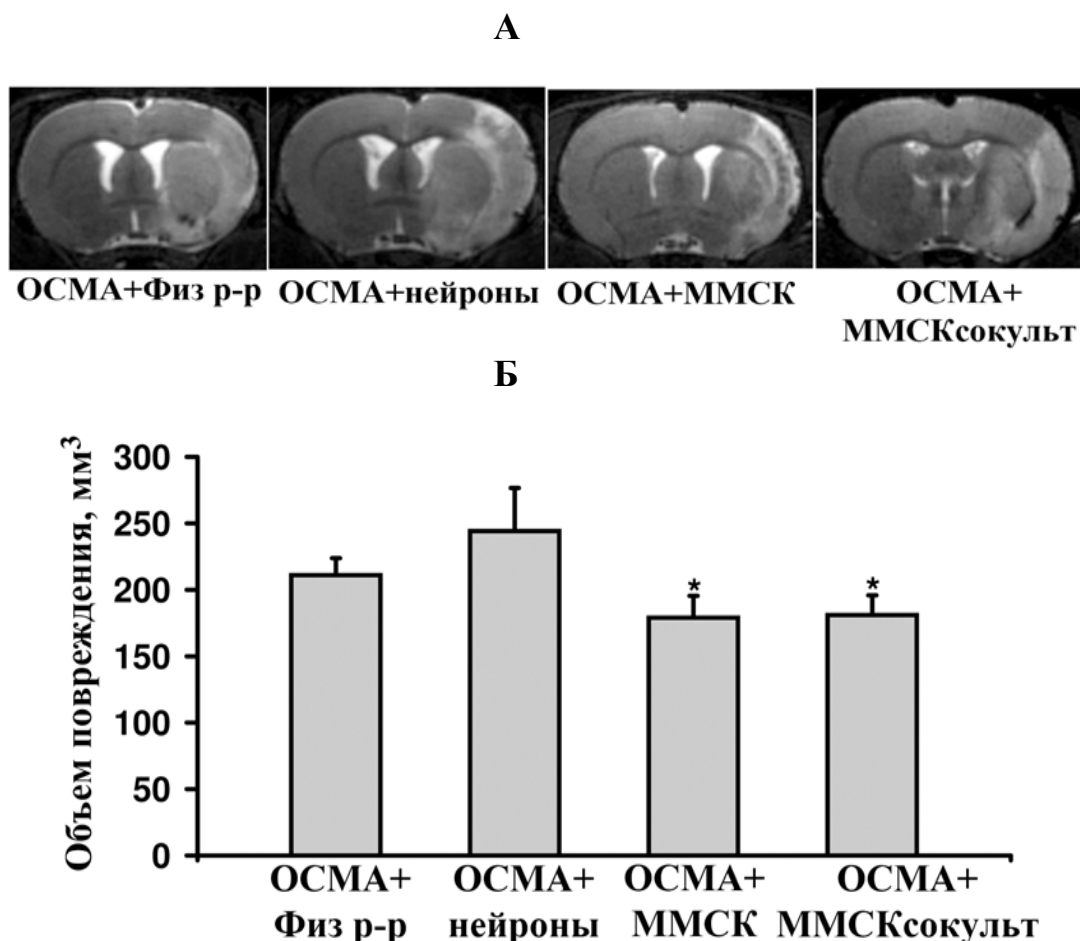


Рис.17. Терапевтические эффекты введения ММСК после экспериментального ишемического инсульта при окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА). **А:** T2-взвешенные изображения, полученные в результате магнитно-резонансной томографии (МРТ) на 8 сут после ишемии. Гиперинтенсивные области соответствуют ишемизированным зонам мозга; **Б:** объемы очагов ишемии головного мозга на 8 день после ОСМА, оцененный по МР-изображениям. Внутривенное введение как нативных, так и сокультивированных с нейронами ММСК, вызывало значительное снижение объёмов очага повреждения в мозге. Введение нейронов не оказывало влияния на размеры очага повреждения, * $p < 0.05$ в сравнении с ОСМА + физ.раствор

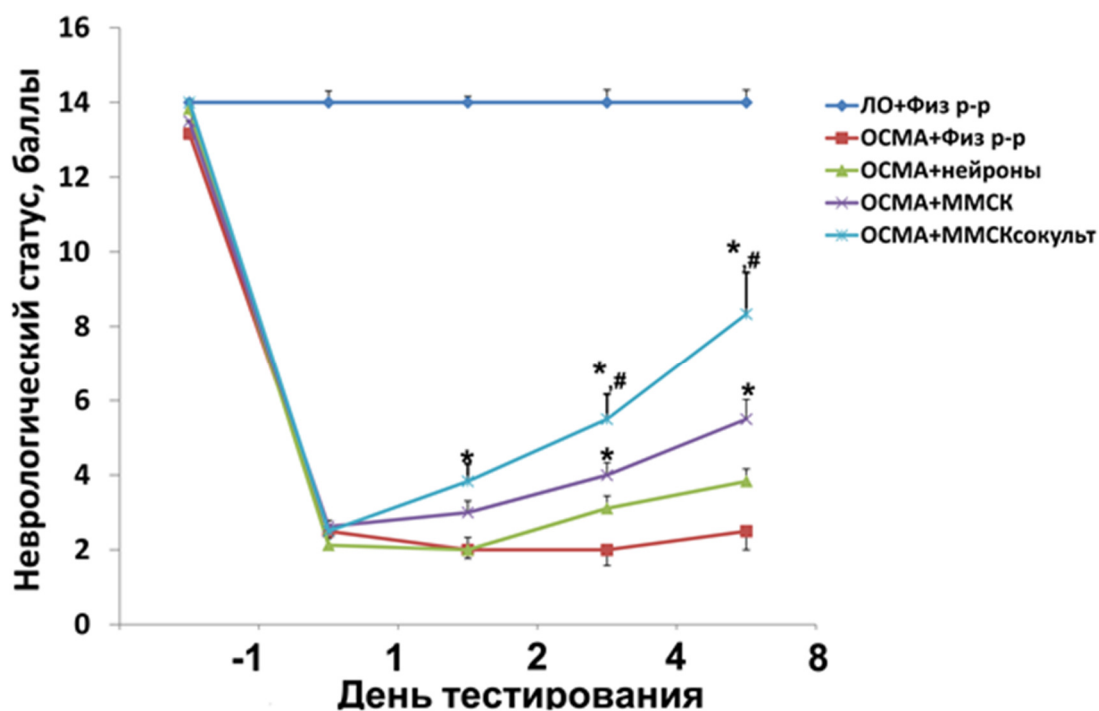


Рис.18. Влияние трансплантации ММСК на неврологический статус в течение 8 дней после моделирования ишемического инсульта. При введении ММСК, сокультивированных с нейронами в течение 24ч, происходит более выраженное улучшение неврологического статуса по сравнению с нативными ММСК. * $p<0.05$ в сравнении с ишемией (ОСМА) + физ.раствор; # $p<0.05$ в сравнении с ишемией (ОСМА) + ММСК. Аббревиатуры: ОСМА, окклюзия средней мозговой артерии; ММСК, мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки; ММСКсокульт, ММСК, предварительно сокультивированные с нейронами.

Чтобы проверить возможность участия экзосом в коммуникации между нейральными клетками и ММСК, что в свою очередь может вносить вклад в положительные эффекты ММСК, мы культивировали ММСК в среде, слитой с первичной культуры нейронов, которая, вероятно, могла содержать экзосомы. Для этой цели 25 мл культуральной среды, собранной с нейральной культуры, содержащей около $5 \cdot 10^6$ клеток перенесли в культуральный флакон с таким же количеством ММСК. Через 24 ч культивирования в этой среде ММСК использовались для введения крысам с ОСМА, другой группе крыс с ОСМА вводили нативные ММСК. Анализ неврологического дефицита и объемов очагов повреждения не выявил различий в эффекте между нативными ММСК и ММСК, предварительно культивированными в среде с экзосомами: улучшения неврологического статуса были сходными в обеих группах вплоть до 8-го дня

тестирования (Рис.19). Таким образом коммуникация между сокультивируемыми клетками посредством экзосом не оказывала значимого эффекта на нейропротекторные свойства ММСК.

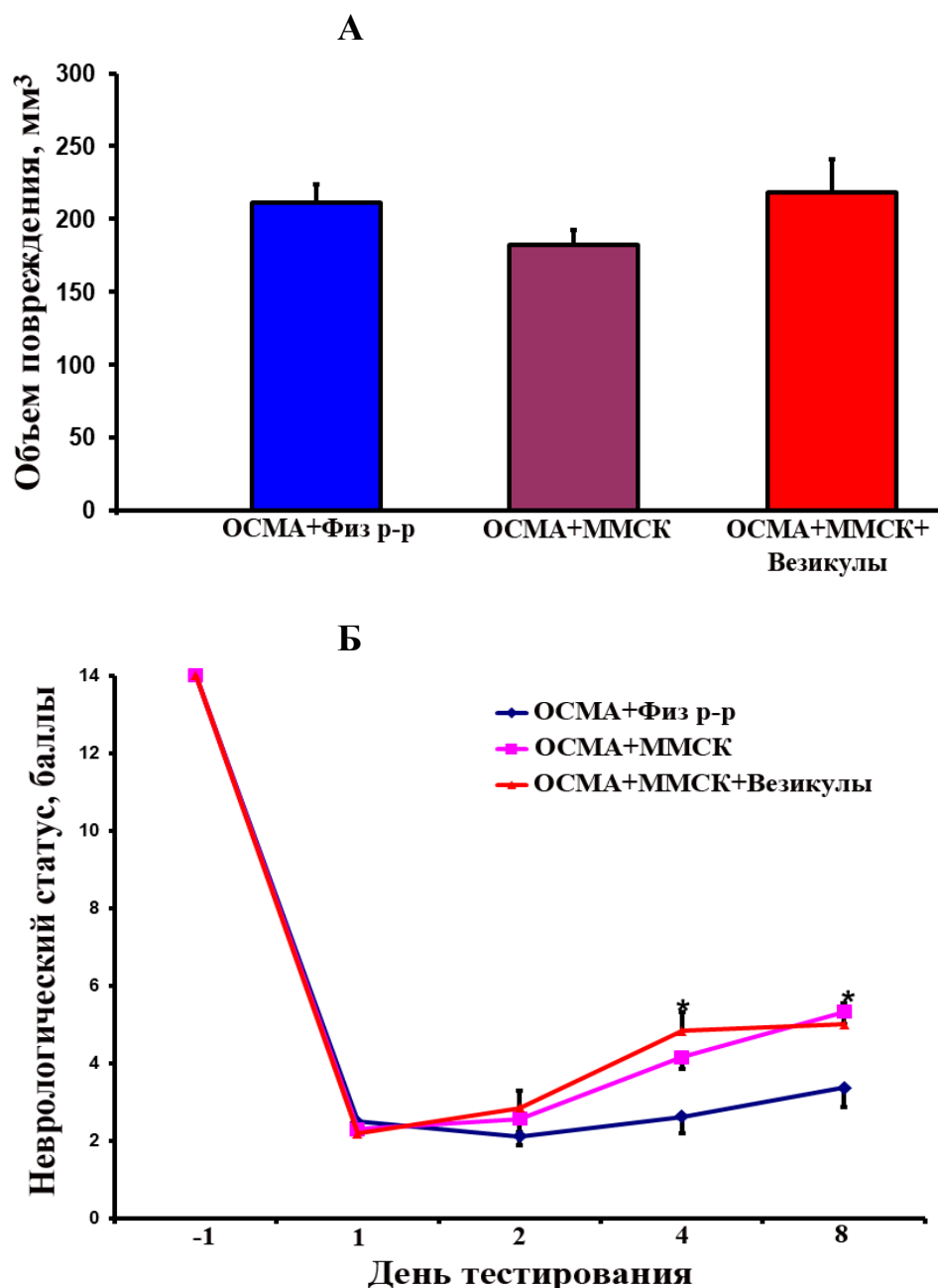


Рис.19. Эффект введения ММСК, прекондиционированных средой культивирования для нейронов, при ОСМА. **А:** объемы очагов ишемии головного мозга на 8 день после ОСМА, оцененные по МР-изображениям. Практически отсутствует разница по этому параметру в группах ОСМА+ММСК и ОСМА+ММСК+везикулы; **Б:** изменение баллов неврологической шкалы у животных с ОСМА в течение 5 дней после введения ММСК. Показано, что улучшения неврологического статуса в группах ОСМА+ММСК и ОСМА+ММСК+везикулы сходны на протяжении всего времени тестирования, $p < 0.05$ по сравнению с ишемией (ОСМА)+физ. раствор

5.9. Усиление передачи митохондрий в клетки-реципиенты с помощью повышения продукции белка Miro1 в ММСК

Как описано выше, ММСК, сокультивированные *in vitro* с нейронами, оказывают более выраженный нейропротекторный эффект при введении крысам с экспериментальным инсультом. Анализ возможных механизмов такого изменения свойств ММСК показал, что при сокультивировании с нейронами в ММСК увеличивается количество белка Miro1. Этот белок является Rho-ГТФазой, которая обеспечивает транспорт митохондрий по элементам цитоскелета внутри клетки. Недавно было обнаружено, что Miro1 также отвечает и за межклеточный транспорт митохондрий [201]. Поскольку повышение количества Miro1 в ММСК после сокультивирования с нейронами коррелирует с увеличением нейропротекторных свойств ММСК при инсульте, мы проверили возможность целенаправленного усиления способности ММСК к передаче митохондрий в нейральные клетки и влияния этого на их терапевтический потенциал. Для этого нами была создана лентивирусная конструкция, несущая ген *Miro1*, которая при инфицировании ММСК индуцирует в них повышенную экспрессию соответствующего белка. При сокультивировании таких Miro1-ММСК с астроцитами мы выявили увеличение числа клеток, получивших митохондрии от ММСК (**Рис. 20**).

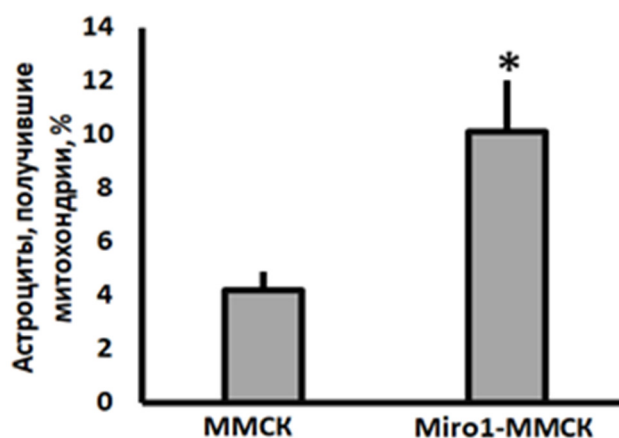


Рис.20. Влияние повышенной продукции Miro1 в ММСК на передачу митохондрий в астроциты. При сокультивировании астроцитов и ММСК с повышенной продукцией Miro1 в течение 24 ч происходит увеличение доли клеток, получивших митохондрии из Miro1-ММСК, по сравнению с аналогичным сокультивированием с нативными ММСК, * $p < 0.05$ по сравнению с нативными ММСК.

5.10. Нейропротекторный эффект ММСК, гиперпродуцирующих Miro1

Самым важным последствием транспорта митохондрий из ММСК является восстановление функций нервных клеток, наблюдаемое *in vivo*. Мы моделировали у крыс ишемию головного мозга, в результате которой возникает неврологический дефицит в иннервируемых данной областью мозга конечностях (**Рис.21**).

В случае введения ММСК неврологический дефицит снижается к 14 дню наблюдения, однако наиболее выраженный терапевтический эффект наблюдается при введении крысам ММСК, в которых гиперэкспрессирован белок Miro1. Таким образом, можно заключить что именно транспорт митохондрий является очень важной составляющей нейропротекторного эффекта, оказываемого ММСК после экспериментального ишемического инсульта.

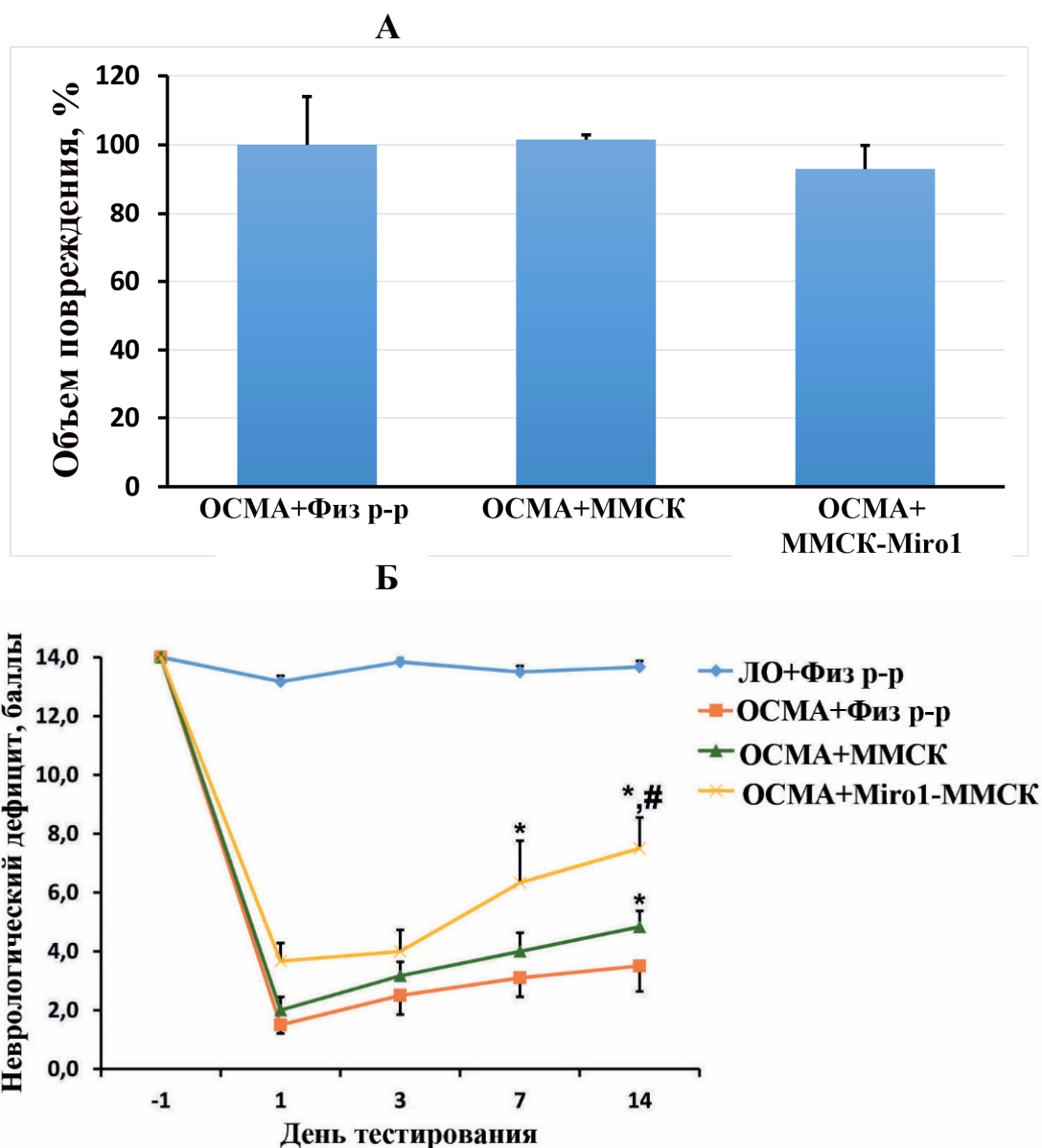


Рис.21. Эффект Miro1-ММСК при лечении крыс с экспериментальным ишемическим инсультом. Лечение животных с экспериментальным инсультом ММСК, несущими трансгенный белок Miro1, приводило к снижению объема очага повреждения (А) и оказывало более выраженный нейропротекторный эффект, чем лечение нативными ММСК (Б), что выражается в более высоких баллах неврологической шкалы на 14 день после ОСМА, * $p < 0.05$ по сравнению с ишемией (ОСМА)+физ. раствор, # $p < 0.05$ по сравнению с ишемией (ОСМА)+ММСК

5.11. Повышение эффективности передачи митохондрий как следствие нарушения функции митохондрий в клетках-реципиентах

Дальнейшие эксперименты были направлены на то, чтобы изучить, как состояние митохондрий в клетке-реципиенте влияет на эффективность транспорта митохондрий из ММСК. Известно, что при ишемии головного мозга происходит резкое нарушение функционирования митохондрий в поврежденной области [343]. Моделью ишемии/реперфузии мозга *in vitro* является кислородно-глюкозная депривация (КГД), которой мы подвергали астроциты в течение 5 ч. В результате КГД митохондрии таких клеток оказывались значительно фрагментированы (**Рис.22**), что указывает на их повреждение [194].

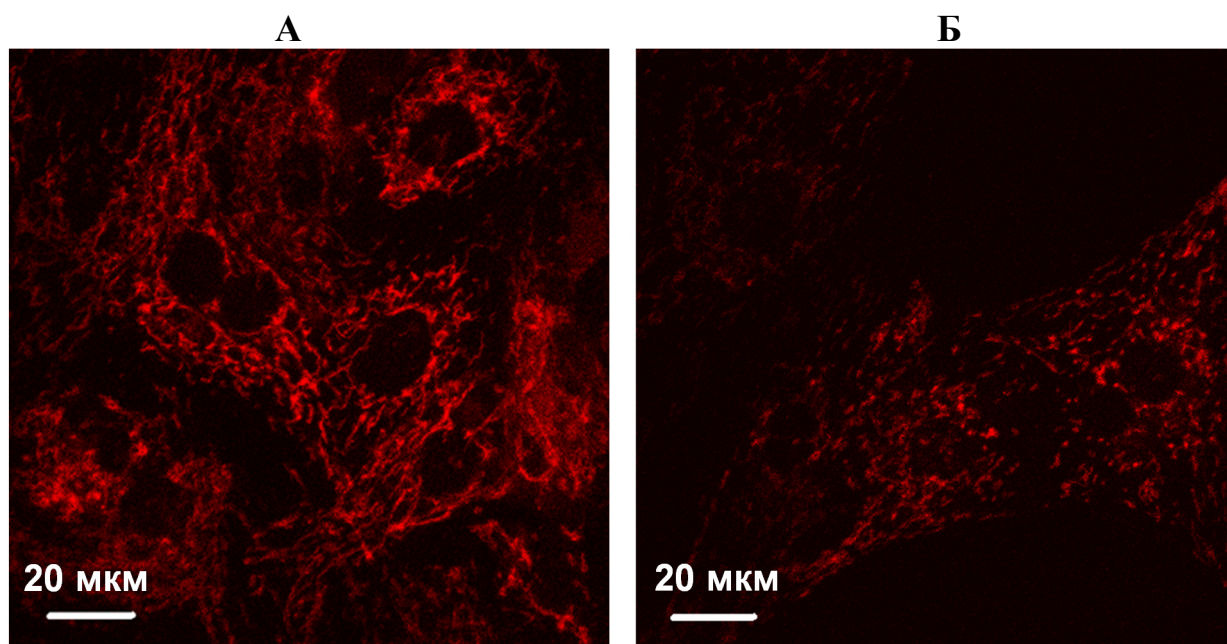


Рис.22. Фрагментация митохондрий крысиных астроцитов после кислородно-глюкозной депривации. Клетки нагружены 200 нМ TMRE. Конфокальная микроскопия, масштабные отрезки равны 20 мкм.

