

**Нуркенов Т.Т.<sup>1</sup>, Аскарлова Ш.Н.<sup>2</sup>, Цой А.К.<sup>3</sup>, Шалахметова Т.М.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>PhD докторант кафедры биоразнообразия и биоресурсов

КазНУ им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы, e-mail: nur-t@inbox.ru

<sup>2</sup>к.б.н., PhD, заведующая Лабораторией биоинженерии и регенеративной медицины, ЧУ «National Laboratory Astana», АОО «Nazarbayev University», Казахстан, г. Астана, e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

<sup>3</sup>PhD., научный сотрудник Лаборатории биоинженерии и регенеративной медицины ЧУ «National Laboratory Astana», АОО «Nazarbayev University», Казахстан, г. Астана, e-mail: andrey.tsoy@nu.edu.kz

<sup>4</sup>д.б.н., профессор кафедры биоразнообразия и биоресурсов

КазНУ им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы, e-mail: tamara.shalakhmetova@kaznu.kz

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК  
В ТЕРАПИИ ИНСУЛЬТА**

В настоящей обзорной статье приводятся и анализируются результаты завершенных и продолжающихся клинических исследований мезенхимальных стволовых клеток (MSC) в качестве безопасной и потенциально эффективной технологии терапии инсульта у людей. Инсульт, как известно, является основной причиной инвалидности трудоспособного населения. От четверти до половины переживших инсульт людей остаются со значительными нарушениями здоровья. Традиционные методы лечения приносят пользу лишь небольшой части пациентов. В настоящее время потенциальной регенеративной стратегией для пациентов с неврологическим дефицитом может служить терапия стволовыми клетками, в том числе, мезенхимальными стволовыми клетками. MSC, как известно, способны к самообновлению и дифференцировке в тканеспецифические клетки, участвуют в развитии, поддержании и восстановлении тканей, что привлекает к ним внимание как к потенциальным источникам в регенеративной терапии многих заболеваний, включая инсульт. MSC, путем включения в индукцию ангиогенеза, стимулируя нейрогенез, иммуномодуляцию, предотвращение апоптоза, могут в значительной степени нивелировать патологические процессы, связанные с развитием инсульта. Анализ доклинических исследований, изучающих эффекты MSC-терапии после ишемического инсульта, показывает, что MSC благотворно влияют на восстановление от инсульта.

**Ключевые слова:** инсульт, мезенхимальные стволовые клетки, регенеративная терапия, терапия стволовыми клетками, растительные антиоксиданты.

Nurkenov T.T.<sup>1</sup>, Askarova Sh.N.<sup>2</sup>, Tsoy A.K.<sup>3</sup>, Shalakhmetova T.M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>PhD-doctorate, Department of Biodiversity and Bioresources,

Al-Farabi KazNU, Kazakhstan, Almaty, e-mail: nur-t@inbox.ru

<sup>2</sup>C.Bi.Sci., PhD, Head of the Laboratory of Bioengineering and Regenerative Medicine,

National Laboratory of Astana, Nazarbayev University, Kazakhstan, Astana, e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

<sup>3</sup>PhD., Researcher of the Laboratory of Bioengineering and Regenerative Medicine,

National Laboratory of Astana, Nazarbayev University, Kazakhstan, Astana, e-mail: andrey.tsoy@nu.edu.kz

<sup>4</sup>D.Bi.Sci., professor, Department of Biodiversity and Bioresources,

Al-Farabi KazNU, Kazakhstan, Almaty, e-mail: tamara.shalakhmetova@kaznu.kz

**Prospects for the use of mesenchymal stem cells in stroke therapy**

This review article presents and analyzes the results of completed and ongoing clinical studies of mesenchymal stem cells (MSC) as a safe and potentially effective technology for treating stroke in humans. Stroke is known to be the main cause of disability of the working population. Between a quarter and half of stroke survivors are people with significant health problems. Traditional treatments benefit only a small fraction of patients. Currently, stem cell therapy, including mesenchymal stem cells, can

serve as a potential regenerative strategy for patients with neurological deficit. MSCs are known to be capable of self-renewal and differentiation into tissue-specific cells, are involved in the development, maintenance and repair of tissues, which draws attention to them as potential sources in the regenerative therapy of many diseases, including stroke. MSC, by including in the induction of angiogenesis, stimulation of neurogenesis, immunomodulation, prevention of apoptosis, can largely offset the pathological processes associated with the development of stroke. An analysis of preclinical studies examining the effects of MSC therapy after ischemic stroke shows that MSC has a beneficial effect on recovery from stroke.