А: нативные астроциты, культивированные в обычных условиях,

Б: астроциты, которые в течение 5ч. подвергались КГД. Митохондрии астроцитов после КГД более фрагментированы (Б) по сравнению с митохондриями нативных астроцитов.

В результате процесса фрагментации митохондрии вместо нитевидной удлиненной формы приобретают округлую, при этом обычно растёт количество [403] таких фрагментов. С помощью специального алгоритма программы

ImageJ была подсчитана длина сегментов митохондрий астроцитов в норме и после КГД. Оказалось, что после КГД митохондрии астроцитов стали значительно короче (**Рис.23**), то есть действительно происходит фрагментация митохондриального ретикулума, что указывает на его повреждение.

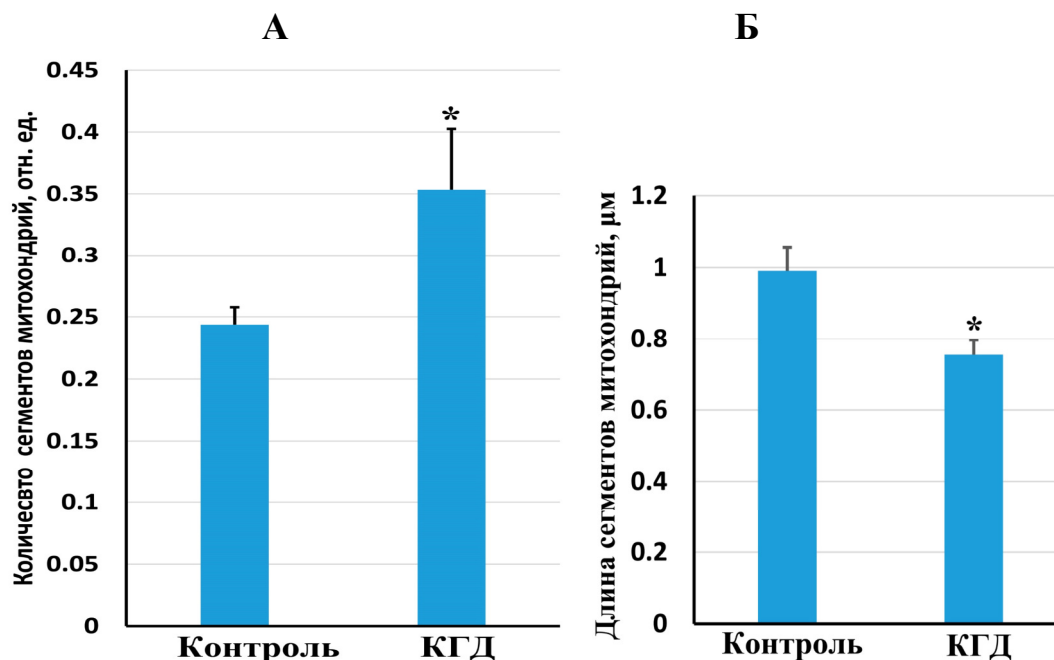


Рис.23. Количество (А) и длина (Б) сегментов митохондрий астроцитов в норме и после КГД. Видно, что после КГД длительностью 5 ч количество сегментов митохондрий растёт (А), а длина их уменьшается (Б), что говорит о большей фрагментированности митохондрий после КГД по сравнению с астроцитами в норме (контроль).

Мы показали, что если культура астроцитов перенесла КГД в течение 5 ч и затем была сокультивирована с ММСК, то процент астроцитов, получивших митохондрии от стволовых клеток значительно возрастает (почти в 2 раза) (**Рис.24Б**), то есть повреждение митохондрий астроцитов стимулирует транспорт функциональных митохондрий из ММСК.

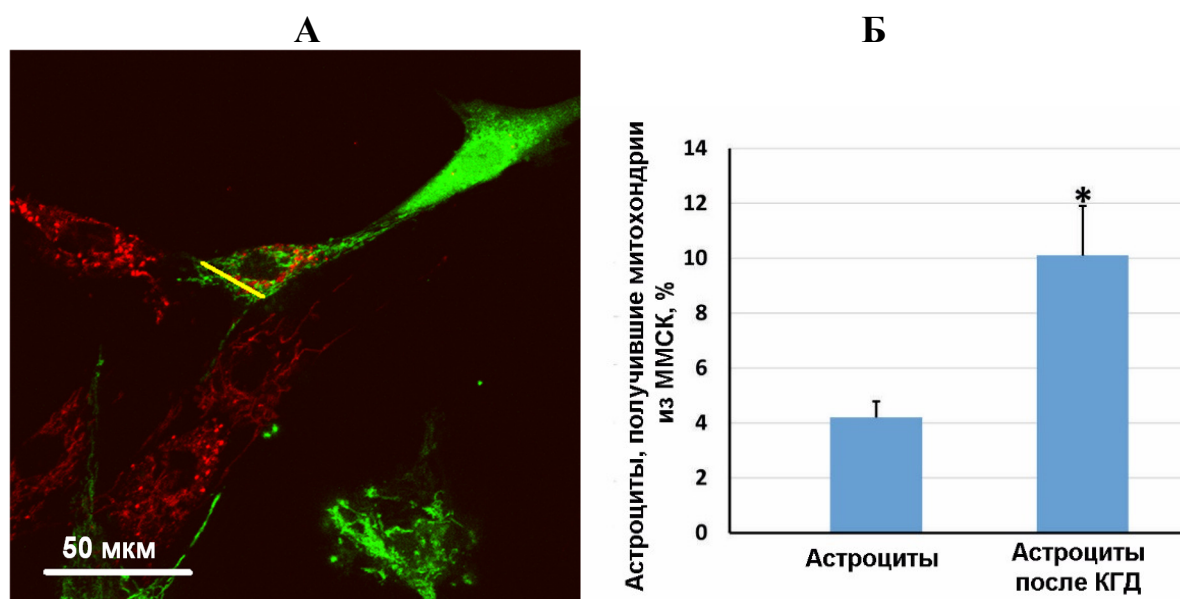


Рис.24. Влияние кислородно-глюкозной депривации астроцитов на передачу митохондрий в них из ММСК. **А:** ММСК трансфицировали конструкцией, кодирующей красный флуоресцентный белок, полученный из Дискосомы, слитый с сигналом митохондриальной локализации в субъединице VIII цитохром *c* оксидазы (mitoDsRed, красная флуоресценция), астроциты трансфицировали лентивирусной конструкцией, кодирующей зеленый флуоресцентный белок, слитый с сигналом локализации в субъединице VIII цитохром *c* оксидазы (mitoGFP, зеленая флуоресценция). MitoGFP-астроциты подвергли кислородно-глюкозной депривации (КГД) и подсеяли к ним mitoDsRed-ММСК. Конфокальная микроскопия через 24ч сокультивирования, масштабный отрезок равен 50 мкм. Показаны красные митохондрии в астроцитах (стрелка); **Б:** при сокультивировании астроцитов, предварительно подвергнутых КГД, с ММСК происходит увеличение доли клеток, получивших митохондрии из ММСК, * $p < 0.05$ по сравнению с нативными астроцитами.

Одним из доказательств стимуляции передачи митохондрий при их повреждении в нейральных клетках стало использование так называемых р-нулевых клеток, полученных из нейральной линии PC12. В таких клетках за счет обработки бромистым этидием митохондриальная ДНК или полностью отсутствует или ее количество серьезно снижено, в результате чего митохондрии не способны к окислительному фосфорилированию и синтезу пиримидинов [176]. Сокультивирование таких клеток с ММСК также вызывало значительный прирост доли клеток PC12, получивших митохондрии из ММСК (Рис.25).

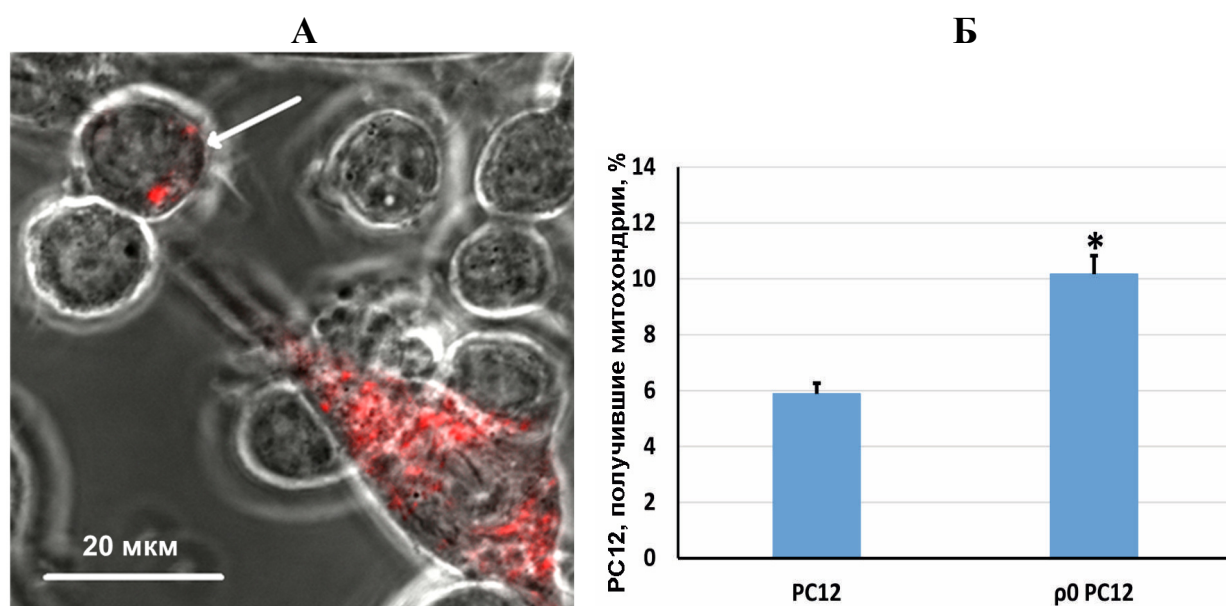


Рис.25. Влияние повреждения мтДНК на передачу митохондрий в совместной культуре PC12 и ММСК при сокультивировании в течение 24 ч. **А:** конфокальное изображение совместной культуры PC12 и ММСК. ММСК трансфицированы mitoDsRed и сокультивированы с PC12 в течение 24ч. Показана клетка PC12, получившая митохондрии от ММСК (стрелка). Масштабный отрезок равен 20 мкм; **Б:** при сокультивировании ММСК с р-нулевыми PC12 повышается эффективность транспорта митохондрий, что выражается в увеличении доли р-нулевых клеток линии PC12, получивших митохондрии от ММСК, * $p < 0.05$ по сравнению с интактными PC12

5.12. Влияние транспорта митохондрий на пролиферацию и дыхание клеток

Важным функциональным последствием передачи митохондрий из ММСК стало восстановление клеточных функций, связанных с митохондриями. Так, клетки PC12 с поврежденной митохондриальной ДНК из-

за нарушенного дыхания основную часть энергии получают путем гликолиза, в результате чего в среде культивирования значительно увеличивается количество лактата (**Рис.26**). После сокультивирования таких клеток с ММСК количество лактата в среде снижалось практически до контрольных значений, что говорит о восстановлении процессов окислительного фосфорилирования.

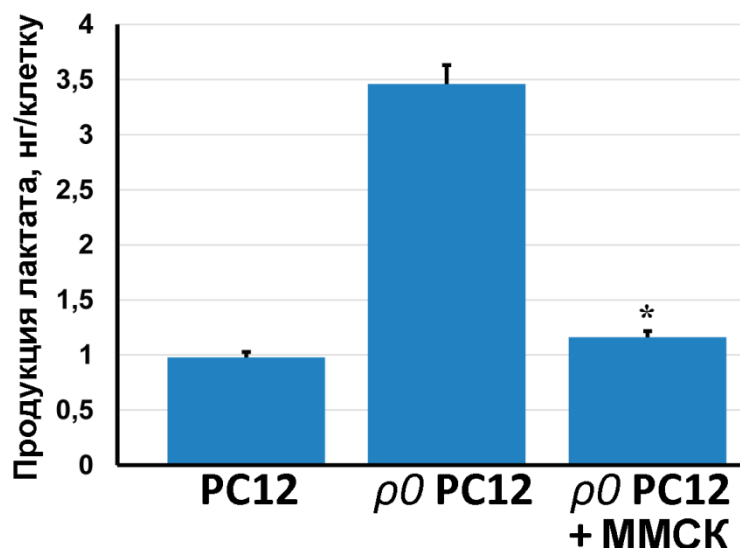


Рис.26. Влияние сокультивирования ММСК на восстановление окислительного фосфорилирования в $\rho 0$ клетках линии PC12. $\rho 0$ PC12 сокультивировали с ММСК в течение 24 ч, затем из совместной культуры выделяли $\rho 0$ PC12 ($\rho 0$ PC12+ММСК) и оценивали продукцию внеклеточного лактата. В таких $\rho 0$ PC12 после сокультивирования с ММСК происходит снижение продукции лактата в среду до уровня PC12 с ненарушенной функцией митохондрий.

Вдобавок к этому уровень пролиферации $\rho 0$ PC12 значительно ниже, чем у интактных PC12. Был проанализирован уровень пролиферации $\rho 0$ PC12 после сокультивирования с ММСК (**Рис.27А**) и было обнаружено, что она значительно возрастает и снижается время удвоения практически в 2 раза (**Рис.27Б**). Важно отметить, что после сокультивирования клетки PC12 отделяли от ММСК, поэтому такое увеличение пролиферации культуры связано именно с ускорением деления клеток PC12, а не с наличием в культуре быстро делящихся ММСК. Таким образом, сокультивирование с ММСК не только восстанавливает биоэнергетику PC12, но и нормализует уровень пролиферации, который был нарушен в связи с митохондриальным повреждением.

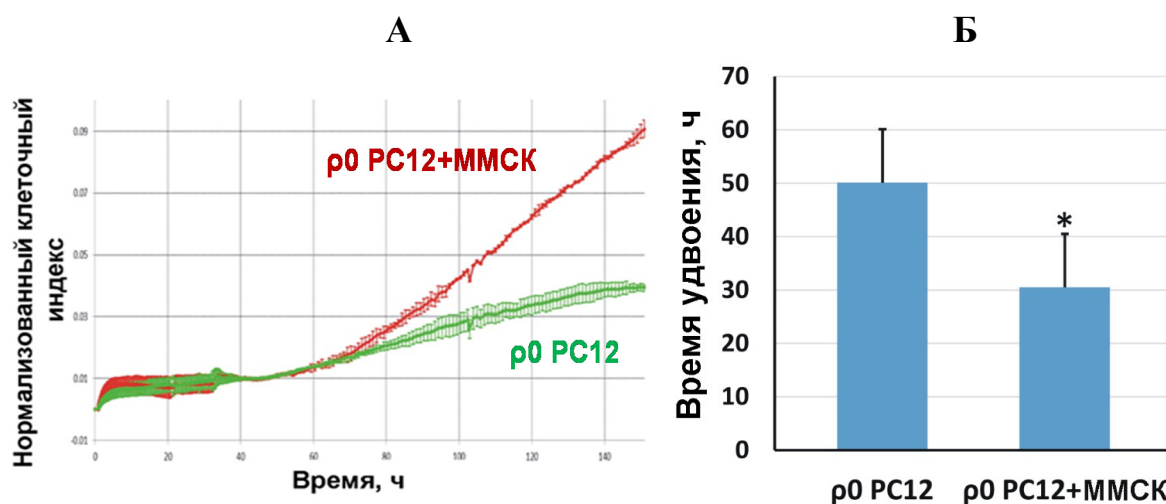


Рис.27. Восстановление пролиферации в $\rho 0$ PC12 после сокультивирования с ММСК. Сокультивирование ММСК с $\rho 0$ PC12 приводит к увеличению нормализованного клеточного индекса (А) и снижению времени удвоения клеток (Б), таким образом, демонстрируя активацию пролиферации в $\rho 0$ PC12

5.13. Транспорт митохондрий в совместных культурах нейральных клеток и ММСК может происходить по туннельным нанотрубкам

В нашей работе в экспериментах по сокультивированию мы часто наблюдали межклеточные контакты по типу ТНТ между клетками разных типов в совместной культуре. Образование ТНТ наблюдалось при сокультивировании: 1) ММСК с нейронами, 2) ММСК с астроцитами, 3) ММСК с PC12. Образование ТНТ как считается, может опосредовать транспорт митохондрий [325,381,396]. Действительно, в наших экспериментах мы наблюдали митохондрии внутри ТНТ (**Рис.28**).

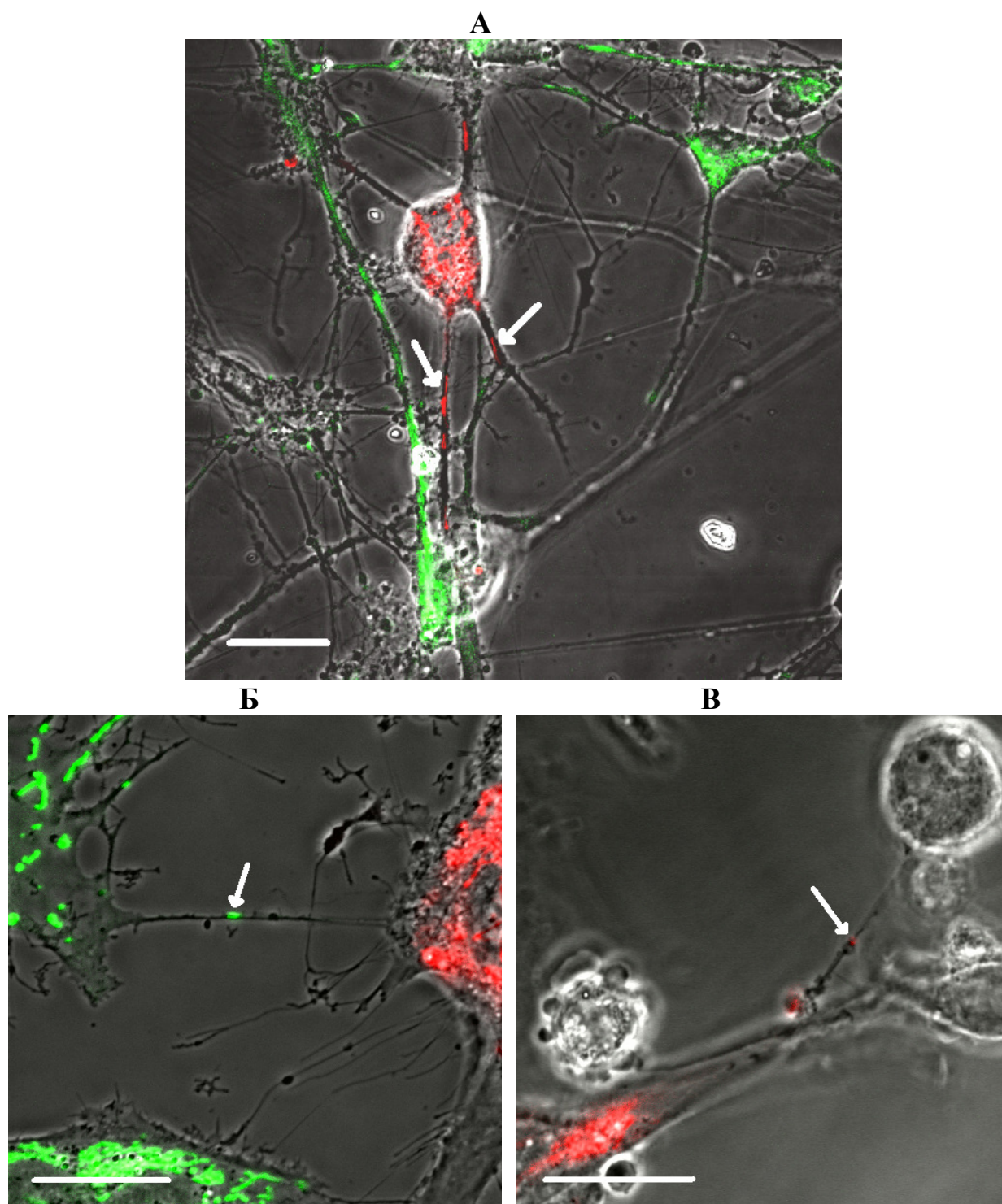


Рис.28. Митохондрии в ТНТ, образуемых клетками в различных совместных культурах. ММСК, трансфицированные лентивирусами, кодирующими mitoDsRed (красная флуоресценция), сокультивированы с mitoGFP-нейронами-зеленая флуоресценция (А), mitoGFP-астроцитами-зеленая флуоресценция (Б) и PC12 (В). Сокультивирование 24ч, конфокальная микроскопия. Масштабные отрезки равны 20 мкм. Показаны ТНТ и митохондрии в них (стрелки).

Подсчет таких структур показал, что среднее количество ТНТ, образуемых ММСК, возрастало в случае сокультивирования с нейронами в течение 24 ч по сравнению с монокультурой ММСК (**Рис.29**).

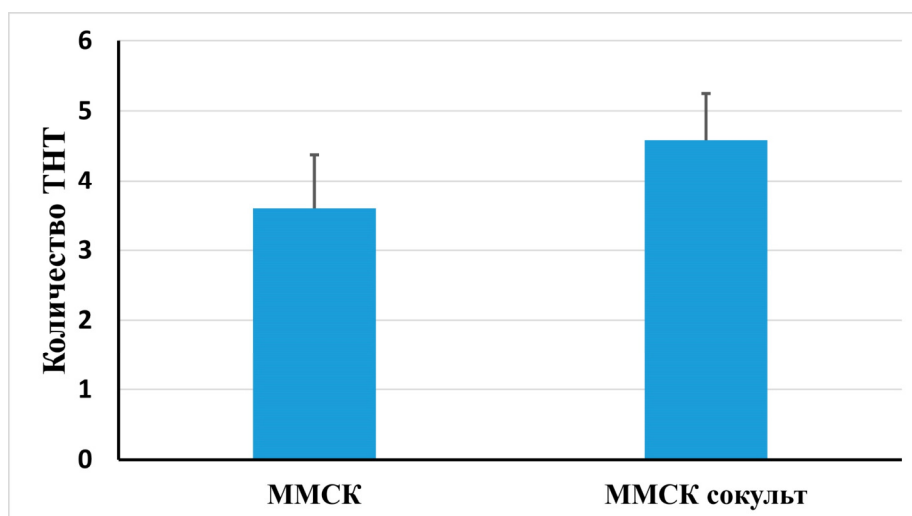


Рис.29. Образование ТНТ между ММСК и нейронами. При сокультивировании ММСК с нейронами в течение 24 ч среднее количество ТНТ, образуемых ММСК, возрастало.

Аналогичное увеличение количества образуемых ТНТ наблюдалось и в случае сокультивирования ММСК с астроцитами (**Рис.30**). При этом когда ММСК сокультивировали с астроцитами, подвергнутыми 5ч КГД, количество ТНТ возрастало еще сильнее (**Рис.30**). Схожим образом наблюдалось повышение образования ТНТ, когда с астроцитами сокультивировали ММСК с повышенной продукцией белка Miro1.

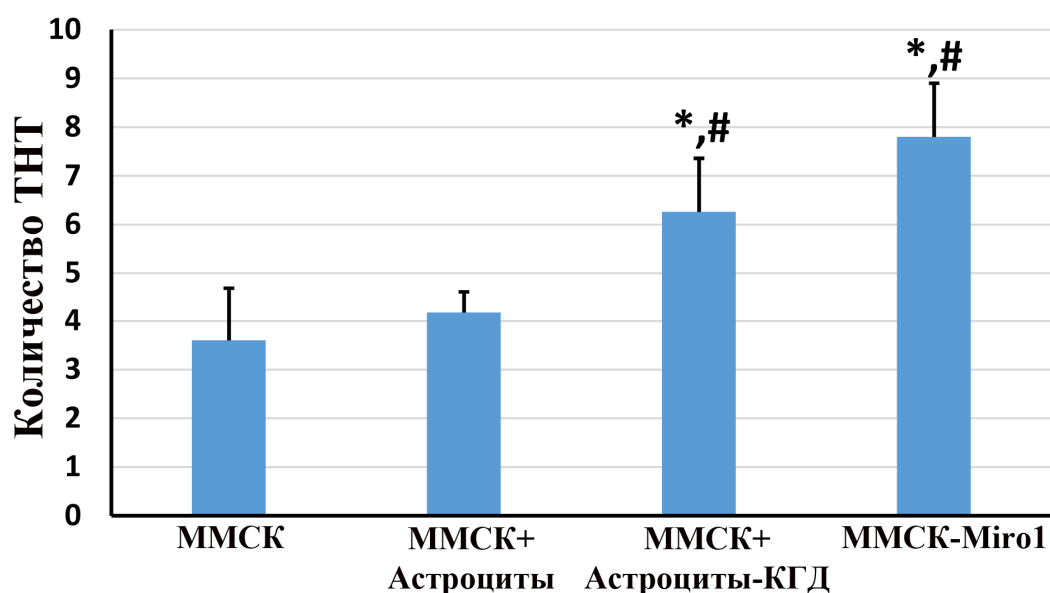


Рис.30. Образование ТНТ между ММСК и астроцитами. При сокультивировании ММСК с астроцитами в течение 24 ч увеличивается количество ТНТ, образуемых ММСК, при этом более выраженное увеличение наблюдается при сокультивировании ММСК с астроцитами, перенесшими КГД, или при сокультивировании ММСК, гиперпродуцирующих белок Miro1, $^{\#}, *p<0.05$ в сравнении с ММСК+Астроциты

Глава 6 ОБСУЖДЕНИЕ

ММСК с недавних пор стали особенно привлекательными кандидатами для клеточной терапии при инсульте из-за их доказанных нейропротекторных свойств и низкой иммуногенности. До недавнего времени ученые в области клеточной биологии придерживались двух точек зрения относительно механизмов положительного влияния клеточной терапии: одни считали, что введение стволовых и прогениторных клеток в поврежденный орган приводит к их дифференцировке в специализированные клетки ткани взамен потерянных или поврежденных в организме, а другие указывают на положительный паракринный эффект, достигаемый синтезом определенных сигнальных молекул, необходимых для выживания и регенерации поврежденного органа [306; 387]. Хотя обе группы признают положительный терапевтический эффект введения стволовых и прогениторных клеток для лечения патологий органов, в последнее время начинает доминировать точка зрения о преимущественно паракринном (в свою очередь содержащем множество механизмов) действии ММСК.

Что касается нейропротекторных свойств ММСК, в нескольких исследованиях, проведенных на крысах было продемонстрировано, что введение ММСК после экспериментального инсульта уменьшает объем инфаркта и улучшает функциональное восстановление мозга [60; 62; 196]. Одним из аргументов, подтверждающих паракринный эффект стволовых клеток, является быстрое исчезновение ММСК из организма после трансплантации, обычно в течение нескольких дней.

К тому же, очень часто положительные эффекты ММСК наблюдаются на ранних сроках после их введения, когда очень маловероятно, что за это время они могли бы интегрироваться в нервную ткань и сформировать функциональные нейроны. Хотя появление признаков фенотипической и функциональной нейральной дифференцировки у ММСК показано, образование таких нейронов является достаточно редким событием для того, чтобы обеспечить значительные неврологические улучшения при различных

неврологических заболеваниях [84]. Этот парадокс перенаправляет внимание исследователя в сторону паракринных механизмов, посредством которых ММСК могут защищать нервную ткань. На сегодняшний день широко признано, что ММСК могут повышать регенерацию тканей путем секреции факторов роста и цитокинов, включая BDNF, фактор роста нервов, VEGF и некоторых других [75; 212]. Кроме того, ММСК могут модулировать воспалительный ответ, который играет значимую роль в постишемическом повреждении мозга, поскольку ММСК секретируют иммуномодулирующие факторы, такие как простагландин E₂, фактор некроза опухоли- α , TGF- β , интерлейкин 6 и др. [190; 337; 412]. Однако механизмы, лежащие в основе регенеративного потенциала ММСК, все еще активно изучаются.

Один из способов отличить альтернативные пути воздействия стволовых клеток на функции органа – исследовать межклеточные коммуникации между тканеспецифичными и стволовыми клетками. Это приводит к поиску химических соединений, которые стволовые клетки продуцируют или секретируют во внешнюю среду после их сокультивирования с дифференцированными клетками. Это также применимо к клеткам хозяина, которые могут реагировать на присутствие других клеток путем синтеза некоторых биологических соединений. Такое «общение» между соседними клетками [123; 229] или даже с клетками отдаленных органов в пределах одного организма [344] было предложено давно, и уже опубликован большой объем данных, подтверждающих этот феномен. Однако межклеточная коммуникация путем выделения некоторых биологически активных соединений для рецепции соседними клетками несколько ограничена диффузией. Это ограничение может быть сведено к минимуму путем направленного переноса клеточных компонентов из клетки в клетку по образующимся межклеточным контактам. В нашей работе показано перемещение компонентов цитоплазмы между клетками, а также образование широко изучаемых в последнее время ТНТ, которые в том числе могут опосредовать такую передачу [121; 393]. Для разных типов

дифференцированных клеток, контактирующих со стволовыми и прогениторными клетками, существование передачи цитоплазматических компонентов уже показано [133; 311], включая межклеточный перенос митохондрий. В настоящем исследовании мы изучили роль обмена клеточными компонентами в реализации нейропротекторного потенциала ММСК. Мы продемонстрировали, что нейральные клетки (и нейроны, и астроциты) способны контактировать с ММСК и обмениваться с ними цитоплазматическим содержимым. В этом случае перенос цитозоля, оцененный по транспорту Calcein, происходил прежде всего в направлении из нейронов в ММСК. Похожая асимметрия в передаче меченных Calcein компонентов цитозоля также показана при сокультивировании легочных фибробластов и клеток легочной карциномы [443]: передача детектировалась только в направлении из фибробластов в опухолевые клетки. Авторы связывают это с низким уровнем экспрессии коннексинов 43 и 45 на поверхности клеток карциномы, поскольку после трансфекции клеток карциномы по коннексину 43 передача Calcein наблюдалась и в направлении из опухолевых клеток в фибробласты. С другой стороны, мы показали, что перенос митохондрий шел в направлении из ММСК в нейроны или глиальные клетки. Ранее уже сообщалось о таком переносе митохондрий между ММСК и кардиомиоцитами, гладкомышечными клетками сосудов, альвеолярными эпителиальными клетками, почечными эпителиальными клетками и опухолевыми клетками [303], [158; 280; 301; 356; 394]. Более того, было показано, что такое «дониrowание» митохондрий может приводить к восстановлению утраченной функции митохондрий в клетках-реципиентах [356]. Кроме того, в ряде исследований было показано, что перенос митохондрий из ММСК в поврежденные клетки ответственен за терапевтические эффекты ММСК. Это подчеркивает значение наших данных о повышении количества белка Miro1 в ММСК, который является важным участником митохондриального транспорта. Недавно Ahmad и коллеги показали, что движение митохондрий из стволовых клеток в клетки-реципиенты регулируется белком Miro1 и является частью

точно направленного процесса, а не общего обмена содержимым путем обычной диффузии [3]. Теперь считается, что движение митохондрий через цитоплазматические мостики, такие как TNT, происходит по микротрубочкам с помощью Miro1[201]. Ранее было продемонстрировано, что генетически индуцированное увеличение Miro1 в ММСК приводит к большей терапевтической эффективности ММСК [3]. В нашей работе было продемонстрировано, что более высокий уровень Miro1 может быть достигнут не только путем генетической модификации, но также процедурой сокультивирования с нейронами. Наша система сокультивирования, состоящая из ММСК и нейронов, может считаться моделью для изучения межклеточных взаимодействий ММСК с мозговой тканью, когда ММСК трансплантировали *in vivo* после ишемического инсульта. Внутривенно введенные ММСК мигрируют в мозг [60; 184] и, вероятно могут взаимодействовать с нейронами и астроцитами, делаясь цитоплазматическим содержимым и митохондриями. Это может приводить к изменениям в свойствах ММСК, что повышает их нейропротекторный эффект, как мы и наблюдали после введения ММСК, ранее сокультивированных с нейронами, по сравнению с необработанными ММСК.

Чтобы получить представление о природе улучшенного терапевтического эффекта ММСК, сокультивированных с нейронами, мы проанализировали продукцию трофических и ростовых факторов ММСК до и после сокультивирования с нейронами. Продукция и секреция основных нейротрофических и ростовых факторов ММСК, таких как нейротрофин-3, BDNF, глиальный нейротрофический фактор GDNF, фактор роста нервов NGF[64], фактор VEGF, фактор роста гепатоцитов HGF[253], цилиарный нейротрофический фактор CNTF[59] и основной фактор роста фибробластов bFGF [178], была неоднократно показана многими авторами. Нами была проанализирована продукция таких факторов как BDNF, TGF- β 1 и VEGF в ММСК до и после сокультивирования. Значимые изменения в количестве и распределении наблюдались лишь в случае фактора BDNF. В интактных ММСК, BDNF вырабатывался в некотором количестве и был равномерно

распределен в цитоплазме ММСК. Однако после сокультивирования с нейронами, в ММСК наблюдалось лишь небольшое увеличение уровня BDNF, но он был перераспределен в клетке и был локализован у плазматической мембраны. Таким образом, возможно, что после сокультивации ММСК более активно секретируют BDNF. Вполне вероятно, что BDNF, продуцируемый ММСК, ответственен за повышение нейропластичности в ишемизированном мозге, наблюдаемое как после введения нативных ММСК, так и в ММСК, сокультивированных с нейронами. Это подтверждается тем, что на развитие нейропротекторного эффекта требуется значительное время, в наших экспериментах различия в нейропротекторных эффектах между интактными и сокультивированными ММСК возрастают именно к 8 суткам после инсульта и трансплантации клеток. Хорошо известно, что BDNF обеспечивает нейропластичность [188], оказывает выраженное нейропротекторное действие на моделях ишемии головного мозга [58], а ММСК сверхэкспрессирующие BDNF, обладают более выраженным терапевтическим действием при ишемии головного мозга [397]. Особым достижением данного исследования можно считать доказательство того, что наблюдаемый *in vitro* перенос митохондрий из ММСК в нейроны и глиальные клетки может происходить и *in vivo*. Известно, что окислительный стресс и повреждение митохондрий - две основные причины дисфункции мозга после инсульта [11; 221]. В этом случае перенос здоровых митохондрий из ММСК в нейроны, где митохондрии повреждены, может обеспечить лучшую выживаемость и функционирование нервных клеток, что уже было показано для других типов клеток [356].

В конечном итоге, на основании нашей работы, мы можем предложить схему, отражающую роль межклеточных «переговоров» в реализации нейропротекторных эффектов ММСК при ишемическом инсульте (Рис.31). Согласно этой схеме, цитозоль нейральных клеток переносится в ММСК, что индуцирует более активную продукцию нейротрофических факторов, что повышает пластичность мозга и приводит к более эффективному восстановлению после инсульта. При использовании трансплантированных

клеток, сокультивированных *in vitro*, восстановление неврологических функций после ишемического повреждения будет происходить раньше (Рис.18). Кроме того,

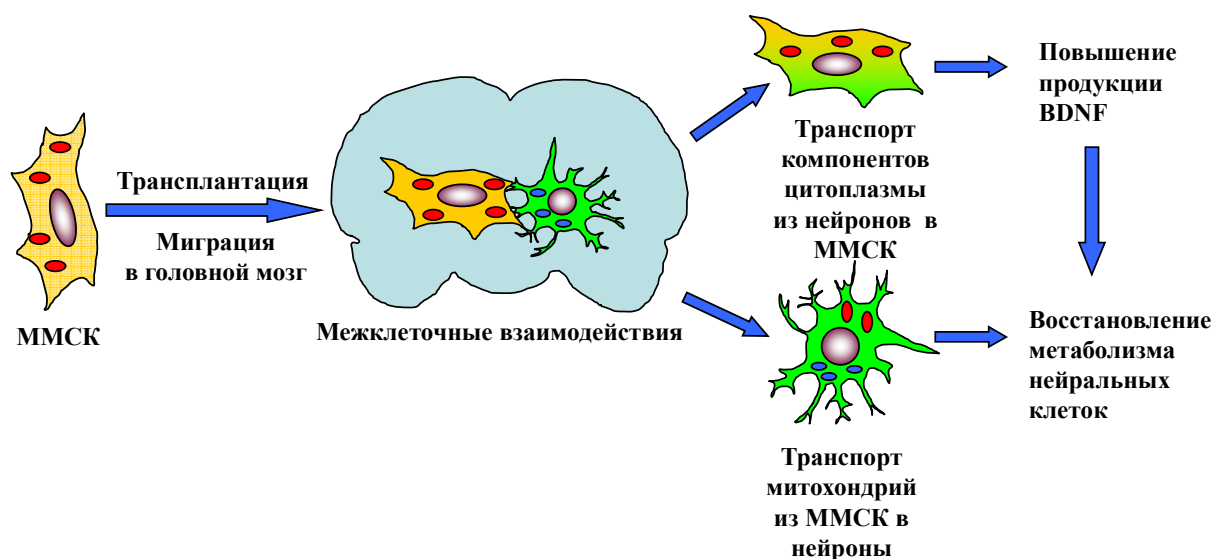


Рис.31. Схема возможного взаимодействия ММСК с нейральными клетками в мозге согласно межклеточным взаимодействиям в совместной культуре. Красные и голубые овалы внутри клеток обозначают митохондрии ММСК и нейральных клеток соответственно. Сокращения: BDNF-нейротрофический фактор мозга, ММСК-мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки.

положительные результаты образования межклеточных контактов с ММСК могут быть последствием передачи их митохондрий в нервные клетки, в которых собственные митохондрии были повреждены во время ишемии. Увеличение популяции функциональных митохондрий в нейронах может обеспечить лучшую выживаемость клеток и поддержание энергетического баланса, тем самым уменьшая или откладывая гибель нервных клеток и постишемическую нейродегенерацию.

Обнаружив в ходе нашего исследования, что в процессе транспорта митохондрий из ММСК в нейральные клетки принимает участие Miro1, мы затем подтвердили важность этого белка для транспорта митохондрий в нейральные клетки и его вклад в терапевтическую эффективность ММСК при экспериментальном инсульте. Помимо прямого повышения эффективности митохондриального транспорта *in vitro*, мы обнаружили, что оверэкспрессия

Miro1, индуцированная лентивирусной трансфекцией, увеличивает потенциал ММСК для снижения неврологического дефицита после инсульта.

Мы также показали, что эффективность митохондриального транспорта из ММСК возрастает, когда повреждены митохондрии в клетках-реципиентах. Мы провоцировали митохондриальное повреждение в астроцитах, смоделировав ишемию/реперфузию *in vitro* (кислородно-глюкозная депривация) или индуцировали повреждение митохондриальной ДНК в нейроноподобных клетках линии PC12 путем долгосрочной инкубации клеток с бромидом этидия. В обеих моделях при сокультивировании с ММСК мы наблюдали повышение транспорта митохондрий ММСК, что также сопровождалось увеличением образования ТНТ. Это может служить еще одним доказательством того, что перенос митохондрий происходит в значительной степени через ТНТ, тем более что мы наблюдали митохондрии, меченные флуоресцентным белком внутри этих структур.

Один из наиболее впечатляющих результатов из представленных здесь показал, что после того, как ММСК были сокультивированы с р0 PC12, которые имеют дефектную мтДНК или практически ее лишены, некоторые из дефектных PC12 приобрели функциональные митохондрии. Спасенные клетки были способны экспоненциально пролиферировать в стандартной среде без добавления уридина и пирувата, подобно необработанным этидием клеткам PC12. Хотя наши результаты не полностью исключают возможность того, что клетки подверглись слиянию с ММСК, но это объяснение маловероятно, потому что мы никогда не обнаруживали два ядра в клетках с полученными митохондриями. Восстановление митохондриальной функции было продемонстрировано при анализе кинетики роста клеток и параметров митохондриальной активности - снижалась выработка внеклеточного лактата.

Считается, что многие неврологические заболевания связаны с митохондриальной дисфункцией, являющейся как результатом генетических нарушений в митохондриальной ДНК или ядерных генах, кодирующих митохондриальные белки [257], так и результатом повреждения митохондрий

при острых патологиях, например, ишемии [322]. Наши данные свидетельствуют о том, что последствия таких митохондриальных дефектов могли бы быть скомпенсированы передачей здоровых митохондрий из ММСК. Хотя такой транспорт, судя по нашим данным, является не очень частым явлением, его можно наблюдать не только *in vitro*, но и *in vivo* [3; 16; 158]. Донирование митохондрий, может по крайней мере, частично объяснять положительные эффекты, наблюдаемые при трансплантации ММСК в экспериментальных моделях инсульта [16], повреждении спинного мозга [275] или нейродегенеративных патологиях [204], поскольку долгосрочное нахождение аллогенных ММСК в тканях наблюдалось редко и вряд ли опосредует их терапевтический эффект.

Глава 7 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С открытием межклеточного транспорта митохондрий этот феномен стал активно изучаться исследователями как фундаментальное явление в межклеточных взаимодействиях, так и для применения в клеточной терапии. В этой связи очень привлекательной становится возможность замены дефектных митохондрий здоровыми органеллами донорских клеток при заболеваниях, ассоциированных с нарушением митохондриальных функций.

Данная работа посвящена механизмам реализации нейропротекторного действия мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток, в частности роли межклеточной передачи митохондрий.

Нами показано образование специфических межклеточных контактов ТНТ между ММСК и нейральными клетками. Обнаружено явление, являющееся следствием контакта ММСК и нейральных клеток – межклеточный транспорт цитоплазмы, в том числе митохондрий.

Показано значительное улучшение сенсомоторных функций у крыс при введении ММСК, сокультивированных с нейронами, при ишемическом инсульте. В условиях *in vitro* показано усиление транспорта митохондрий в случае митохондриальной дисфункции клеток-реципиентов, что подтверждает вклад транспорта митохондрий в терапевтические эффекты, реализуемые ММСК при ишемии головного мозга.

Продемонстрировано, что важную роль в межклеточном транспорте митохондрий и в нейропротекторных эффектах ММСК играет Rho-ГТФаза Miro1, что позволяет рассматривать ее как мишень для повышения терапевтической эффективности ММСК.

Глава 8 ВЫВОДЫ

1. Введение ММСК после экспериментального инсульта оказывает нейропротекторное действие, более выраженное при использовании ММСК, предварительно сокультивированных с нейральными клетками.
2. Между ММСК и нейральными клетками в культуре происходит передача компонентов цитозоля и митохондрий. Транспорт митохондрий всегда идет в направлении из ММСК в нейроны или астроциты, тогда как транспорт компонентов цитоплазмы может происходить и в обратном направлении.
3. Терапевтическое действие ММСК при ишемическом инсульте не обусловлено дифференцировкой ММСК в нейроны или астроциты, о чем свидетельствует отсутствие признаков нейральной дифференцировки.
4. Rho-ГТФаза Miro1 опосредует межклеточный транспорт митохондрий между ММСК и нейральными клетками. Увеличение продукции Miro1 в ММСК с помощью лентивирусной трансфекции повышает эффективность транспорта митохондрий из ММСК в нейральные клетки.
5. Введение ММСК, сверхэкспрессирующих Miro1, повышает нейропротекторный эффект при экспериментальном ишемическом инсульте, что выражается в снижении неврологического дефицита у животных по сравнению с трансплантацией нативных ММСК.
6. Повреждение митохондрий в нейральных клетках приводит к увеличению числа клеток, получивших митохондрии из ММСК, при этом в таких клетках восстанавливается способность к окислительному фосфорилированию и к пролиферации в среде без добавления пирувата и уридина.