**Key words:** stroke, mesenchymal stem cells, regenerative therapy, stem cell therapy, herbal antioxidants.

Нуркенов Т.Т.<sup>1</sup>, Аскарлова Ш.Н.<sup>2</sup>, Цой А.К.<sup>3</sup>, Шалахметова Т.М.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>биоалуанүрлілік және биоресурстар кафедрасының PhD-докторанты,

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ., e-mail: nur-t@inbox.ru

<sup>2</sup>б.ғ.к., PhD, Биоинженерия және реанимациялық медицина зертханасының меңгерушісі,

«Астана ұлттық зертханасы», «Назарбаев Университеті», Қазақстан, Астана қ., e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

<sup>3</sup>PhD., Биоинженерия және регенеративті медицина зертханасының ғылыми қызметкері,

«Астана ұлттық зертханасы», «Назарбаев Университеті», Қазақстан, Астана қ., e-mail: andrey.tsouy@nu.edu.kz

<sup>4</sup>б.ғ.д., биоалуанүрлілік және биоресурстар кафедрасының профессоры,

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ., e-mail: tamara.shalakhmetova@kaznu.kz

### Инсультті емдеуде мезенхималды бағаналы жасушаларды қолдану болашағы

Бұл мақалада мезенхималды бағаналы жасушалардың (MSC) аяқталған және жалғасып келе жатқан клиникалық зерттеулерінің нәтижелері адамға инсультті емдеу үшін қауіпсіз және ықтимал тиімді технология ретінде қарастырылады және талданады. Инсульт жұмысқа жарамды халықтың мүгедектігінің негізгі себебі болып табылады. Инсульттан аман қалғандар ішінде төрттің бірінен жартысына дейін айтарлықтай денсаулыққа қатысты мәселелері бар адамдар. Дәстүрлі емдеу тәсілдері пациенттердің аз ғана бөлігіне пайдалы болып табылады. Қазіргі уақытта бағаналы жасушалар терапиясы, оның ішінде мезенхималды бағаналы жасушалар неврологиялық тапшылығы бар науқастар үшін әлеуетті регенеративті стратегия ретінде қызмет етуі мүмкін. MSC өздігінен жаңартылуына және тінге тән жасушаларға саралануына қабілетті екендігі белгілі, олар тіндерді дамытуға, күтуге және жөндеуге қатысады, олар көптеген аурулардың, соның ішінде инсульттің регенеративті терапиясында әлеуетті көздер ретінде қарастырады. MSC ангиогенезді индукциялауына қатысып, нейрогенез бен иммуномодуляцияны ынталандыру, апоптоздың алдын алу арқылы, инсультты дамытуға байланысты патологиялық процестерді өтей алады. Инсульттан кейінгі МСК терапиясының әсерін зерттейтін преคลินิกлық зерттеулерді талдау МСК-ның инсульттан қалпына келтіруге оң әсері бар екенін көрсетеді.

**Түйін сөздер:** инсульт, мезенхималды бағаналы жасушалар, қалпына келтіру терапиясы, бағаналы жасушалар терапиясы, шөптік антиоксиданттар.

### Введение

Инсульт – вторая по распространенности причина смерти [1] и основная причина инвалидности, приобретенной взрослыми во всем мире [2, 3]. По оценкам ВОЗ, прямые и косвенные затраты на диагностику, лечение и реабилитацию больных инсультом составляют более 50 млрд. долларов США в год только в Соединенных Штатах [4]. В настоящее время единственным эффективным лекарственным средством, одобренным для лечения острого ишемического инсульта, является рекомбинантный тканевой активатор плазминогена (tPA) [5, 6]. К сожалению, временное окно для терапевтического применения tPA составляет всего 4,5 часа, и в результате только 1 из 20 пациентов с острым ишемическим

инсультом в настоящее время получают эту терапию в Соединенных Штатах [7]. Более того, примерно половина пациентов, которые получают tPA, имеют значительную продолжительную инвалидность. В связи с этим, во всем мире осуществляется поиск и разработка новых методов лечения с целью снижения инвалидности от инсульта. Одной из них является реабилитационная терапия с использованием мезенхимальных стволовых клеток (MSC).