Глава 9 БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает огромную благодарность научному руководителю ведущему научному сотруднику лаборатории структуры и функции митохондрии д.б.н Плотникову Егору Юрьевичу за интересные научные идеи и задачи, постоянное внимание и помощь, оказываемые при решении поставленных задач, за бесценные практические навыки, полученные в ходе выполнения данной работы.

Отдельную благодарность автор выражает заведующему лабораторией структуры и функции митохондрии д.б.н., проф. Зорову Дмитрию Борисовичу, а также сотрудникам лаборатории структуры и функции митохондрии к.б.н. Силачёву Денису Николаевичу, к.б.н. Певзнер Ирине Борисовне, к.б.н. Зоровой Любаве Дмитриевне, Попкову Василию Андреевичу, Данилиной Татьяне Игоревне, Савченко Елене Сергеевне, Андриановой Надежде Владимировне за оказанную помощь в методических аспектах, интерпретации полученных результатов и создание дружественной комфортной рабочей атмосферы.

Также автор благодарит Фролову Ольгу Юрьевну за помощь в оценке продукции внеклеточного лактата.

Автор бесконечно благодарен своим родным и близким, особенно мужу, родителям, сестрам и братьям, а также своим друзьям за постоянную поддержку, мотивацию, заботу и помощь в любых начинаниях.

Глава 10 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Acquistapace, A., Bru, T., Lesault, P.F., Figeac, F., Coudert, A.E., le Coz, O., Christov, C., Baudin, X., Auber, F., Yiou, R., Dubois-Rande, J.L., Rodriguez, A.M. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer // *Stem Cells*. 2011. V. 29. № 5. P.812-24,
2. Agani, F.H., Pichiule, P., Chavez, J.C., LaManna, J.C. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia // *J Biol Chem*. 2000. V. 275. № 46. P.35863-7,
3. Ahmad, T., Mukherjee, S., Pattnaik, B., Kumar, M., Singh, S., Kumar, M., Rehman, R., Tiwari, B.K., Jha, K.A., Barhanpurkar, A.P., Wani, M.R., Roy, S.S., Mabalirajan, U., Ghosh, B., Agrawal, A. Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy // *EMBO J*. 2014. V. 33 . № 9. P.994-1010,
4. Ahmad, T., Mukherjee, S., Pattnaik, B., Kumar, M., Singh, S., Kumar, M., Rehman, R., Tiwari, B.K., Jha, K.A., Barhanpurkar, A.P., Wani, M.R., Roy, S.S., Mabalirajan, U., Ghosh, B., Agrawal, A. Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy // *EMBO J*. 2014. V. 33 . № 9. P.994-1010,
5. Allen, K.L., Almeida, A., Bates, T.E., Clark, J.B. Changes of respiratory chain activity in mitochondrial and synaptosomal fractions isolated from the gerbil brain after graded ischaemia // *J Neurochem*. 1995. V. 64. № 5. P.2222-9,
6. Allen, K.L., Busza, A.L., Proctor, E., King, M.D., Williams, S.R., Crockard, H.A., Gadian, D.G. Controllable graded cerebral ischaemia in the gerbil: studies of cerebral blood flow and energy metabolism by hydrogen clearance and ³¹P NMR spectroscopy // *NMR Biomed*. 1993. V. 6. № 3. P.181-6,
7. Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., Tramontin, A.D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells // *Nat Rev Neurosci*. 2001. V. 2. № 4. P.287-93,
8. Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J., Alvarez-Buylla, A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes // *Nature*. 2003. V. 425. № 6961. P.968-73,
9. Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Robin, M.A., Avadhani, N.G. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells // *J Cell Biol* . 2003. V. 161. № 1. P.41-54,
10. Andres, R.H., Horie, N., Slikker, W., Keren-Gill, H., Zhan, K., Sun, G., Manley, N.C., Pereira, M.P., Sheikh, L.A., McMillan, E.L., Schaar, B.T., Svendsen, C.N., Bliss, T.M., Steinberg, G.K. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain // *Brain*. 2011. V. 134. № Pt 6. P.1777-89,

11. Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., Nicotera, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function // *Neuron*. 1995. V. 15. № 4. P.961-73,
12. Arduini, A., Mezzetti, A., Porreca, E., Lapenna, D., DeJulia, J., Marzio, L., Polidoro, G., Cuccurullo, F. Effect of ischemia and reperfusion on antioxidant enzymes and mitochondrial inner membrane proteins in perfused rat heart // *Biochim Biophys Acta*. 1988. V. 970. № 2. P.113-21,
13. Armeni, T., Ghiselli, R., Balercia, G., Goffi, L., Jassem, W., Saba, V., Principato, G. Glutathione and ultrastructural changes in inflow occlusion of rat liver // *J Surg Res*. 2000. V. 88. № 2. P.207-14,
14. Arnhold, S., Klein, H., Klinz, F.J., Absenger, Y., Schmidt, A., Schinkothe, T., Brixius, K., Kozlowski, J., Desai, B., Bloch, W., Addicks, K. Human bone marrow stroma cells display certain neural characteristics and integrate in the subventricular compartment after injection into the liquor system // *Eur J Cell Biol*. 2006. V. 85. № 6. P.551-65,
15. Assis, A.C., Carvalho, J.L., Jacoby, B.A., Ferreira, R.L., Castanheira, P., Diniz, S.O., Cardoso, V.N., Goes, A.M., Ferreira, A.J. Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart // *Cell Transplant*. 2010. V. 19. № 2. P.219-30,
16. Babenko, V.A., Silachev, D.N., Zorova, L.D., Pevzner, I.B., Khutornenko, A.A., Plotnikov, E.Y., Sukhikh, G.T., Zorov, D.B. Improving the Post-Stroke Therapeutic Potency of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells by Cocultivation With Cortical Neurons: The Role of Crosstalk Between Cells // *Stem Cells Transl Med*. 2015. V. 4. № 9. P.1011-20,
17. Baek, W., Kim, Y.S., Koh, S.H., Lim, S.W., Kim, H.Y., Yi, H.J., Kim, H. Stem cell transplantation into the intraventricular space via an Ommaya reservoir in a patient with amyotrophic lateral sclerosis // *J Neurosurg Sci*. 2012. V. 56. № 3. P.261-3,
18. Baker, J.E., Kalyanaraman, B. Ischemia-induced changes in myocardial paramagnetic metabolites: implications for intracellular oxy-radical generation // *FEBS Lett*. 1989. V. 244. № 2. P.311-4,
19. Banerjee, S., Bentley, P., Hamady, M., Marley, S., Davis, J., Shlebak, A., Nicholls, J., Williamson, D.A., Jensen, S.L., Gordon, M., Habib, N., Chataway, J. Intra-Arterial Immunoselected CD34+ Stem Cells for Acute Ischemic Stroke // *Stem Cells Transl Med*. 2014. V. 3. № 11. P.1322-30,
20. Bang, O.Y., Lee, J.S., Lee, P.H., Lee, G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients // *Ann Neurol*. 2005. V. 57. № 6. P.874-82,
21. Barbosa da Fonseca, L.M., Gutfilen, B., Rosado de Castro, P.H., Battistella, V., Goldenberg, R.C., Kasai-Brunswick, T., Chagas, C.L., Wajnberg, E., Maiolino, A., Salles Xavier, S., Andre, C., Mendez-Otero, R., de Freitas, G.R. Migration and homing of bone-marrow mononuclear cells in chronic ischemic stroke after intra-arterial injection // *Exp Neurol*. 2010. V. 221. № 1. P.122-8,
22. Barlow, S., Brooke, G., Chatterjee, K., Price, G., Pelekanos, R., Rossetti, T., Doody, M., Venter, D., Pain, S., Gilshenan, K., Atkinson, K. Comparison of human placenta-

and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells // *Stem Cells Dev.* 2008. V. 17. № 6. P.1095-107,

23. Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., Hoffman, R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo // *Exp Hematol.* 2002. V. 30. № 1. P.42-8,
24. Barzilay, R., Ben-Zur, T., Bulvik, S., Melamed, E., Offen, D. Lentiviral delivery of LMX1a enhances dopaminergic phenotype in differentiated human bone marrow mesenchymal stem cells // *Stem Cells Dev.* 2009. V. 18. № 4. P.591-601,
25. Barzilay, R., Kan, I., Ben-Zur, T., Bulvik, S., Melamed, E., Offen, D. Induction of human mesenchymal stem cells into dopamine-producing cells with different differentiation protocols // *Stem Cells Dev.* 2008. V. 17. № 3. P.547-54,
26. Bates, D.O., Hillman, N.J., Williams, B., Neal, C.R., Pocock, T.M. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors // *J Anat.* 2002. V. 200. № 6. P.581-97,
27. Behrstock, S., Ebert, A., McHugh, J., Vosberg, S., Moore, J., Schneider, B., Capowski, E., Hei, D., Kordower, J., Aebischer, P., Svendsen, C.N. Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to parkinsonian rodents and aged primates // *Gene Ther.* 2006. V. 13. № 5. P.379-88,
28. Ben-Hur, T., Idelson, M., Khaner, H., Pera, M., Reinhartz, E., Itzik, A., Reubinoff, B.E. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats // *Stem Cells.* 2004. V. 22. № 7. P.1246-55,
29. Bender, A., Krishnan, K.J., Morris, C.M., Taylor, G.A., Reeve, A.K., Perry, R.H., Jaros, E., Hersheson, J.S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R.W., Turnbull, D.M. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease // *Nat Genet.* 2006. V. 38. № 5. P.515-7,
30. Berridge, M.V., McConnell, M.J., Grasso, C., Bajzikova, M., Kovarova, J., Neuzil, J. Horizontal transfer of mitochondria between mammalian cells: beyond co-culture approaches // *Curr Opin Genet Dev.* 2016. V. 38. P.75-82,
31. Berridge, M.V., Neuzil, J. The mobility of mitochondria: Intercellular trafficking in health and disease // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017. V. 44 Suppl 1. P.15-20,
32. Bertani, N., Malatesta, P., Volpi, G., Sonogo, P., Perris, R. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray // *J Cell Sci.* 2005. V. 118. № Pt 17. P.3925-36,
33. Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., Greenamyre, J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease // *Nat Neurosci.* 2000. V. 3. № 12. P.1301-6,
34. Bhasin, A., Srivastava, M.V., Kumaran, S.S., Mohanty, S., Bhatia, R., Bose, S., Gaikwad, S., Garg, A., Airan, B. Autologous mesenchymal stem cells in chronic stroke // *Cerebrovasc Dis Extra.* 2011. V. 1. № 1. P.93-104,
35. Bhasin, A., Srivastava, M.V., Mohanty, S., Bhatia, R., Kumaran, S.S., Bose, S. Stem cell

therapy: a clinical trial of stroke // Clin Neurol Neurosurg. 2013. V. 115. № 7. P.1003-8,

36. Bjorklund, L.M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y., McNaught, K.S., Brownell, A.L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.S., Isacson, O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model // Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. V. 99. № 4. P.2344-9,
37. Blanquer, M., Moraleda, J.M., Iniesta, F., Gomez-Espuch, J., Meca-Lallana, J., Villaverde, R., Perez-Espejo, M.A., Ruiz-Lopez, F.J., Garcia Santos, J.M., Bleda, P., Izura, V., Saez, M., De Mingo, P., Vivancos, L., Carles, R., Jimenez, J., Hernandez, J., Guardiola, J., Del Rio, S.T., Antunez, C., De la Rosa, P., Majado, M.J., Sanchez-Salinas, A., Lopez, J., Martinez-Lage, J.F., Martinez, S. Neurotrophic bone marrow cellular nests prevent spinal motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis patients: a pilot safety study // Stem Cells. 2012. V. 30. № 6. P.1277-85,
38. Boltze, J., Schmidt, U.R., Reich, D.M., Kranz, A., Reymann, K.G., Strassburger, M., Lobsien, D., Wagner, D.C., Forschler, A., Schabitz, W.R. Determination of the therapeutic time window for human umbilical cord blood mononuclear cell transplantation following experimental stroke in rats // Cell Transplant. 2012. V. 21. № 6. P.1199-211,
39. Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J.W., Vanacore, N., van Swieten, J.C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C.M., Oostra, B.A., Heutink, P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism // Science. 2003. V. 299. № 5604. P.256-9,
40. Bonilla, S., Silva, A., Valdes, L., Geijo, E., Garcia-Verdugo, J.M., Martinez, S. Functional neural stem cells derived from adult bone marrow // Neuroscience. 2005. V. 133. № 1. P.85-95,
41. Borlongan, C.V., Evans, A., Yu, G., Hess, D.C. Limitations of intravenous human bone marrow CD133+ cell grafts in stroke rats // Brain Res. 2005. V. 1048. № 1-2. P.116-22,
42. Borlongan, C.V., Glover, L.E., Tajiri, N., Kaneko, Y., Freeman, T.B. The great migration of bone marrow-derived stem cells toward the ischemic brain: therapeutic implications for stroke and other neurological disorders // Prog Neurobiol. 2011. V. 95. № 2. P.213-28,
43. Borlongan, C.V., Kaneko, Y., Maki, M., Yu, S.J., Ali, M., Allickson, J.G., Sanberg, C.D., Kuzmin-Nichols, N., Sanberg, P.R. Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke // Stem Cells Dev. 2010. V. 19. № 4. P.439-52,
44. Borlongan, C.V., Tajima, Y., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Sanberg, P.R. Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats // Exp Neurol. 1998. V. 149. № 2. P.310-21,
45. Brundin, P., Pogarell, O., Hagell, P., Piccini, P., Widner, H., Schrag, A., Kupsch, A., Crabb,

- L., Odin, P., Gustavii, B., Bjorklund, A., Brooks, D.J., Marsden, C.D., Oertel, W.H., Quinn, N.P., Rehnrcrona, S., Lindvall, O. Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazaroids in Parkinson's disease // *Brain*. 2000. V. 123 (Pt 7). P.1380-90,
46. Buckner, J.H. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases // *Nat Rev Immunol*. 2010. V. 10. № 12. P.849-59,
 47. Bukoreshtliev, N.V., Wang, X., Hodneland, E., Gurke, S., Barroso, J.F., Gerdes, H.H. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells // *FEBS Lett*. 2009. V. 583. № 9. P.1481-8,
 48. Bulte, J.W., Zhang, S., van Gelderen, P., Herynek, V., Jordan, E.K., Duncan, I.D., Frank, J.A. Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. V. 96. № 26. P.15256-61,
 49. Busciglio, J., Pelsman, A., Wong, C., Pigino, G., Yuan, M., Mori, H., Yankner, B.A. Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome // *Neuron*. 2002. V. 33. № 5. P.677-88,
 50. Canet-Aviles, R.M., Wilson, M.A., Miller, D.W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M.J., Ringe, D., Petsko, G.A., Cookson, M.R. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. V. 101. № 24. P.9103-8,
 51. Caraceni, P., Ryu, H.S., van Thiel, D.H., Borle, A.B. Source of oxygen free radicals produced by rat hepatocytes during postanoxic reoxygenation // *Biochim Biophys Acta*. 1995. V. 1268. № 3. P.249-54,
 52. Carmeliet, P., Collen, D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease // *Am J Physiol*. 1997. V. 273. № 5 Pt 2. P.H2091-104,
 53. Casley, C.S., Canevari, L., Land, J.M., Clark, J.B., Sharpe, M.A. Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities // *J Neurochem*. 2002. V. 80. № 1. P.91-100,
 54. Ceradini, D.J., Gurtner, G.C. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue // *Trends Cardiovasc Med*. 2005. V. 15. № 2. P.57-63,
 55. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing // *Stem Cells*. 2007. V. 25. № 11. P.2739-49,
 56. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs // *Physiol Rev*. 1979. V. 59. № 3. P.527-605,
 57. Chang, Y.C., Shyu, W.C., Lin, S.Z., Li, H. Regenerative therapy for stroke // *Cell Transplant*. 2007. V. 16. № 2. P.171-81,
 58. Chen, A., Xiong, L.J., Tong, Y., Mao, M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury // *Biomed Rep*. 2013. V. 1. № 2. P.167-176,

59. Chen, C.J., Ou, Y.C., Liao, S.L., Chen, W.Y., Chen, S.Y., Wu, C.W., Wang, C.C., Wang, W.Y., Huang, Y.S., Hsu, S.H. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair // *Exp Neurol*. 2007. V. 204. № 1. P.443-53,
60. Chen, J., Li, Y., Wang, L., Zhang, Z., Lu, D., Lu, M., Chopp, M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats // *Stroke*. 2001. V. 32. № 4. P.1005-11,
61. Chen, J., Shehadah, A., Pal, A., Zacharek, A., Cui, X., Cui, Y., Roberts, C., Lu, M., Zeitlin, A., Hariri, R., Chopp, M. Neuroprotective effect of human placenta-derived cell treatment of stroke in rats // *Cell Transplant*. 2013. V. 22. № 5. P.871-9,
62. Chen, J., Zhang, Z.G., Li, Y., Wang, L., Xu, Y.X., Gautam, S.C., Lu, M., Zhu, Z., Chopp, M. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats // *Circ Res*. 2003. V. 92. № 6. P.692-9,
63. Chen, J.J., Yu, B.P. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products // *Free Radic Biol Med*. 1994. V. 17. № 5. P.411-8,
64. Chen, Q., Long, Y., Yuan, X., Zou, L., Sun, J., Chen, S., Perez-Polo, J.R., Yang, K. Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors // *J Neurosci Res*. 2005. V. 80. № 5. P.611-9,
65. Chen, Z.Z., Jiang, X.D., Zhang, L.L., Shang, J.H., Du, M.X., Xu, G., Xu, R.X. Beneficial effect of autologous transplantation of bone marrow stromal cells and endothelial progenitor cells on cerebral ischemia in rabbits // *Neurosci Lett*. 2008. V. 445. № 1. P.36-41,
66. Chinnery, H.R., Pearlman, E., McMenamin, P.G. Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea // *J Immunol*. 2008. V. 180. № 9. P.5779-83,
67. Cho, S.R., Suh, H., Yu, J.H., Kim, H.H., Seo, J.H., Seo, C.H. Astroglial Activation by an Enriched Environment after Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Enhances Angiogenesis after Hypoxic-Ischemic Brain Injury // *Int J Mol Sci*. 2016. V. 17. № 9.
68. Cho, Y.M., Kim, J.H., Kim, M., Park, S.J., Koh, S.H., Ahn, H.S., Kang, G.H., Lee, J.B., Park, K.S., Lee, H.K. Mesenchymal stem cells transfer mitochondria to the cells with virtually no mitochondrial function but not with pathogenic mtDNA mutations // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 3. P.e32778
69. Choi-Lundberg, D.L., Lin, Q., Chang, Y.N., Chiang, Y.L., Hay, C.M., Mohajeri, H., Davidson, B.L., Bohn, M.C. Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy // *Science*. 1997. V. 275. № 5301. P.838-41,
70. Choong, P.F., Mok, P.L., Cheong, S.K., Leong, C.F., Then, K.Y. Generating neuron-like cells from BM-derived mesenchymal stromal cells in vitro // *Cytotherapy*. 2007. V. 9. № 2. P.170-83,
71. Chung, K.K., Thomas, B., Li, X., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Marsh, L., Dawson, V.L.,

- Dawson, T.M. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function // *Science*. 2004. V. 304. № 5675. P.1328-31,
72. Costantini, P., Chernyak, B.V., Petronilli, V., Bernardi, P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites // *J Biol Chem*. 1996. V. 271. № 12. P.6746-51,
 73. Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D., Werb, Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis // *Cell*. 2000. V. 103. № 3. P.481-90,
 74. Cova, L., Armentero, M.T., Zennaro, E., Calzarossa, C., Bossolasco, P., Busca, G., Lambertenghi Delilieri, G., Polli, E., Nappi, G., Silani, V., Blandini, F. Multiple neurogenic and neurorescue effects of human mesenchymal stem cell after transplantation in an experimental model of Parkinson's disease // *Brain Res*. 2010. V. 1311. P.12-27,
 75. Crigler, L., Robey, R.C., Asawachaicharn, A., Gaupp, D., Phinney, D.G. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis // *Exp Neurol*. 2006. V. 198. № 1. P.54-64,
 76. Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // *Biochem J*. 1999. V. 341 (Pt 2). P.233-49,
 77. Crouch, P.J., Blake, R., Duce, J.A., Ciccotosto, G.D., Li, Q.X., Barnham, K.J., Curtain, C.C., Cherny, R.A., Cappai, R., Dyrks, T., Masters, C.L., Trounce, I.A. Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42 // *J Neurosci*. 2005. V. 25. № 3. P.672-9,
 78. Dalton, T.P., Shertzer, H.G., Puga, A. Regulation of gene expression by reactive oxygen // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999. V. 39. P.67-101,
 79. Darsalia, V., Kallur, T., Kokaia, Z. Survival, migration and neuronal differentiation of human fetal striatal and cortical neural stem cells grafted in stroke-damaged rat striatum // *Eur J Neurosci*. 2007. V. 26. № 3. P.605-14,
 80. Das, D.K., George, A., Liu, X.K., Rao, P.S. Detection of hydroxyl radical in the mitochondria of ischemic-reperfused myocardium by trapping with salicylate // *Biochem Biophys Res Commun*. 1989. V. 165. № 3. P.1004-9,
 81. De Becker, A., Van Hummelen, P., Bakkus, M., Vande Broek, I., De Wever, J., De Waele, M., Van Riet, I. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 // *Haematologica*. 2007. V. 92. № 4. P.440-9,
 82. De Ryck, M., Van Reempts, J., Borgers, M., Wauquier, A., Janssen, P.A. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats // *Stroke*. 1989. V. 20. № 10. P.1383-90,
 83. De Ugarte, D.A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., Benhaim, P., Hedrick, M.H., Fraser, J.K. Differential expression of stem cell mobilization-

associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow // Immunol Lett. 2003. V. 89. № 2-3. P.267-70,

84. Deng, J., Petersen, B.E., Steindler, D.A., Jorgensen, M.L., Laywell, E.D. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation // Stem Cells. 2006. V. 24. № 4. P.1054-64,
85. Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I., Prockop, D.J. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP // Biochem Biophys Res Commun. 2001. V. 282. № 1. P.148-52,
86. Detante, O., Moisan, A., Dimastromatteo, J., Richard, M.J., Riou, L., Grillon, E., Barbier, E., Desruet, M.D., De Fraipont, F., Segebarth, C., Jaillard, A., Hommel, M., Ghezzi, C., Remy, C. Intravenous administration of 99mTc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells after stroke: in vivo imaging and biodistribution // Cell Transplant. 2009. V. 18. № 12. P.1369-79,
87. Devine, S.M., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A., Hoffman, R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates // Blood. 2003. V. 101. № 8. P.2999-3001,
88. Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H., Mimura, T., Kitada, M., Suzuki, Y., Ide, C. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation // J Clin Invest. 2004. V. 113. № 12. P.1701-10,
89. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., Gianni, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli // Blood. 2002. V. 99. № 10. P.3838-43,
90. Dirnagl, U. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond // Ann N Y Acad Sci. 2012. V. 1268. P.21-5,
91. Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view // Trends Neurosci. 1999. V. 22. № 9. P.391-7,
92. Doeppner, T.R., Herz, J., Gorgens, A., Schlechter, J., Ludwig, A.K., Radtke, S., de Miroschedji, K., Horn, P.A., Giebel, B., Hermann, D.M. Extracellular Vesicles Improve Post-Stroke Neuroregeneration and Prevent Postischemic Immunosuppression // Stem Cells Transl Med. 2015. V. 4. № 10. P.1131-43,
93. Doeppner, T.R., Herz, J., Gorgens, A., Schlechter, J., Ludwig, A.K., Radtke, S., de Miroschedji, K., Horn, P.A., Giebel, B., Hermann, D.M. Extracellular Vesicles Improve Post-Stroke Neuroregeneration and Prevent Postischemic Immunosuppression // Stem Cells Transl Med. 2015. V. 4. № 10. P.1131-43,
94. Domhan, S., Ma, L., Tai, A., Anaya, Z., Beheshti, A., Zeier, M., Hlatky, L., Abdollahi, A. Intercellular communication by exchange of cytoplasmic material via tunneling nano-tube like structures in primary human renal epithelial cells // PLoS One. 2011. V. 6. № 6. P.e21283

95. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. 2006. V. 8. № 4. P.315-7,
96. Dong, F., Harvey, J., Finan, A., Weber, K., Agarwal, U., Penn, M.S. Myocardial CXCR4 expression is required for mesenchymal stem cell mediated repair following acute myocardial infarction // *Circulation*. 2012. V. 126. № 3. P.314-24,
97. Dong, L.F., Kovarova, J., Bajzikova, M., Bezawork-Geleta, A., Svec, D., Endaya, B., Sachaphibulkij, K., Coelho, A.R., Sebkova, N., Ruzickova, A., Tan, A.S., Kluckova, K., Judasova, K., Zamecnikova, K., Rychtarcikova, Z., Gopalan, V., Andera, L., Sobol, M., Yan, B., Pattnaik, B., Bhatraju, N., Truksa, J., Stopka, P., Hozak, P., Lam, A.K., Sedlacek, R., Oliveira, P.J., Kubista, M., Agrawal, A., Dvorakova-Hortova, K., Rohlena, J., Berridge, M.V., Neuzil, J. Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells // *Elife*. 2017. V. 6.
98. Dore-Duffy, P., Owen, C., Balabanov, R., Murphy, S., Beaumont, T., Rafols, J.A. Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury // *Microvasc Res*. 2000. V. 60. № 1. P.55-69,
99. Duisters, R.F., Tijssen, A.J., Schroen, B., Leenders, J.J., Lentink, V., van der Made, I., Herias, V., van Leeuwen, R.E., Schellings, M.W., Barenbrug, P., Maessen, J.G., Heymans, S., Pinto, Y.M., Creemers, E.E. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling // *Circ Res*. 2009. V. 104. № 2. P.170-8, 6p following 178,
100. Duran, J.M., Valderrama, F., Castel, S., Magdalena, J., Tomas, M., Hosoya, H., Renau-Piqueras, J., Malhotra, V., Egea, G. Myosin motors and not actin comets are mediators of the actin-based Golgi-to-endoplasmic reticulum protein transport // *Mol Biol Cell*. 2003. V. 14. № 2. P.445-59,
101. Durymanov, M.O., Rosenkranz, A.A., Sobolev, A.S. Current Approaches for Improving Intratumoral Accumulation and Distribution of Nanomedicines // *Theranostics*. 2015. V. 5. № 9. P.1007-20,
102. Eckert, M.A., Vu, Q., Xie, K., Yu, J., Liao, W., Cramer, S.C., Zhao, W. Evidence for high translational potential of mesenchymal stromal cell therapy to improve recovery from ischemic stroke // *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013. V. 33. № 9. P.1322-34,
103. Eisenberg, L.M., Eisenberg, C.A. Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation // *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003. V. 69. № 3. P.209-18,
104. Elson, J.L., Herrnstadt, C., Preston, G., Thal, L., Morris, C.M., Edwardson, J.A., Beal, M.F., Turnbull, D.M., Howell, N. Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of Alzheimer's disease? // *Hum Genet*. 2006. V. 119. № 3. P.241-54,
105. Esposito, B.P., Epsztejn, S., Breuer, W., Cabantchik, Z.I. A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids // *Anal Biochem*. 2002. V. 304. № 1. P.1-18,
106. Esteve, J.M., Mompo, J., Garcia de la Asuncion, J., Sastre, J., Asensi, M., Boix, J., Vina,

- J.R., Vina, J., Pallardo, F.V. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro // *FASEB J.* 1999. V. 13. № 9. P.1055-64,
107. Evans, M.J., Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature.* 1981. V. 292. № 5819. P.154-6,
 108. Fadini, G.P., Agostini, C., Avogaro, A. Endothelial progenitor cells in cerebrovascular disease // *Stroke.* 2005. V. 36. № 6. P.1112-3; author reply 1113,
 109. Feigin, V.L., Forouzanfar, M.H., Krishnamurthi, R., Mensah, G.A., Connor, M., Bennett, D.A., Moran, A.E., Sacco, R.L., Anderson, L., Truelsen, T., O'Donnell, M., Venketasubramanian, N., Barker-Collo, S., Lawes, C.M., Wang, W., Shinohara, Y., Witt, E., Ezzati, M., Naghavi, M., Murray, C. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010 // *Lancet.* 2014. V. 383. № 9913. P.245-54,
Notes: CORPORATE NAME: Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2010 (GBD 2010) and the GBD Stroke Experts Group
 110. Fischer, U.M., Harting, M.T., Jimenez, F., Monzon-Posadas, W.O., Xue, H., Savitz, S.I., Laine, G.A., Cox, C.S. Jr Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect // *Stem Cells Dev.* 2009. V. 18. № 5. P.683-92,
 111. Fornai, F., Schluter, O.M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C.L., Pontarelli, F., Battaglia, G., Pellegrini, A., Nicoletti, F., Ruggieri, S., Paparelli, A., Sudhof, T.C. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. V. 102. № 9. P.3413-8,
 112. Forostyak, S., Homola, A., Turnovcova, K., Svitil, P., Jendelova, P., Sykova, E. Intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells protects the structure of altered perineuronal nets in SOD1 rats and amends the course of ALS // *Stem Cells.* 2014. V. 32. № 12. P.3163-72,
 113. Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 // *Mol Cell Biol.* 1996. V. 16. № 9. P.4604-13,
 114. Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 // *Mol Cell Biol.* 1996. V. 16. № 9. P.4604-13,
 115. Fransson, A.B., Xu, Y., Leijondahl, K., Backvall, J.E. Enzymatic resolution, desymmetrization, and dynamic kinetic asymmetric transformation of 1,3-cycloalkanediols // *J Org Chem.* 2006. V. 71. № 17. P.6309-16,
 116. Fransson, A.B., Xu, Y., Leijondahl, K., Backvall, J.E. Enzymatic resolution, desymmetrization, and dynamic kinetic asymmetric transformation of 1,3-cycloalkanediols // *J Org Chem.* 2006. V. 71. № 17. P.6309-16,
 117. Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai, W.Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J.Q., Eidelberg, D., Fahn, S. Transplantation

- of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease // *N Engl J Med*. 2001. V. 344. № 10. P.710-9,
 Notes: GENERAL NOTE: KIE: Freed, Curt R; Greene, Paul E; Breeze, Robert E; Tsai, Wei-Yann; DuMouchel, William; Kao, Richard; Dillon, Sandra; Winfield, Howard; Culver, Sharon; Trojanowski, John Q; Eidelberg, David; Fahn, Stanley
118. Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Mari, M., Morales, A., Fernandez-Checa, J.C. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione // *J Biol Chem*. 1997. V. 272. № 17. P.11369-77,
 119. Ge, J., Guo, L., Wang, S., Zhang, Y., Cai, T., Zhao, R.C., Wu, Y. The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and stroke // *Stem Cell Rev*. 2014. V. 10. № 2. P.295-303,
 120. Gerber, H.P., Dixit, V., Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells // *J Biol Chem*. 1998. V. 273. № 21. P.13313-6,
 121. Gerdes, H.H., Rustom, A., Wang, X. Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development // *Mech Dev*. 2013. V. 130. № 6-8. P.381-7,
 122. Gerdes, H.H., Rustom, A., Wang, X. Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development // *Mech Dev*. 2013. V. 130. № 6-8. P.381-7,
 123. Gharaibeh, B., Lavasani, M., Cummins, J.H., Huard, J. Terminal differentiation is not a major determinant for the success of stem cell therapy - cross-talk between muscle-derived stem cells and host cells // *Stem Cell Res Ther*. 2011. V. 2. № 4. P.31
 124. Gibson, G.E., Sheu, K.F., Blass, J.P., Baker, A., Carlson, K.C., Harding, B., Perrino, P. Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease // *Arch Neurol* . 1988. V. 45 . № 8. P.836-40,
 125. Glater, E.E., Megeath, L.J., Stowers, R.S., Schwarz, T.L. Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent // *J Cell Biol*. 2006. V. 173. № 4. P.545-57,
 126. Gneocchi, M., He, H., Liang, O.D., Melo, L.G., Morello, F., Mu, H., Noiseux, N., Zhang, L., Pratt, R.E., Ingwall, J.S., Dzau, V.J. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells // *Nat Med*. 2005. V. 11. № 4. P.367-8,
 127. Gneocchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O.D., Zhang, L., Morello, F., Mu, H., Melo, L.G., Pratt, R.E., Ingwall, J.S., Dzau, V.J. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement // *FASEB J*. 2006. V. 20. № 6. P.661-9,
 128. Gonzalez-Flecha, B., Cutrin, J.C., Boveris, A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion // *J Clin Invest*. 1993. V. 91. № 2. P.456-64,
 129. Green, D.R., Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis // *Science*. 1998. V. 281. № 5381.

130. Guan, J.L., Hynes, R.O. Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1 // *Cell*. 1990. V. 60. № 1. P.53-61,
131. Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., Agnati, L.F. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA // *J Neural Transm (Vienna)*. 2010. V. 117. № 1. P.1-4,
132. Guo, L., Yin, F., Meng, H.Q., Ling, L., Hu-He, T.N., Li, P., Zhang, C.X., Yu, S., Duan, D.S., Fan, H.X. Differentiation of mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro // *Biomed Environ Sci*. 2005. V. 18. № 1. P.36-42,
133. Gurke, S., Barroso, J.F., Gerdes, H.H. The art of cellular communication: tunneling nanotubes bridge the divide // *Histochem Cell Biol*. 2008. V. 129. № 5. P.539-50,
134. Gurke, S., Barroso, J.F., Hodneland, E., Bukoreshtliev, N.V., Schlicker, O., Gerdes, H.H. Tunneling nanotube (TNT)-like structures facilitate a constitutive, actomyosin-dependent exchange of endocytic organelles between normal rat kidney cells // *Exp Cell Res*. 2008. V. 314. № 20. P.3669-83,
135. Gurke, S., Barroso, J.F., Hodneland, E., Bukoreshtliev, N.V., Schlicker, O., Gerdes, H.H. Tunneling nanotube (TNT)-like structures facilitate a constitutive, actomyosin-dependent exchange of endocytic organelles between normal rat kidney cells // *Exp Cell Res*. 2008. V. 314. № 20. P.3669-83,
136. Gutierrez-Fernandez, M., Rodriguez-Frutos, B., Alvarez-Grech, J., Vallejo-Cremades, M.T., Exposito-Alcaide, M., Merino, J., Roda, J.M., Diez-Tejedor, E. Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats // *Neuroscience*. 2011. V. 175. P.394-405,
137. Gutierrez-Fernandez, M., Rodriguez-Frutos, B., Ramos-Cejudo, J., Teresa Vallejo-Cremades, M., Fuentes, B., Cerdan, S., Diez-Tejedor, E. Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke // *Stem Cell Res Ther*. 2013. V. 4. № 1. P.11
138. Guzman, R., Choi, R., Gera, A., De Los Angeles, A., Andres, R.H., Steinberg, G.K. Intravascular cell replacement therapy for stroke // *Neurosurg Focus*. 2008. V. 24. № 3-4. P.E15
139. Gyorgy, B., Hung, M.E., Breakefield, X.O., Leonard, J.N. Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015. V. 55. P.439-464,
140. Hassiotou, F., Beltran, A., Chetwynd, E., Stuebe, A.M., Twigger, A.J., Metzger, P., Trengove, N., Lai, C.T., Filgueira, L., Blancafort, P., Hartmann, P.E. Breastmilk is a novel source of stem cells with multilineage differentiation potential // *Stem Cells*. 2012. V. 30. № 10. P.2164-74,
141. Hauser, R.A., Freeman, T.B., Snow, B.J., Nauert, M., Gauger, L., Kordower, J.H., Olanow, C.W. Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson

- disease // Arch Neurol. 1999. V. 56. № 2. P.179-87,
142. Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., Ji, X., Lo, E.H. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke // Nature. 2016. V. 535. № 7613. P.551-5,
 143. He, K., Shi, X., Zhang, X., Dang, S., Ma, X., Liu, F., Xu, M., Lv, Z., Han, D., Fang, X., Zhang, Y. Long-distance intercellular connectivity between cardiomyocytes and cardiofibroblasts mediated by membrane nanotubes // Cardiovasc Res. 2011. V. 92. № 1. P.39-47,
 144. He, K., Shi, X., Zhang, X., Dang, S., Ma, X., Liu, F., Xu, M., Lv, Z., Han, D., Fang, X., Zhang, Y. Long-distance intercellular connectivity between cardiomyocytes and cardiofibroblasts mediated by membrane nanotubes // Cardiovasc Res. 2011. V. 92. № 1. P.39-47,
 145. Henke, W., Jung, K. Ischemia decreases the content of the adenine nucleotide translocator in mitochondria of rat kidney // Biochim Biophys Acta. 1991. V. 1056. № 1. P.71-5,
 146. Hermann, D.M., Chopp, M. Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery: therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation // Lancet Neurol. 2012. V. 11. № 4. P.369-80,
 147. Herrmann, C., Wray, J., Travers, F., Barman, T. Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor // Biochemistry. 1992. V. 31. № 48. P.12227-32,
 148. Herz, J., Sabellek, P., Lane, T.E., Gunzer, M., Hermann, D.M., Doeppner, T.R. Role of Neutrophils in Exacerbation of Brain Injury After Focal Cerebral Ischemia in Hyperlipidemic Mice // Stroke. 2015. V. 46. № 10. P.2916-25,
 149. Honmou, O., Houkin, K., Matsunaga, T., Niitsu, Y., Ishiai, S., Onodera, R., Waxman, S.G., Kocsis, J.D. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke // Brain. 2011. V. 134. № Pt 6. P.1790-807,
 150. Honmou, O., Onodera, R., Sasaki, M., Waxman, S.G., Kocsis, J.D. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke // Trends Mol Med. 2012. V. 18. № 5. P.292-7,
 151. Hung, S.C., Cheng, H., Pan, C.Y., Tsai, M.J., Kao, L.S., Ma, H.L. In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells // Stem Cells. 2002. V. 20. № 6. P.522-9,
 152. Iihoshi, S., Honmou, O., Houkin, K., Hashi, K., Kocsis, J.D. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats // Brain Res. 2004. V. 1007. № 1-2. P.1-9,
 153. Ikegame, Y., Yamashita, K., Hayashi, S., Mizuno, H., Tawada, M., You, F., Yamada, K., Tanaka, Y., Egashira, Y., Nakashima, S., Yoshimura, S., Iwama, T. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy // Cytotherapy. 2011. V. 13. № 6. P.675-85,
 154. Ilic, D., Almeida, E.A., Schlaepfer, D.D., Dazin, P., Aizawa, S., Damsky, C.H. Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis // J Cell Biol. 1998. V. 143. № 2. P.547-60,

155. Imhof, B.A., Aurrand-Lions, M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes // *Nat Rev Immunol.* 2004. V. 4. № 6. P.432-44,
156. Ip, J.E., Wu, Y., Huang, J., Zhang, L., Pratt, R.E., Dzau, V.J. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment // *Mol Biol Cell.* 2007. V. 18. № 8. P.2873-82,
157. Ishikawa, H., Tajiri, N., Shinozuka, K., Vasconcellos, J., Kaneko, Y., Lee, H.J., Mimura, O., Dezawa, M., Kim, S.U., Borlongan, C.V. Vasculogenesis in experimental stroke after human cerebral endothelial cell transplantation // *Stroke.* 2013. V. 44. № 12. P.3473-81,
158. Islam, M.N., Das, S.R., Emin, M.T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., Rowlands, D.J., Quadri, S.K., Bhattacharya, S., Bhattacharya, J. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury // *Nat Med.* 2012. V. 18. № 5. P.759-65,
159. Islam, M.N., Das, S.R., Emin, M.T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., Rowlands, D.J., Quadri, S.K., Bhattacharya, S., Bhattacharya, J. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury // *Nat Med.* 2012. V. 18. № 5. P.759-65,
160. Jacobsen, K., Kravitz, J., Kincade, P.W., Osmond, D.G. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice // *Blood.* 1996. V. 87. № 1. P.73-82,
161. Jaeschke, H., Mitchell, J.R. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury // *Biochem Biophys Res Commun.* 1989. V. 160. № 1. P.140-7,
162. Jedd, G., Chua, N.H. Visualization of peroxisomes in living plant cells reveals acto-myosin-dependent cytoplasmic streaming and peroxisome budding // *Plant Cell Physiol.* 2002. V. 43. № 4. P.384-92,
163. Jiang, W., Ma, A., Wang, T., Han, K., Liu, Y., Zhang, Y., Dong, A., Du, Y., Huang, X., Wang, J., Lei, X., Zheng, X. Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study // *Pflugers Arch.* 2006. V. 453. № 1. P.43-52,
164. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., Verfaillie, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow // *Nature.* 2002. V. 418. № 6893. P.41-9,
165. Jolkonen, J., Puurunen, K., Rantakomi, S., Harkonen, A., Haapalinna, A., Sivenius, J. Behavioral effects of the alpha(2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats // *Eur J Pharmacol.* 2000. V. 400. № 2-3. P.211-9,
166. Kadiu, I., Gendelman, H.E. Macrophage bridging conduit trafficking of HIV-1 through the endoplasmic reticulum and Golgi network // *J Proteome Res.* 2011. V. 10. № 7. P.3225-38,

167. Karussis, D., Karageorgiou, C., Vaknin-Dembinsky, A., Gowda-Kurkalli, B., Gomori, J.M., Kassis, I., Bulte, J.W., Petrou, P., Ben-Hur, T., Abramsky, O., Slavin, S. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis // *Arch Neurol.* 2010. V. 67. № 10. P.1187-94,
168. Katagiri, H., Kushida, Y., Nojima, M., Kuroda, Y., Wakao, S., Ishida, K., Endo, F., Kume, K., Takahara, T., Nitta, H., Tsuda, H., Dezawa, M., Nishizuka, S.S. A Distinct Subpopulation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Muse Cells, Directly Commit to the Replacement of Liver Components // *Am J Transplant.* 2016. V. 16. № 2. P.468-83,
169. Kim, D.W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S.D., Borlongan, C.V. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications // *Int J Mol Sci.* 2013. V. 14. № 6. P.11692-712,
Notes: GENERAL NOTE: NLM: Original DateCompleted: 20130604
170. Kim, J.M., Lee, S.T., Chu, K., Jung, K.H., Song, E.C., Kim, S.J., Sinn, D.I., Kim, J.H., Park, D.K., Kang, K.M., Hyung Hong, N., Park, H.K., Won, C.H., Kim, K.H., Kim, M., Kun Lee, S., Roh, J.K. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model // *Brain Res.* 2007. V. 1183. P.43-50,
171. Kim, J.Y., Kim, D.H., Kim, J.H., Lee, D., Jeon, H.B., Kwon, S.J., Kim, S.M., Yoo, Y.J., Lee, E.H., Choi, S.J., Seo, S.W., Lee, J.I., Na, D.L., Yang, Y.S., Oh, W., Chang, J.W. Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid-beta plaques // *Cell Death Differ.* 2012. V. 19. № 4. P.680-91,
172. Kim, R.H., Peters, M., Jang, Y., Shi, W., Pintilie, M., Fletcher, G.C., DeLuca, C., Liepa, J., Zhou, L., Snow, B., Binari, R.C., Manoukian, A.S., Bray, M.R., Liu, F.F., Tsao, M.S., Mak, T.W. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN // *Cancer Cell.* 2005. V. 7. № 3. P.263-73,
173. Kim, R.H., Smith, P.D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M.P., Pownall, S., Wakeham, A., You-Ten, A.J., Kalia, S.K., Horne, P., Westaway, D., Lozano, A.M., Anisman, H., Park, D.S., Mak, T.W. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. V. 102. № 14. P.5215-20,
174. Kim, S., Honmou, O., Kato, K., Nonaka, T., Houkin, K., Hamada, H., Kocsis, J.D. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells // *Brain Res.* 2006. V. 1123. № 1. P.27-33,
175. Kim, S.S., Yoo, S.W., Park, T.S., Ahn, S.C., Jeong, H.S., Kim, J.W., Chang, D.Y., Cho, K.G., Kim, S.U., Huh, Y., Lee, J.E., Lee, S.Y., Lee, Y.D., Suh-Kim, H. Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain // *Stem Cells.* 2008. V. 26. № 9. P.2217-28,
176. King, M.P., Attardi, G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation // *Science.* 1989. V. 246. № 4929. P.500-3,

177. Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S., Epstein, S.E. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences // *Circ Res*. 2004. V. 95. № 4. P.354-63,
178. Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S., Shou, M., Lee, C.W., Barr, S., Fuchs, S., Epstein, S.E. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms // *Circulation*. 2004. V. 109. № 12. P.1543-9,
179. Klivenyi, P., Siwek, D., Gardian, G., Yang, L., Starkov, A., Cleren, C., Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Abeliovich, A., Beal, M.F. Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins // *Neurobiol Dis*. 2006. V. 21. № 3. P.541-8,
180. Knippenberg, S., Thau, N., Dengler, R., Brinker, T., Petri, S. Intracerebroventricular injection of encapsulated human mesenchymal cells producing glucagon-like peptide 1 prolongs survival in a mouse model of ALS // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 6. P.e36857
181. Koch, P., Kokaia, Z., Lindvall, O., Brustle, O. Emerging concepts in neural stem cell research: autologous repair and cell-based disease modelling // *Lancet Neurol*. 2009. V. 8. № 9. P.819-29,
182. Koh, S.H., Baik, W., Noh, M.Y., Cho, G.W., Kim, H.Y., Kim, K.S., Kim, S.H. The functional deficiency of bone marrow mesenchymal stromal cells in ALS patients is proportional to disease progression rate // *Exp Neurol*. 2012. V. 233. № 1. P.472-80,
183. Koh, S.H., Huh, Y.M., Noh, M.Y., Kim, H.Y., Kim, K.S., Lee, E.S., Ko, H.J., Cho, G.W., Yoo, A.R., Song, H.T., Hwang, S., Lee, K., Haam, S., Frank, J.A., Suh, J.S., Kim, S.H. beta-PIX is critical for transplanted mesenchymal stromal cell migration // *Stem Cells Dev*. 2012. V. 21. № 11. P.1989-99,
184. Komatsu, K., Honmou, O., Suzuki, J., Houkin, K., Hamada, H., Kocsis, J.D. Therapeutic time window of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after cerebral ischemia // *Brain Res*. 2010. V. 1334. P.84-92,
185. Kondziolka, D., Wechsler, L., Goldstein, S., Meltzer, C., Thulborn, K.R., Gebel, J., Jannetta, P., DeCesare, S., Elder, E.M., McGrogan, M., Reitman, M.A., Bynum, L. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke // *Neurology*. 2000. V. 55. № 4. P.565-9,
186. Kordower, J.H., Emborg, M.E., Bloch, J., Ma, S.Y., Chu, Y., Leventhal, L., McBride, J., Chen, E.Y., Palfi, S., Roitberg, B.Z., Brown, W.D., Holden, J.E., Pyzalski, R., Taylor, M.D., Carvey, P., Ling, Z., Trono, D., Hantraye, P., Deglon, N., Aebischer, P. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease // *Science*. 2000. V. 290. № 5492. P.767-73,
187. Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Grijalba, M.T., Bechara, E.J., Vercesi, A.E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation // *J Biol Chem*. 1996. V. 271. № 6. P.2929-34,
188. Kowianski, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waskow, M., Steliga, A., Morys, J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity // *Cell*

189. Koyanagi, M., Brandes, R.P., Haendeler, J., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? // *Circ Res*. 2005. V. 96. № 10. P.1039-41,
190. Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells // *Stem Cells*. 2006. V. 24 . № 2. P.386-98,
191. Krampera, M., Marconi, S., Pasini, A., Galie, M., Rigotti, G., Mosna, F., Tinelli, M., Lovato, L., Anghileri, E., Andreini, A., Pizzolo, G., Sbarbati, A., Bonetti, B. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus // *Bone*. 2007. V. 40. № 2. P.382-90,
192. Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A.C., Geula, C., Kowall, N.W., Khrapko, K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons // *Nat Genet*. 2006. V. 38. № 5. P.518-20,
193. Krendel, M., Sgourdas, G., Bonder, E.M. Disassembly of actin filaments leads to increased rate and frequency of mitochondrial movement along microtubules // *Cell Motil Cytoskeleton*. 1998. V. 40. № 4. P.368-78,
194. Kumar, R., Bukowski, M.J., Wider, J.M., Reynolds, C.A., Calo, L., Lepore, B., Tousignant, R., Jones, M., Przyklenk, K., Sanderson, T.H. Mitochondrial dynamics following global cerebral ischemia // *Mol Cell Neurosci*. 2016. V. 76. P.68-75,
195. Kurokawa, T., Kobayashi, H., Nonami, T., Harada, A., Nakao, A., Takagi, H. Mitochondrial glutathione redox and energy producing function during liver ischemia and reperfusion // *J Surg Res*. 1996. V. 66. № 1. P.1-5,
196. Kurozumi, K., Nakamura, K., Tamiya, T., Kawano, Y., Ishii, K., Kobune, M., Hirai, S., Uchida, H., Sasaki, K., Ito, Y., Kato, K., Honmou, O., Houkin, K., Date, I., Hamada, H. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model // *Mol Ther*. 2005. V. 11. № 1. P.96-104,
197. Lai, C.P., Breakefield, X.O. Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies // *Front Physiol*. 2012. V. 3. P.228
198. Lai, C.P., Breakefield, X.O. Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies // *Front Physiol*. 2012. V. 3. P.228
199. Lang, A.E., Gill, S., Patel, N.K., Lozano, A., Nutt, J.G., Penn, R., Brooks, D.J., Hotton, G., Moro, E., Heywood, P., Brodsky, M.A., Burchiel, K., Kelly, P., Dalvi, A., Scott, B., Stacy, M., Turner, D., Wooten, V.G., Elias, W.J., Laws, E.R., Dhawan, V., Stoessl, A.J., Matcham, J., Coffey, R.J., Traub, M. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease // *Ann Neurol*. 2006. V. 59. № 3. P.459-66,
200. Lappalainen, R.S., Narkilahti, S., Huhtala, T., Liimatainen, T., Suuronen, T., Narvanen, A.,

- Suuronen, R., Hovatta, O., Jolkonen, J. The SPECT imaging shows the accumulation of neural progenitor cells into internal organs after systemic administration in middle cerebral artery occlusion rats // *Neurosci Lett*. 2008. V. 440. № 3. P.246-50,
201. Las, G., Shirihai, O.S. Mito1: new wheels for transferring mitochondria // *EMBO J*. 2014. V. 33. № 9. P.939-41,
 202. Lauffenburger, D.A., Horwitz, A.F. Cell migration: a physically integrated molecular process // *Cell*. 1996. V. 84. № 3. P.359-69,
 203. Lee, H.J., Lee, J.K., Lee, H., Shin, J.W., Carter, J.E., Sakamoto, T., Jin, H.K., Bae, J.S. The therapeutic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease // *Neurosci Lett*. 2010. V. 481. № 1. P.30-5,
 204. Lee, J.K., Jin, H.K., Endo, S., Schuchman, E.H., Carter, J.E., Bae, J.S. Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses // *Stem Cells*. 2010. V. 28. № 2. P.329-43,
 205. Lee, J.S., Hong, J.M., Moon, G.J., Lee, P.H., Ahn, Y.H., Bang, O.Y. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke // *Stem Cells*. 2010. V. 28. № 6. P.1099-106,
Notes: CORPORATE NAME: STARTING collaborators
 206. Lee, S.T., Chu, K., Jung, K.H., Kim, S.J., Kim, D.H., Kang, K.M., Hong, N.H., Kim, J.H., Ban, J.J., Park, H.K., Kim, S.U., Park, C.G., Lee, S.K., Kim, M., Roh, J.K. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke // *Brain*. 2008. V. 131. № Pt 3. P.616-29,
 207. Leong, W.K., Henshall, T.L., Arthur, A., Kremer, K.L., Lewis, M.D., Helps, S.C., Field, J., Hamilton-Bruce, M.A., Warming, S., Manavis, J., Vink, R., Gronthos, S., Koblar, S.A. Human adult dental pulp stem cells enhance poststroke functional recovery through non-neural replacement mechanisms // *Stem Cells Transl Med*. 2012. V. 1. № 3. P.177-87,
 208. Li, F., Calingasan, N.Y., Yu, F., Mauck, W.M., Toidze, M., Almeida, C.G., Takahashi, R.H., Carlson, G.A., Flint Beal, M., Lin, M.T., Gouras, G.K. Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice // *J Neurochem*. 2004. V. 89. № 5. P.1308-12,
 209. Li, H., Fan, X., Kovi, R.C., Jo, Y., Moquin, B., Konz, R., Stoicov, C., Kurt-Jones, E., Grossman, S.R., Lyle, S., Rogers, A.B., Montrose, M., Houghton, J. Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice // *Cancer Res*. 2007. V. 67. № 22. P.10889-98,
 210. Li, W., Ren, G., Huang, Y., Su, J., Han, Y., Li, J., Chen, X., Cao, K., Chen, Q., Shou, P., Zhang, L., Yuan, Z.R., Roberts, A.I., Shi, S., Le, A.D., Shi, Y. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses // *Cell Death Differ*. 2012. V. 19. № 9. P.1505-13,
 211. Li, X., Zhang, Y., Yeung, S.C., Liang, Y., Liang, X., Ding, Y., Ip, M.S., Tse, H.F., Mak,

- J.C., Lian, Q. Mitochondrial transfer of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells to airway epithelial cells attenuates cigarette smoke-induced damage // *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014. V. 51. № 3. P.455-65,
212. Li, Y., Chen, J., Chen, X.G., Wang, L., Gautam, S.C., Xu, Y.X., Katakowski, M., Zhang, L.J., Lu, M., Janakiraman, N., Chopp, M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery // *Neurology*. 2002. V. 59. № 4. P.514-23,
 213. Li, Y., Chen, J., Wang, L., Zhang, L., Lu, M., Chopp, M. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease // *Neurosci Lett*. 2001. V. 316. № 2. P.67-70,
 214. Li, Z.M., Zhang, Z.T., Guo, C.J., Geng, F.Y., Qiang, F., Wang, L.X. Autologous bone marrow mononuclear cell implantation for intracerebral hemorrhage-a prospective clinical observation // *Clin Neurol Neurosurg*. 2013. V. 115. № 1. P.72-6,
 215. Liang, J., Wu, S., Zhao, H., Li, S.L., Liu, Z.X., Wu, J., Zhou, L. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into cholinergic-like neurons in vitro // *Neurosci Lett*. 2013. V. 532. P.59-63,
 216. Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H.F., Lian, Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives // *Cell Transplant*. 2014. V. 23. № 9. P.1045-59,
 217. Lin, C.H., Espreafico, E.M., Mooseker, M.S., Forscher, P. Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones // *Neuron*. 1996. V. 16. № 4. P.769-82,
 218. Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., Collins, F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons // *Science*. 1993. V. 260. № 5111. P.1130-2,
 219. Lindvall, O., Widner, H., Rehnström, S., Brundin, P., Odin, P., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K.L., Sawle, G., Rothwell, J.C., et, al. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants // *Ann Neurol*. 1992. V. 31. № 2. P.155-65,
 220. Liou, Y.C., Sun, A., Ryo, A., Zhou, X.Z., Yu, Z.X., Huang, H.K., Uchida, T., Bronson, R., Bing, G., Li, X., Hunter, T., Lu, K.P. Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration // *Nature*. 2003. V. 424. № 6948. P.556-61,
 221. Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons // *Physiol Rev*. 1999. V. 79. № 4. P.1431-568,
 222. Long, X., Olszewski, M., Huang, W., Kletzel, M. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells // *Stem Cells Dev*. 2005. V. 14. № 1. P.65-9,
 223. Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats // *Stroke*. 1989. V. 20. № 1. P.84-91,
 224. Lou, E., Fujisawa, S., Barlas, A., Romin, Y., Manova-Todorova, K., Moore, M.A.,

- Subramanian, S. Tunneling Nanotubes: A new paradigm for studying intercellular communication and therapeutics in cancer // *Commun Integr Biol.* 2012. V. 5. № 4. P.399-403,
225. Lou, E., Fujisawa, S., Morozov, A., Barlas, A., Romin, Y., Dogan, Y., Gholami, S., Moreira, A.L., Manova-Todorova, K., Moore, M.A. Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 3. P.e33093
 226. Lovell, M.A., Xiong, S., Xie, C., Davies, P., Markesbery, W.R. Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3 // *J Alzheimers Dis.* 2004. V. 6. № 6. P.659-71; discussion 673-81,
 227. Luoma, P., Melberg, A., Rinne, J.O., Kaukonen, J.A., Nupponen, N.N., Chalmers, R.M., Oldfors, A., Rautakorpi, I., Peltonen, L., Majamaa, K., Somer, H., Suomalainen, A. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study // *Lancet.* 2004. V. 364. № 9437. P.875-82,
 228. Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., Chaney, M., Trinchese, F., Liu, S., Gunn-Moore, F., Lue, L.F., Walker, D.G., Kuppusamy, P., Zewier, Z.L., Arancio, O., Stern, D., Yan, S.S., Wu, H. ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease // *Science.* 2004. V. 304. № 5669. P.448-52,
 229. Makridakis, M., Roubelakis, M.G., Vlahou, A. Stem cells: insights into the secretome // *Biochim Biophys Acta.* 2013. V. 1834. № 11. P.2380-4,
 230. Maltman, D.J., Hardy, S.A., Przyborski, S.A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair // *Neurochem Int.* 2011. V. 59. № 3. P.347-56,
 231. Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., Reddy, P.H. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression // *Hum Mol Genet.* 2006. V. 15. № 9. P.1437-49,
 232. Martin, L.J., Pan, Y., Price, A.C., Sterling, W., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Lee, M.K. Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death // *J Neurosci.* 2006. V. 26. № 1. P.41-50,
 233. Martinez, H.R., Gonzalez-Garza, M.T., Moreno-Cuevas, J.E., Caro, E., Gutierrez-Jimenez, E., Segura, J.J. Stem-cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis patients // *Cytotherapy.* 2009. V. 11. № 1. P.26-34,
 234. Martins, L.M., Morrison, A., Klupsch, K., Fedele, V., Moiso, N., Teismann, P., Abuin, A., Grau, E., Geppert, M., Livi, G.P., Creasy, C.L., Martin, A., Hargreaves, I., Heales, S.J., Okada, H., Brandner, S., Schulz, J.B., Mak, T., Downward, J. Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice // *Mol Cell Biol.* 2004. V. 24. № 22. P.9848-62,
 235. Mazzini, L., Ferrero, I., Luparello, V., Rustichelli, D., Gunetti, M., Mareschi, K., Testa, L.,

- Stecco, A., Tarletti, R., Miglioretti, M., Fava, E., Nasuelli, N., Cisari, C., Massara, M., Vercelli, R., Oggioni, G.D., Carriero, A., Cantello, R., Monaco, F., Fagioli, F. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial // *Exp Neurol*. 2010. V. 223. № 1. P.229-37,
236. Mazzini, L., Mareschi, K., Ferrero, I., Vassallo, E., Oliveri, G., Boccaletti, R., Testa, L., Livigni, S., Fagioli, F. Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis // *Neurol Res*. 2006. V. 28. № 5. P.523-6,
237. Medeiros, N.A., Burnette, D.T., Forscher, P. Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones // *Nat Cell Biol*. 2006. V. 8. № 3. P.215-26,
238. Meister, A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency // *Biochim Biophys Acta*. 1995. V. 1271. № 1. P.35-42,
239. Meulener, M.C., Graves, C.L., Sampathu, D.M., Armstrong-Gold, C.E., Bonini, N.M., Giasson, B.I. DJ-1 is present in a large molecular complex in human brain tissue and interacts with alpha-synuclein // *J Neurochem*. 2005. V. 93. № 6. P.1524-32,
240. Misra, V., Ritchie, M.M., Stone, L.L., Low, W.C., Janardhan, V. Stem cell therapy in ischemic stroke: role of IV and intra-arterial therapy // *Neurology*. 2012. V. 79. № 13 Suppl 1. P.S207-12,
241. Mitkari, B., Kerkela, E., Nystedt, J., Korhonen, M., Jolkkonen, J. Unexpected complication in a rat stroke model: exacerbation of secondary pathology in the thalamus by subacute intraarterial administration of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015. V. 35. № 3. P.363-6,
242. Moniche, F., Gonzalez, A., Gonzalez-Marcos, J.R., Carmona, M., Pinero, P., Espigado, I., Garcia-Solis, D., Cayuela, A., Montaner, J., Boada, C., Rosell, A., Jimenez, M.D., Mayol, A., Gil-Peralta, A. Intra-arterial bone marrow mononuclear cells in ischemic stroke: a pilot clinical trial // *Stroke*. 2012. V. 43. № 8. P.2242-4,
243. Moore, D.J., Zhang, L., Troncoso, J., Lee, M.K., Hattori, N., Mizuno, Y., Dawson, T.M., Dawson, V.L. Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress // *Hum Mol Genet*. 2005. V. 14. № 1. P.71-84,
244. Moschoi, R., Imbert, V., Nebout, M., Chiche, J., Mary, D., Prebet, T., Saland, E., Castellano, R., Pouyet, L., Collette, Y., Vey, N., Chabannon, C., Recher, C., Sarry, J.E., Alcor, D., Peyron, J.F., Griessinger, E. Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy // *Blood*. 2016. V. 128. № 2. P.253-64,
245. Moskowitz, M.A., Lo, E.H., Iadecola, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments // *Neuron*. 2010. V. 67. № 2. P.181-98,
246. Muftuoglu, M., Elibol, B., Dalmizrak, O., Ercan, A., Kulaksiz, G., Ogus, H., Dalkara, T., Ozer, N. Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations // *Mov Disord*. 2004. V. 19. № 5. P.544-8,
247. Munoz-Elias, G., Woodbury, D., Black, I.B. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions // *Stem Cells*. 2003. V. 21. № 4. P.437-48,

248. Mutlu, L., Hufnagel, D., Taylor, H.S. The endometrium as a source of mesenchymal stem cells for regenerative medicine // *Biol Reprod.* 2015. V. 92. № 6. P.138
249. Nam, H.S., Kwon, I., Lee, B.H., Kim, H., Kim, J., An, S., Lee, O.H., Lee, P.H., Kim, H.O., Namgoong, H., Kim, Y.D., Heo, J.H. Effects of Mesenchymal Stem Cell Treatment on the Expression of Matrix Metalloproteinases and Angiogenesis during Ischemic Stroke Recovery // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. P.e0144218
250. Neco, P., Gil, A., Del Mar Frances, M., Viniegra, S., Gutierrez, L.M. The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion // *Biochem J.* 2002. V. 368. № Pt 2. P.405-13,
251. Nelson, M.R., Thulin, E., Fagan, P.A., Forsen, S., Chazin, W.J. The EF-hand domain: a globally cooperative structural unit // *Protein Sci.* 2002. V. 11. № 2. P.198-205,
252. Neuhofer, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., Mackay, A., Fischer, I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype // *J Neurosci Res.* 2004. V. 77. № 2. P.192-204,
253. Neuss, S., Becher, E., Woltje, M., Tietze, L., Jahnen-Dechent, W. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing // *Stem Cells.* 2004. V. 22. № 3. P.405-14,
254. Newman, M.B., Misiuta, I., Willing, A.E., Zigova, T., Karl, R.C., Borlongan, C.V., Sanberg, P.R. Tumorigenicity issues of embryonic carcinoma-derived stem cells: relevance to surgical trials using NT2 and hNT neural cells // *Stem Cells Dev.* 2005. V. 14. № 1. P.29-43,
255. Newman, M.B., Willing, A.E., Manresa, J.J., Davis-Sanberg, C., Sanberg, P.R. Stroke-induced migration of human umbilical cord blood cells: time course and cytokines // *Stem Cells Dev.* 2005. V. 14. № 5. P.576-86,
256. Nieminen, A.L., Byrne, A.M., Herman, B., Lemasters, J.J. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species // *Am J Physiol.* 1997. V. 272. № 4 Pt 1. P.C1286-94,
257. Nogueira, C., Almeida, L.S., Nesti, C., Pezzini, I., Videira, A., Vilarinho, L., Santorelli, F.M. Syndromes associated with mitochondrial DNA depletion // *Ital J Pediatr.* 2014. V. 40. P.34
258. Nolte-'t Hoen, E.N., Buermans, H.P., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M.H., 't Hoen, P.A. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 18. P.9272-85,
259. Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E.K., Jones, P.K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C.S., Petersen, R.B., Smith, M.A. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease // *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001. V. 60. № 8. P.759-67,
260. Nygren, J.M., Liuba, K., Breitbach, M., Stott, S., Thoren, L., Roell, W., Geisen, C., Sasse,

- P., Kirik, D., Bjorklund, A., Nerlov, C., Fleischmann, B.K., Jovinge, S., Jacobsen, S.E. Myeloid and lymphoid contribution to non-haematopoietic lineages through irradiation-induced heterotypic cell fusion // *Nat Cell Biol.* 2008. V. 10. № 5. P.584-92,
261. Nygren, J.M., Liuba, K., Breitbach, M., Stott, S., Thoren, L., Roell, W., Geisen, C., Sasse, P., Kirik, D., Bjorklund, A., Nerlov, C., Fleischmann, B.K., Jovinge, S., Jacobsen, S.E. Myeloid and lymphoid contribution to non-haematopoietic lineages through irradiation-induced heterotypic cell fusion // *Nat Cell Biol.* 2008. V. 10. № 5. P.584-92,
 262. O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H., Folkman, J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma // *Cell.* 1994. V. 79. № 2. P.315-28,
 263. Offner, H., Vandenbark, A.A., Hurn, P.D. Effect of experimental stroke on peripheral immunity: CNS ischemia induces profound immunosuppression // *Neuroscience.* 2009. V. 158. № 3. P.1098-111,
 264. Oh, H., Bradfute, S.B., Gallardo, T.D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L.H., Behringer, R.R., Garry, D.J., Entman, M.L., Schneider, M.D. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. V. 100. № 21. P.12313-8,
 265. Oh, K.W., Moon, C., Kim, H.Y., Oh, S.I., Park, J., Lee, J.H., Chang, I.Y., Kim, K.S., Kim, S.H. Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis // *Stem Cells Transl Med.* 2015. V. 4. № 6. P.590-7,
 266. Oh, S.H., Kim, H.N., Park, H.J., Shin, J.Y., Lee, P.H. Mesenchymal Stem Cells Increase Hippocampal Neurogenesis and Neuronal Differentiation by Enhancing the Wnt Signaling Pathway in an Alzheimer's Disease Model // *Cell Transplant.* 2015. V. 24. № 6. P.1097-109,
 267. Ohyagi, Y., Yamada, T., Nishioka, K., Clarke, N.J., Tomlinson, A.J., Naylor, S., Nakabeppu, Y., Kira, J., Younkin, S.G. Selective increase in cellular A beta 42 is related to apoptosis but not necrosis // *Neuroreport.* 2000. V. 11. № 1. P.167-71,
 268. Okazaki, T., Magaki, T., Takeda, M., Kajiwara, Y., Hanaya, R., Sugiyama, K., Arita, K., Nishimura, M., Kato, Y., Kurisu, K. Intravenous administration of bone marrow stromal cells increases survivin and Bcl-2 protein expression and improves sensorimotor function following ischemia in rats // *Neurosci Lett.* 2008. V. 430. № 2. P.109-14,
 269. Olanow, C.W., Goetz, C.G., Kordower, J.H., Stoessl, A.J., Sossi, V., Brin, M.F., Shannon, K.M., Nauert, G.M., Perl, D.P., Godbold, J., Freeman, T.B. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease // *Ann Neurol.* 2003. V. 54. № 3. P.403-14,
 270. Oltvai, Z.N., Millman, C.L., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death // *Cell.* 1993. V. 74. № 4. P.609-19,

271. Onfelt, B., Nedvetzki, S., Benninger, R.K., Purbhoo, M.A., Sowinski, S., Hume, A.N., Seabra, M.C., Neil, M.A., French, P.M., Davis, D.M. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria // *J Immunol.* 2006. V. 177. № 12. P.8476-83,
272. Onfelt, B., Nedvetzki, S., Yanagi, K., Davis, D.M. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells // *J Immunol.* 2004. V. 173. № 3. P.1511-3,
273. Onteniente, B. The multiple aspects of stroke and stem cell therapy // *Curr Mol Med.* 2013. V. 13. № 5. P.821-31,
274. Onteniente, B., Polentes, J. Regenerative medicine for stroke - are we there yet? // *Cerebrovasc Dis.* 2011. V. 31. № 6. P.544-51,
275. Osaka, M., Honmou, O., Murakami, T., Nonaka, T., Houkin, K., Hamada, H., Kocsis, J.D. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome // *Brain Res.* 2010. V. 1343. P.226-35,
276. Osanai, T., Kuroda, S., Sugiyama, T., Kawabori, M., Ito, M., Shichinohe, H., Kuge, Y., Houkin, K., Tamaki, N., Iwasaki, Y. Therapeutic effects of intra-arterial delivery of bone marrow stromal cells in traumatic brain injury of rats--in vivo cell tracking study by near-infrared fluorescence imaging // *Neurosurgery.* 2012. V. 70. № 2. P.435-44; discussion 444,
277. Osborn, L., Vassallo, C., Browning, B.G., Tizard, R., Haskard, D.O., Benjamin, C.D., Dougas, I., Kirchhausen, T. Arrangement of domains, and amino acid residues required for binding of vascular cell adhesion molecule-1 to its counter-receptor VLA-4 (alpha 4 beta 1) // *J Cell Biol.* 1994. V. 124. № 4. P.601-8,
278. Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., Weil, S., Horstmann, H., Wiestler, B., Syed, M., Huang, L., Ratliff, M., Karimian Jazi, K., Kurz, F.T., Schmenger, T., Lemke, D., Gommel, M., Pauli, M., Liao, Y., Haring, P., Pusch, S., Herl, V., Steinhauser, C., Krunic, D., Jarahian, M., Miletic, H., Berghoff, A.S., Griesbeck, O., Kalamakis, G., Garaschuk, O., Preusser, M., Weiss, S., Liu, H., Heiland, S., Platten, M., Huber, P.E., Kuner, T., von Deimling, A., Wick, W., Winkler, F. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network // *Nature.* 2015. V. 528. № 7580. P.93-8,
279. Osswald, M., Solecki, G., Wick, W., Winkler, F. A malignant cellular network in gliomas: potential clinical implications // *Neuro Oncol.* 2016. V. 18. № 4. P.479-85,
280. Otsu, K., Das, S., Houser, S.D., Quadri, S.K., Bhattacharya, S., Bhattacharya, J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells // *Blood.* 2009. V. 113. № 18. P.4197-205,
281. Packer, M.A., Porteous, C.M., Murphy, M.P. Superoxide production by mitochondria in the presence of nitric oxide forms peroxynitrite // *Biochem Mol Biol Int.* 1996. V. 40. № 3. P.527-34,
282. Paczkowska, E., Kucia, M., Koziarska, D., Halasa, M., Safranow, K., Masiuk, M., Karbicka, A., Nowik, M., Nowacki, P., Ratajczak, M.Z., Machalinski, B. Clinical evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood in patients

after stroke // *Stroke*. 2009. V. 40. № 4. P.1237-44,

283. Palacino, J.J., Sagi, D., Goldberg, M.S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J., Shen, J. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice // *J Biol Chem*. 2004. V. 279. № 18. P.18614-22,
284. Pan, G.Z., Yang, Y., Zhang, J., Liu, W., Wang, G.Y., Zhang, Y.C., Yang, Q., Zhai, F.X., Tai, Y., Liu, J.R., Zhang, Q., Chen, G.H. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia/reperfusion injuries via inactivation of the MEK/ERK signaling pathway in rats // *J Surg Res*. 2012. V. 178. № 2. P.935-48,
285. Park, D.H., Borlongan, C.V., Willing, A.E., Eve, D.J., Cruz, L.E., Sanberg, C.D., Chung, Y.G., Sanberg, P.R. Human umbilical cord blood cell grafts for brain ischemia // *Cell Transplant*. 2009. V. 18. № 9. P.985-98,
286. Park, D.H., Eve, D.J., Musso, J. 3rd, Klasko, S.K., Cruz, E., Borlongan, C.V., Sanberg, P.R. Inflammation and stem cell migration to the injured brain in higher organisms // *Stem Cells Dev*. 2009. V. 18. № 5. P.693-702,
287. Park, H.J., Oh, S.H., Kim, H.N., Jung, Y.J., Lee, P.H. Mesenchymal stem cells enhance alpha-synuclein clearance via M2 microglia polarization in experimental and human parkinsonian disorder // *Acta Neuropathol*. 2016. V. 132. № 5. P.685-701,
288. Park, H.J., Shin, J.Y., Kim, H.N., Oh, S.H., Lee, P.H. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells through autophagy modulation in a parkinsonian model // *Neurobiol Aging*. 2014. V. 35. № 8. P.1920-8,
289. Park, H.J., Shin, J.Y., Lee, B.R., Kim, H.O., Lee, P.H. Mesenchymal stem cells augment neurogenesis in the subventricular zone and enhance differentiation of neural precursor cells into dopaminergic neurons in the substantia nigra of a parkinsonian model // *Cell Transplant*. 2012. V. 21. № 8. P.1629-40,
290. Park, H.W., Kim, Y., Chang, J.W., Yang, Y.S., Oh, W., Lee, J.M., Park, H.R., Kim, D.G., Paek, S.H. Effect of Single and Double Administration of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Following Focal Cerebral Ischemia in Rats // *Exp Neurobiol*. 2017. V. 26. № 1. P.55-65,
291. Parker, W.D. Jr, Filley, C.M., Parks, J.K. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease // *Neurology*. 1990. V. 40. № 8. P.1302-3,
292. Pastorino, L., Sun, A., Lu, P.J., Zhou, X.Z., Balastik, M., Finn, G., Wulf, G., Lim, J., Li, S.H., Li, X., Xia, W., Nicholson, L.K., Lu, K.P. The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production // *Nature*. 2006. V. 440. № 7083. P.528-34,
293. Patel, N.K., Bunnage, M., Plaha, P., Svendsen, C.N., Heywood, P., Gill, S.S. Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study // *Ann Neurol*. 2005. V. 57. № 2. P.298-302,
294. Penfornis, P., Vallabhaneni, K.C., Whitt, J., Pochampally, R. Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment // *Int J Cancer*. 2016. V. 138. № 1. P.14-21,
295. Pesah, Y., Pham, T., Burgess, H., Middlebrooks, B., Verstreken, P., Zhou, Y., Harding, M.,

- Bellen, H., Mardon, G. *Drosophila parkin* mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress // *Development*. 2004. V. 131. № 9. P.2183-94,
296. Petit, A., Kawai, T., Paitel, E., Sanjo, N., Maj, M., Scheid, M., Chen, F., Gu, Y., Hasegawa, H., Salehi-Rad, S., Wang, L., Rogaeva, E., Fraser, P., Robinson, B., St George-Hyslop, P., Tandon, A. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations // *J Biol Chem*. 2005. V. 280. № 40. P.34025-32,
 297. Petrou, P., Gothelf, Y., Argov, Z., Gotkine, M., Levy, Y.S., Kassis, I., Vaknin-Dembinsky, A., Ben-Hur, T., Offen, D., Abramsky, O., Melamed, E., Karussis, D. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials // *JAMA Neurol*. 2016. V. 73. № 3. P.337-44,
 298. Phinney, D.G., Di Giuseppe, M., Njah, J., Sala, E., Shiva, S., St Croix, C.M., Stolz, D.B., Watkins, S.C., Di, Y.P., Leikauf, G.D., Kolls, J., Riches, D.W., Deiuliis, G., Kaminski, N., Boregowda, S.V., McKenna, D.H., Ortiz, L.A. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs // *Nat Commun*. 2015. V. 6. P.8472
 299. Plotnikov, E.Y., Babenko, V.A., Silachev, D.N., Zorova, L.D., Khryapenkova, T.G., Savchenko, E.S., Pevzner, I.B., Zorov, D.B. Intercellular Transfer of Mitochondria // *Biochemistry (Mosc)*. 2015. V. 80. № 5. P.542-8,
 300. Plotnikov, E.Y., Babenko, V.A., Silachev, D.N., Zorova, L.D., Khryapenkova, T.G., Savchenko, E.S., Pevzner, I.B., Zorov, D.B. Intercellular Transfer of Mitochondria // *Biochemistry (Mosc)*. 2015. V. 80. № 5. P.542-8,
 301. Plotnikov, E.Y., Khryapenkova, T.G., Galkina, S.I., Sukhikh, G.T., Zorov, D.B. Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture // *Exp Cell Res*. 2010. V. 316. № 15. P.2447-55,
 302. Plotnikov, E.Y., Khryapenkova, T.G., Galkina, S.I., Sukhikh, G.T., Zorov, D.B. Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture // *Exp Cell Res*. 2010. V. 316. № 15. P.2447-55,
 303. Plotnikov, E.Y., Khryapenkova, T.G., Vasileva, A.K., Marey, M.V., Galkina, S.I., Isaev, N.K., Sheval, E.V., Polyakov, V.Y., Sukhikh, G.T., Zorov, D.B. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture // *J Cell Mol Med*. 2008. V. 12. № 5A. P.1622-31,
 304. Plotnikov, E.Y., Khryapenkova, T.G., Vasileva, A.K., Marey, M.V., Galkina, S.I., Isaev, N.K., Sheval, E.V., Polyakov, V.Y., Sukhikh, G.T., Zorov, D.B. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture // *J Cell Mol Med*. 2008. V. 12. № 5A. P.1622-31,
 305. Prabhakar, S., Marwaha, N., Lal, V., Sharma, R.R., Rajan, R., Khandelwal, N. Autologous bone marrow-derived stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: a pilot study // *Neurol India*. 2012. V. 60. № 5. P.465-9,
 306. Prockop, D.J., Kota, D.J., Bazhanov, N., Reger, R.L. Evolving paradigms for repair of

- tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs) // *J Cell Mol Med.* 2010. V. 14. № 9. P.2190-9,
307. Qian, T., Nieminen, A.L., Herman, B., Lemasters, J.J. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes // *Am J Physiol.* 1997. V. 273. № 6 Pt 1. P.C1783-92,
 308. Razorenova, O.V., Ivanov, A.V., Budanov, A.V., Chumakov, P.M. Virus-based reporter systems for monitoring transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1 // *Gene.* 2005. V. 350. № 1. P.89-98,
 309. Reddy, P.H., McWeeney, S., Park, B.S., Manczak, M., Gutala, R.V., Partovi, D., Jung, Y., Yau, V., Searles, R., Mori, M., Quinn, J. Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease // *Hum Mol Genet.* 2004. V. 13. № 12. P.1225-40,
 310. Ridger, V.C., Wagner, B.E., Wallace, W.A., Hellewell, P.G. Differential effects of CD18, CD29, and CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation // *J Immunol.* 2001. V. 166. № 5. P.3484-90,
 311. Rogers, R.S., Bhattacharya, J. When cells become organelle donors // *Physiology (Bethesda).* 2013. V. 28. № 6. P.414-22,
 312. Rosenblum, S., Wang, N., Smith, T.N., Pendharkar, A.V., Chua, J.Y., Birk, H., Guzman, R. Timing of intra-arterial neural stem cell transplantation after hypoxia-ischemia influences cell engraftment, survival, and differentiation // *Stroke.* 2012. V. 43. № 6. P.1624-31,
 313. Rouslin, W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis // *Am J Physiol.* 1983. V. 244. № 6. P.H743-8,
 314. Ruoslahti, E. Fibronectin in cell adhesion and invasion // *Cancer Metastasis Rev.* 1984. V. 3. № 1. P.43-51,
 315. Russo, G.J., Louie, K., Wellington, A., Macleod, G.T., Hu, F., Panchumarthi, S., Zinsmaier, K.E. *Drosophila* Miro is required for both anterograde and retrograde axonal mitochondrial transport // *J Neurosci.* 2009. V. 29. № 17. P.5443-55,
 316. Ruster, B., Gottig, S., Ludwig, R.J., Bistrrian, R., Muller, S., Seifried, E., Gille, J., Henschler, R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells // *Blood.* 2006. V. 108. № 12. P.3938-44,
 317. Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., Gerdes, H.H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport // *Science.* 2004. V. 303. № 5660. P.1007-10,
 318. Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., Gerdes, H.H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport // *Science.* 2004. V. 303. № 5660. P.1007-10,
 319. Sackstein, R. The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm // *Curr Opin Hematol.* 2005. V. 12. № 6. P.444-50,
 320. Sahota, P., Savitz, S.I. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery // *Neurotherapeutics.* 2011. V. 8. № 3. P.434-51,

321. Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D.R., Sanberg, P.R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro // *Exp Neurol*. 2000. V. 164. № 2. P.247-56,
322. Sanderson, T.H., Reynolds, C.A., Kumar, R., Przyklenk, K., Huttemann, M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation // *Mol Neurobiol*. 2013. V. 47. № 1. P.9-23,
323. Sarraj, A., Grotta, J.C. Stroke: new horizons in treatment // *Lancet Neurol*. 2014. V. 13. № 1. P.2-3,
324. Savitz, S.I., Misra, V., Kasam, M., Juneja, H., Cox, C.S. Jr, Alderman, S., Aisiku, I., Kar, S., Gee, A., Grotta, J.C. Intravenous autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke // *Ann Neurol*. 2011. V. 70. № 1. P.59-69,
325. Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease // *Lancet*. 1989. V. 1. № 8649. P.1269
326. Scheibe, F., Klein, O., Klose, J., Priller, J. Mesenchymal stromal cells rescue cortical neurons from apoptotic cell death in an in vitro model of cerebral ischemia // *Cell Mol Neurobiol*. 2012. V. 32. № 4. P.567-76,
327. Schild, L., Reinheckel, T., Wiswedel, I., Augustin, W. Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification // *Biochem J*. 1997. V. 328 (Pt 1). P.205-10,
328. Schmidt, A., Ladage, D., Schinkothe, T., Klausmann, U., Ulrichs, C., Klinz, F.J., Brixius, K., Arnhold, S., Desai, B., Mehlhorn, U., Schwinger, R.H., Staib, P., Addicks, K., Bloch, W. Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells // *Stem Cells*. 2006. V. 24. № 7. P.1750-8,
329. Schrepfer, S., Deuse, T., Reichenspurner, H., Fischbein, M.P., Robbins, R.C., Pelletier, M.P. Stem cell transplantation: the lung barrier // *Transplant Proc*. 2007. V. 39. № 2. P.573-6,
330. Schwarting, S., Litwak, S., Hao, W., Bahr, M., Weise, J., Neumann, H. Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury // *Stroke*. 2008. V. 39. № 10. P.2867-75,
331. Segers, V.F., Van Riet, I., Andries, L.J., Lemmens, K., Demolder, M.J., De Becker, A.J., Kockx, M.M., De Keulenaer, G.W. Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006. V. 290. № 4. P.H1370-7,
332. Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., Deschaseaux, F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells // *Stem Cells*. 2008. V. 26. № 1. P.212-22,

333. Shahdadfar, A., Fronsdal, K., Haug, T., Reinholt, F.P., Brinchmann, J.E. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability // *Stem Cells*. 2005. V. 23. № 9. P.1357-66,
334. Shen, L.H., Li, Y., Chen, J., Zacharek, A., Gao, Q., Kapke, A., Lu, M., Raginski, K., Vanguri, P., Smith, A., Chopp, M. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke // *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007. V. 27. № 1. P.6-13,
335. Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L., Li, N. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1 // *Cell Res*. 2008. V. 18. № 8. P.846-57,
336. Sherer, T.B., Betarbet, R., Testa, C.M., Seo, B.B., Richardson, J.R., Kim, J.H., Miller, G.W., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., Greenamyre, J.T. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease // *J Neurosci*. 2003. V. 23. № 34. P.10756-64,
337. Shi, M., Liu, Z.W., Wang, F.S. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells // *Clin Exp Immunol*. 2011. V. 164. № 1. P.1-8,
338. Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., Ames, B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. V. 91. № 23. P.10771-8,
339. Shin, J.Y., Park, H.J., Kim, H.N., Oh, S.H., Bae, J.S., Ha, H.J., Lee, P.H. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase beta-amyloid clearance in Alzheimer disease models // *Autophagy*. 2014. V. 10. № 1. P.32-44,
340. Shinozuka, K., Dailey, T., Tajiri, N., Ishikawa, H., Kaneko, Y., Borlongan, C.V. Stem cell transplantation for neuroprotection in stroke // *Brain Sci*. 2013. V. 3. № 1. P.239-61,
341. Shitara, H., Kaneda, H., Sato, A., Inoue, K., Ogura, A., Yonekawa, H., Hayashi, J.I. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis // *Genetics*. 2000. V. 156. № 3. P.1277-84,
342. Shyu, W.C., Liu, D.D., Lin, S.Z., Li, W.W., Su, C.Y., Chang, Y.C., Wang, H.J., Wang, H.W., Tsai, C.H., Li, H. Implantation of olfactory ensheathing cells promotes neuroplasticity in murine models of stroke // *J Clin Invest*. 2008. V. 118. № 7. P.2482-95,
343. Silachev, D.N., Gulyaev, M.V., Zorova, L.D., Khailova, L.S., Gubsky, L.V., Pirogov, Y.A., Plotnikov, E.Y., Sukhikh, G.T., Zorov, D.B. Magnetic resonance spectroscopy of the ischemic brain under lithium treatment. Link to mitochondrial disorders under stroke // *Chem Biol Interact*. 2015. V. 237. P.175-82,
344. Silachev, D.N., Isaev, N.K., Pevzner, I.B., Zorova, L.D., Stelmashook, E.V., Novikova, S.V., Plotnikov, E.Y., Skulachev, V.P., Zorov, D.B. The mitochondria-targeted antioxidants and remote kidney preconditioning ameliorate brain damage through kidney-to-brain cross-talk // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 12. P.e51553

345. Silachev, D.N., Uchevatkin, A.A., Pirogov, Y.A., Zorov, D.B., Isaev, N.K. Comparative evaluation of two methods for studies of experimental focal ischemia: magnetic resonance tomography and triphenyltetrazoleum detection of brain injuries // *Bull Exp Biol Med*. 2009. V. 147. № 2. P.269-72,
346. Silvestri, L., Caputo, V., Bellacchio, E., Atorino, L., Dallapiccola, B., Valente, E.M., Casari, G. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism // *Hum Mol Genet*. 2005. V. 14. № 22. P.3477-92,
347. Simon, D.K., Lin, M.T., Zheng, L., Liu, G.J., Ahn, C.H., Kim, L.M., Mauck, W.M., Twu, F., Beal, M.F., Johns, D.R. Somatic mitochondrial DNA mutations in cortex and substantia nigra in aging and Parkinson's disease // *Neurobiol Aging*. 2004. V. 25. № 1. P.71-81,
348. Simon, D.K., Pulst, S.M., Sutton, J.P., Browne, S.E., Beal, M.F., Johns, D.R. Familial multisystem degeneration with parkinsonism associated with the 11778 mitochondrial DNA mutation // *Neurology*. 1999. V. 53. № 8. P.1787-93,
349. Sims, N.R. Selective impairment of respiration in mitochondria isolated from brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat // *J Neurochem*. 1991. V. 56. № 6. P.1836-44,
350. Singh, S.K., Kurfurst, R., Nizard, C., Schnebert, S., Perrier, E., Tobin, D.J. Melanin transfer in human skin cells is mediated by filopodia--a model for homotypic and heterotypic lysosome-related organelle transfer // *FASEB J*. 2010. V. 24. № 10. P.3756-69,
351. Skulachev, M.V., Antonenko, Y.N., Anisimov, V.N., Chernyak, B.V., Cherepanov, D.A., Chistyakov, V.A., Egorov, M.V., Kolosova, N.G., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Plotnikov, E.Y., Roginsky, V.A., Savchenko, A.Y., Severina, I.I., Severin, F.F., Shkurat, T.P., Tashlitsky, V.N., Shidlovsky, K.M., Vyssokikh, M.Y., Zamyatnin, A.A. Jr, Zorov, D.B., Skulachev, V.P. Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies // *Curr Drug Targets*. 2011. V. 12. № 6. P.800-26,
352. Slevin, J.T., Gerhardt, G.A., Smith, C.D., Gash, D.M., Kryscio, R., Young, B. Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor // *J Neurosurg*. 2005. V. 102. № 2. P.216-22,
353. Smith, R.A., Murphy, M.P. Mitochondria-targeted antioxidants as therapies // *Discov Med*. 2011. V. 11. № 57. P.106-14,
354. Song, D.D., Shults, C.W., Sisk, A., Rockenstein, E., Masliah, E. Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP // *Exp Neurol*. 2004. V. 186. № 2. P.158-72,
355. Song, W.H., Ballard, J.W., Yi, Y.J., Sutovsky, P. Regulation of mitochondrial genome inheritance by autophagy and ubiquitin-proteasome system: implications for health, fitness, and fertility // *Biomed Res Int*. 2014. V. 2014. P.981867
356. Spees, J.L., Olson, S.D., Whitney, M.J., Prockop, D.J. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. V. 103. № 5. P.1283-8,

357. Spees, J.L., Olson, S.D., Whitney, M.J., Prockop, D.J. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. V. 103. № 5. P.1283-8,
358. Springer, T.A. Adhesion receptors of the immune system // *Nature*. 1990. V. 346. № 6283. P.425-34,
359. Standeven, K.F., Ariens, R.A., Grant, P.J. The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function // *Blood Rev*. 2005. V. 19. № 5. P.275-88,
360. Stowers, R.S., Megeath, L.J., Gorska-Andrzejak, J., Meinertzhagen, I.A., Schwarz, T.L. Axonal transport of mitochondria to synapses depends on mltin, a novel *Drosophila* protein // *Neuron*. 2002. V. 36. № 6. P.1063-77,
361. Straight, A.F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N.J., Sellers, J.R., Mitchison, T.J. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor // *Science*. 2003. V. 299. № 5613. P.1743-7,
362. Strauss, K.M., Martins, L.M., Plun-Favreau, H., Marx, F.P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszolek, Z., Muller, T., Bornemann, A., Wolburg, H., Downward, J., Riess, O., Schulz, J.B., Kruger, R. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease // *Hum Mol Genet*. 2005. V. 14. № 15. P.2099-111,
363. Stroemer, P., Patel, S., Hope, A., Oliveira, C., Pollock, K., Sinden, J. The neural stem cell line CTX0E03 promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after experimental stroke in a dose-dependent fashion // *Neurorehabil Neural Repair*. 2009. V. 23. № 9. P.895-909,
364. Suarez-Monteagudo, C., Hernandez-Ramirez, P., Alvarez-Gonzalez, L., Garcia-Maeso, I., de la Cuetara-Bernal, K., Castillo-Diaz, L., Bringas-Vega, M.L., Martinez-Aching, G., Morales-Chacon, L.M., Baez-Martin, M.M., Sanchez-Catasus, C., Carballo-Barreda, M., Rodriguez-Rojas, R., Gomez-Fernandez, L., Alberti-Amador, E., Macias-Abraham, C., Balea, E.D., Rosales, L.C., Del Valle Perez, L., Ferrer, B.B., Gonzalez, R.M., Bergado, J.A. Autologous bone marrow stem cell neurotransplantation in stroke patients. An open study // *Restor Neurol Neurosci*. 2009. V. 27. № 3. P.151-61,
365. Sultana, R., Boyd-Kimball, D., Poon, H.F., Cai, J., Pierce, W.M., Klein, J.B., Markesbery, W.R., Zhou, X.Z., Lu, K.P., Butterfield, D.A. Oxidative modification and down-regulation of Pin1 in Alzheimer's disease hippocampus: A redox proteomics analysis // *Neurobiol Aging*. 2006. V. 27. № 7. P.918-25,
366. Sun, X., Wang, Y., Zhang, J., Tu, J., Wang, X.J., Su, X.D., Wang, L., Zhang, Y. Tunneling-nanotube direction determination in neurons and astrocytes // *Cell Death Dis*. 2012. V. 3. P.e438
367. Sutovsky, P., Moreno, R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Thompson, W.E., Schatten, G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis // *J Cell Sci*. 2001. V. 114. № Pt 9. P.1665-75,
368. Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G.

- Ubiquitin tag for sperm mitochondria // *Nature*. 1999. V. 402. № 6760. P.371-2,
369. Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos // *Biol Reprod* . 2000. V. 63 . № 2. P.582-90,
 370. Sutovsky, P., Navara, C.S., Schatten, G. Fate of the sperm mitochondria, and the incorporation, conversion, and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization // *Biol Reprod*. 1996. V. 55. № 6. P.1195-205,
 371. Suzuki, M., McHugh, J., Tork, C., Shelley, B., Hayes, A., Bellantuono, I., Aebischer, P., Svendsen, C.N. Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS // *Mol Ther*. 2008. V. 16. № 12. P.2002-10,
 372. Swerdlow, R.H., Parks, J.K., Cassarino, D.S., Maguire, D.J., Maguire, R.S., Bennett, J.P. Jr, Davis, R.E., Parker, W.D. Jr Cybrids in Alzheimer's disease: a cellular model of the disease? // *Neurology*. 1997. V. 49. № 4. P.918-25,
 373. Taguchi, A., Soma, T., Tanaka, H., Kanda, T., Nishimura, H., Yoshikawa, H., Tsukamoto, Y., Iso, H., Fujimori, Y., Stern, D.M., Naritomi, H., Matsuyama, T. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model // *J Clin Invest*. 2004. V. 114. № 3. P.330-8,
 374. Tajiri, N., Acosta, S., Glover, L.E., Bickford, P.C., Jacotte Simancas, A., Yasuhara, T., Date, I., Solomita, M.A., Antonucci, I., Stuppia, L., Kaneko, Y., Borlongan, C.V. Intravenous grafts of amniotic fluid-derived stem cells induce endogenous cell proliferation and attenuate behavioral deficits in ischemic stroke rats // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 8. P.e43779
 375. Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H., Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh, N., Nakatsuji, N., Sasai, Y., Hashimoto, N. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model // *J Clin Invest*. 2005. V. 115. № 1. P.102-9,
 376. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell*. 2007. V. 131. № 5. P.861-72,
 377. Takeda, K., Tasai, M., Akagi, S., Matsukawa, K., Takahashi, S., Iwamoto, M., Srirattana, K., Onishi, A., Tagami, T., Nirasawa, K., Hanada, H., Pinkert, C.A. Microinjection of serum-starved mitochondria derived from somatic cells affects parthenogenetic development of bovine and murine oocytes // *Mitochondrion*. 2010. V. 10. № 2. P.137-42,
 378. Tamagno, E., Parola, M., Bardini, P., Piccini, A., Borghi, R., Guglielmotto, M., Santoro, G., Davit, A., Danni, O., Smith, M.A., Perry, G., Tabaton, M. Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways // *J Neurochem*. 2005. V. 92. № 3. P.628-36,
 379. Tang, B., Xiong, H., Sun, P., Zhang, Y., Wang, D., Hu, Z., Zhu, Z., Ma, H., Pan, Q., Xia,

- J.H., Xia, K., Zhang, Z. Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease // *Hum Mol Genet.* 2006. V. 15. № 11. P.1816-25,
380. Tang, B.L. MIRO GTPases in Mitochondrial Transport, Homeostasis and Pathology // *Cells.* 2015. V. 5. № 1.
 381. Tang, Y.L., Zhao, Q., Qin, X., Shen, L., Cheng, L., Ge, J., Phillips, M.I. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction // *Ann Thorac Surg.* 2005. V. 80. № 1. P.229-36; discussion 236-7,
 382. Thakur, B.K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J.M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., Bromberg, J., Peinado, H., Lyden, D. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection // *Cell Res.* 2014. V. 24. № 6. P.766-9,
 383. Tomchuck, S.L., Zvezdaryk, K.J., Coffelt, S.B., Waterman, R.S., Danka, E.S., Scandurro, A.B. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses // *Stem Cells.* 2008. V. 26. № 1. P.99-107,
 384. Tondreau, T., Lagneaux, L., Dejeneffe, M., Massy, M., Mortier, C., Delforge, A., Bron, D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation // *Differentiation.* 2004. V. 72. № 7. P.319-26,
 385. Toyama, K., Honmou, O., Harada, K., Suzuki, J., Houkin, K., Hamada, H., Kocsis, J.D. Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia // *Exp Neurol.* 2009. V. 216. № 1. P.47-55,
 386. Trapp, B.D., Ransohoff, R., Rudick, R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability // *Curr Opin Neurol.* 1999. V. 12. № 3. P.295-302,
 387. Trounson, A., Thakar, R.G., Lomax, G., Gibbons, D. Clinical trials for stem cell therapies // *BMC Med.* 2011. V. 9. P.52
 388. Trzaska, K.A., Kuzhikandathil, E.V., Rameshwar, P. Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 11. P.2797-808,
 389. Tsunekawa, S., Tanaka, A., Ozawa, K. Molecular damage to rat liver mitochondrial H(+)-ATPase during cold preservation with UW solution // *Transplantation.* 1991. V. 52. № 6. P.999-1003,
 390. Ukai, R., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H., Kocsis, J.D. Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia // *J Neurotrauma.* 2007. V. 24. № 3. P.508-20,
 391. Valenick, L.V., Hsia, H.C., Schwarzbauer, J.E. Fibronectin fragmentation promotes alpha4beta1 integrin-mediated contraction of a fibrin-fibronectin provisional matrix // *Exp Cell Res.* 2005. V. 309. № 1. P.48-55,
 392. Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., Albanese, A., Nussbaum, R.,

- Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G., Wood, N.W. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1 // *Science*. 2004. V. 304. № 5674. P.1158-60,
393. Valente, S., Rossi, R., Resta, L., Pasquinelli, G. Exploring the human mesenchymal stem cell tubule communication network through electron microscopy // *Ultrastruct Pathol*. 2015. V. 39. № 2. P.88-94,
 394. Vallabhaneni, K.C., Haller, H., Dumler, I. Vascular smooth muscle cells initiate proliferation of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes // *Stem Cells Dev*. 2012. V. 21. № 17. P.3104-13,
 395. Vallabhaneni, K.C., Haller, H., Dumler, I. Vascular smooth muscle cells initiate proliferation of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes // *Stem Cells Dev*. 2012. V. 21. № 17. P.3104-13,
 396. Van Kampen, J.M., Eckman, C.B. Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior // *J Neurosci*. 2006. V. 26. № 27. P.7272-80,
 397. van Velthoven, C.T., Braccioli, L., Willemsen, H.L., Kavelaars, A., Heijnen, C.J. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells after neonatal hypoxic-ischemic brain damage // *Mol Ther*. 2014. V. 22. № 3. P.645-654,
 398. Vassilopoulos, G., Wang, P.R., Russell, D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion // *Nature*. 2003. V. 422. № 6934. P.901-4,
 399. Venkataramana, N.K., Kumar, S.K., Balaraju, S., Radhakrishnan, R.C., Bansal, A., Dixit, A., Rao, D.K., Das, M., Jan, M., Gupta, P.K., Totey, S.M. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease // *Transl Res*. 2010. V. 155. № 2. P.62-70,
 400. Venkataramana, N.K., Pal, R., Rao, S.A., Naik, A.L., Jan, M., Nair, R., Sanjeev, C.C., Kamble, R.B., Murthy, D.P., Chaitanya, K. Bilateral transplantation of allogenic adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the subventricular zone of Parkinson's disease: a pilot clinical study // *Stem Cells Int*. 2012. V. 2012. P.931902
 401. Vercelli, A., Mereuta, O.M., Garbossa, D., Muraca, G., Mareschi, K., Rustichelli, D., Ferrero, I., Mazzini, L., Madon, E., Fagioli, F. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis // *Neurobiol Dis*. 2008. V. 31. № 3. P.395-405,
 402. Vives-Bauza, C., Andreu, A.L., Manfredi, G., Beal, M.F., Janetzky, B., Gruenewald, T.H., Lin, M.T. Sequence analysis of the entire mitochondrial genome in Parkinson's disease // *Biochem Biophys Res Commun*. 2002. V. 290. № 5. P.1593-601,
 403. Vorobjev, I.A., Zorov, D.B. Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum // *FEBS Lett*. 1983. V. 163. № 2. P.311-4,
 404. Vu, Q., Xie, K., Eckert, M., Zhao, W., Cramer, S.C. Meta-analysis of preclinical studies of

- mesenchymal stromal cells for ischemic stroke // *Neurology*. 2014. V. 82. № 14. P.1277-86,
405. Wagner, J., Kean, T., Young, R., Dennis, J.E., Caplan, A.I. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics // *Curr Opin Biotechnol*. 2009. V. 20. № 5. P.531-6,
 406. Walczak, P., Zhang, J., Gilad, A.A., Kedziorek, D.A., Ruiz-Cabello, J., Young, R.G., Pittenger, M.F., van Zijl, P.C., Huang, J., Bulte, J.W. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia // *Stroke*. 2008. V. 39. № 5. P.1569-74,
 407. Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. V. 92. № 12. P.5510-4,
 408. Wang, L., Li, Y., Chen, X., Chen, J., Gautam, S.C., Xu, Y., Chopp, M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture // *Hematology*. 2002. V. 7. № 2. P.113-7,
 409. Wang, L.Q., Lin, Z.Z., Zhang, H.X., Shao, B., Xiao, L., Jiang, H.G., Zhuge, Q.C., Xie, L.K., Wang, B., Su, D.M., Jin, K.L. Timing and dose regimens of marrow mesenchymal stem cell transplantation affect the outcomes and neuroinflammatory response after ischemic stroke // *CNS Neurosci Ther*. 2014. V. 20. № 4. P.317-26,
 410. Wang, S.P., Wang, Z.H., Peng, D.Y., Li, S.M., Wang, H., Wang, X.H. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in rats with intracerebral hemorrhage: reduced apoptosis and enhanced neuroprotection // *Mol Med Rep*. 2012. V. 6. № 4. P.848-54,
 411. Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., Grompe, M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes // *Nature*. 2003. V. 422. № 6934. P.897-901,
 412. Wang, Y., Chen, X., Cao, W., Shi, Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications // *Nat Immunol*. 2014. V. 15. № 11. P.1009-16,
 413. Wang, Y., Cui, J., Sun, X., Zhang, Y. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation // *Cell Death Differ*. 2011. V. 18. № 4. P.732-42,
 414. Weimann, J.M., Johansson, C.B., Trejo, A., Blau, H.M. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant // *Nat Cell Biol*. 2003. V. 5. № 11. P.959-66,
 415. Wenisch, S., Trinkaus, K., Hild, A., Hose, D., Heiss, C., Alt, V., Klisch, C., Meissl, H., Schnettler, R. Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation // *Bone*. 2006. V. 38. № 6. P.911-21,
 416. Werr, J., Xie, X., Hedqvist, P., Ruoslahti, E., Lindbom, L. beta1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue In vivo // *J Exp Med*. 1998. V. 187. № 12. P.2091-6,
 417. West, A.B., Moore, D.J., Biskup, S., Bugayenko, A., Smith, W.W., Ross, C.A., Dawson, V.L., Dawson, T.M. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat

- kinase 2 augment kinase activity // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. V. 102. № 46. P.16842-7,
418. Whitworth, A.J., Theodore, D.A., Greene, J.C., Benes, H., Wes, P.D., Pallanck, L.J. Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a *Drosophila* model of Parkinson's disease // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. V. 102. № 22. P.8024-9,
 419. Willing, A.E., Lixian, J., Milliken, M., Poulos, S., Zigova, T., Song, S., Hart, C., Sanchez-Ramos, J., Sanberg, P.R. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke // *J Neurosci Res*. 2003. V. 73 . № 3. P.296-307,
 420. Willing, A.E., Vendrame, M., Mallery, J., Cassady, C.J., Davis, C.D., Sanchez-Ramos, J., Sanberg, P.R. Mobilized peripheral blood cells administered intravenously produce functional recovery in stroke // *Cell Transplant*. 2003. V. 12. № 4. P.449-54,
 421. Wislet-Gendebien, S., Hans, G., Leprince, P., Rigo, J.M., Moonen, G., Rogister, B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype // *Stem Cells*. 2005. V. 23. № 3. P.392-402,
 422. Wolff, E.F., Gao, X.B., Yao, K.V., Andrews, Z.B., Du, H., Elsworth, J.D., Taylor, H.S. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model // *J Cell Mol Med*. 2011. V. 15. № 4. P.747-55,
 423. Wolff, E.F., Mutlu, L., Massasa, E.E., Elsworth, J.D., Eugene Redmond, D. Jr, Taylor, H.S. Endometrial stem cell transplantation in MPTP- exposed primates: an alternative cell source for treatment of Parkinson's disease // *J Cell Mol Med*. 2015. V. 19. № 1. P.249-56,
 424. Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J., Black, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons // *J Neurosci Res*. 2000. V. 61. № 4. P.364-70,
 425. Woodside, D.G., Kram, R.M., Mitchell, J.S., Belsom, T., Billard, M.J., McIntyre, B.W., Vanderslice, P. Contrasting roles for domain 4 of VCAM-1 in the regulation of cell adhesion and soluble VCAM-1 binding to integrin $\alpha 4\beta 1$ // *J Immunol*. 2006. V. 176. № 8. P.5041-9,
 426. Wu, X.S., Masedunskas, A., Weigert, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Hammer, J.A. Melanoregulin regulates a shedding mechanism that drives melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. V. 109. № 31. P.E2101-9,
 427. Xin, H., Li, Y., Buller, B., Katakowski, M., Zhang, Y., Wang, X., Shang, X., Zhang, Z.G., Chopp, M. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth // *Stem Cells*. 2012. V. 30. № 7. P.1556-64,
 428. Xin, H., Li, Y., Cui, Y., Yang, J.J., Zhang, Z.G., Chopp, M. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats // *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013. V. 33. № 11. P.1711-5,

429. Xin, H., Li, Y., Liu, Z., Wang, X., Shang, X., Cui, Y., Zhang, Z.G., Chopp, M. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles // *Stem Cells*. 2013. V. 31. № 12. P.2737-46,
430. Xin, H., Li, Y., Liu, Z., Wang, X., Shang, X., Cui, Y., Zhang, Z.G., Chopp, M. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles // *Stem Cells*. 2013. V. 31. № 12. P.2737-46,
431. Xing, C., Arai, K., Lo, E.H., Hommel, M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke // *Int J Stroke*. 2012. V. 7. № 5. P.378-85,
432. Yang, H., Xie, Z., Wei, L., Yang, H., Yang, S., Zhu, Z., Wang, P., Zhao, C., Bi, J. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells rescue memory deficits and reduce amyloid-beta deposition in an AbetaPP/PS1 transgenic mouse model // *Stem Cell Res Ther*. 2013. V. 4. № 4. P.76
433. Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J.W., Yang, L., Beal, M.F., Vogel, H., Lu, B. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. V. 103. № 28. P.10793-8,
434. Yasuda, K., Khandare, A., Burianovskyy, L., Maruyama, S., Zhang, F., Nasjletti, A., Goligorsky, M.S. Tunneling nanotubes mediate rescue of prematurely senescent endothelial cells by endothelial progenitors: exchange of lysosomal pool // *Aging (Albany NY)*. 2011. V. 3. № 6. P.597-608,
435. Yavagal, D.R., Lin, B., Raval, A.P., Garza, P.S., Dong, C., Zhao, W., Rangel, E.B., McNiece, I., Rundek, T., Sacco, R.L., Perez-Pinzon, M., Hare, J.M. Efficacy and dose-dependent safety of intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells in a rodent stroke model // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 5. P.e93735
436. Yeo, R.W., Lai, R.C., Zhang, B., Tan, S.S., Yin, Y., Teh, B.J., Lim, S.K. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery // *Adv Drug Deliv Rev*. 2013. V. 65. № 3. P.336-41,
437. Zangi, L., Rivkin, R., Kassis, I., Levdansky, L., Marx, G., Gorodetsky, R. High-yield isolation, expansion, and differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells with fibrin microbeads // *Tissue Eng*. 2006. V. 12. № 8. P.2343-54,
438. Zanjani, E.D., Flake, A.W., Almeida-Porada, G., Tran, N., Papayannopoulou, T. Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4-dependent function // *Blood*. 1999. V. 94. № 7. P.2515-22,
439. Zhang, L., Li, Y., Zhang, C., Chopp, M., Gosiewska, A., Hong, K. Delayed administration of human umbilical tissue-derived cells improved neurological functional recovery in a rodent model of focal ischemia // *Stroke*. 2011. V. 42. № 5. P.1437-44,
440. Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., Deng, W., Zhao, R.C. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells // *Stem Cells Dev*. 2004. V. 13. № 3. P.263-71,

441. Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L., Davies, K.J. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase // J Biol Chem. 1990. V. 265. № 27. P.16330-6,
442. Zhang, Z.G., Zhang, L., Jiang, Q., Chopp, M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse // Circ Res. 2002. V. 90. № 3. P.284-8,
443. Zhang, Z.Q., Hu, Y., Wang, B.J., Lin, Z.X., Naus, C.C., Nicholson, B.J. Effective asymmetry in gap junctional intercellular communication between populations of human normal lung fibroblasts and lung carcinoma cells // Carcinogenesis. 2004. V. 25. № 4. P.473-82,
444. Стародубцева, О.С., Бегичева, С.В. Анализ заболеваемости инсультом с использованием информационных технологий // Фундаментальные исследования. 2012. V. 8-2. P.424-427,