MSC – мультипотентные стромальные клетки представляют собой взрослые негемопоэтические плюрипотентные клетки, которые вовлекаются в клеточную терапию благодаря множеству путей их действия на патологические процессы, происходящие во время инсульта в центральной нервной системе (ЦНС) [8].

Мезенхимальные стромальные клетки получают из нескольких источников, прежде всего, из костного мозга, а также из тканей, которые включают жировую, пуповинную кровь, плацентарную ткань, зубные зачатки и печеночную ткань [9, 10]. Мезенхимальные стромальные клетки могут дифференцироваться в несколько мезодермальных линий и при определенных условиях также могут дифференцироваться в клетки, которые обладают фенотипическими характеристиками нейронов, глии и эндотелия [11, 12, 13]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что MSC способствуют восстановлению функции мозга после инсульта и делают это с помощью нескольких различных механизмов, таких как трансдифференцировка, индукция нейрогенеза и ангиогенеза, нейропротекция и активация эндогенных нейровосстановительных процессов [14]. В данном обзоре рассматривается обширный опыт в области терапии на основе применения MSC, в том числе их обнадеживающий профиль безопасности в доклинических и клинических исследованиях, где основное внимание уделяется лечению ишемического инсульта, особенно в отношении восстановления после его развития.

#### **Терапевтическое применение мезенхимальных стволовых клеток**

Трансплантация MSC у пациентов началась в 1995 году, причем в большинстве ранних исследований основное внимание уделялось потенциальным преимуществам аутологичных MSC при использовании гемопоэтических стволовых клеток в условиях гематологической злокачественности. При этом трансплантация способствовала ускорению восстановления гемопоэза, восстанавливая кроветворную среду, уменьшала риск отторжения трансплантата и заболеваемость острой РТПХ (трансплантат против хозяина) [15]. Отсутствие побочных эффектов позволило использовать MSC у пациентов с другими патологиями [16]. В настоящее время изучается потенциальная терапевтическая роль MSC при ряде заболеваний: рассеянном склерозе, инфаркте миокарда, диабете 1 типа [15, 17]. Из-за способности MSC дифференцироваться в различные виды кардиомиоцитов (сократительные, пейсмекерные, проводящие, секреторные) *in vitro*, а также надежной секрецией ими биоактивных молекул, стало возможным их применение для лечения инфаркта миокарда на разных стадиях [15]. Многие клинические ис-

следования показали значительное улучшение функции желудочков после внутрикороной инъекции MSC при остром инфаркте миокарда [16]. Однако остается открытым вопрос, связаны ли эти результаты с прямой интеграцией MSC в миокард или с паракринными эффектами выделяемых ими БАВ. Исследователям предстоит решить данные вопросы, а также, помимо прочего, установить безопасность и эффективность MSC при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Наиболее значимое клиническое применение MSC на сегодняшний день установлено при реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). У 40% детей, которые получают аллогенные трансплантаты костного мозга, иммунные клетки в трансплантированном материале могут атаковать клетки хозяина. Это зачастую приводит к угрожающим жизни осложнениям, поэтому, чаще всего, они получают иммуносупрессивные препараты, например, кортикостероиды [18]. У пациентов, невосприимчивых к методам лечения на основе стероидов, стали применять MSC в связи с обнаруженными у них иммуномодулирующими эффектами к трансплантату. В 2012 году терапия на основе MSC была официально одобрена для использования у детей с РТПХ в Канаде и Новой Зеландии [15]. Данная терапия стволовыми клетками для системного заболевания показала клинически значимые результаты у 64% пациентов. Необходимость такой терапии исходит из того факта, что уровень смертности от РТПХ, устойчивой к стероидам, достигает 85% [18]. Одобрение MSC для лечения РТПХ свидетельствует не только об их безопасности, но и способности эффективной терапии заболевания, не поддающегося традиционным методам лечения. Исходя из данных наблюдений, можно предположить, что терапевтический потенциал MSC вскоре будет реализован для многих заболеваний.

#### **Механизмы действия мезенхимальных стволовых клеток в терапии инсульта**

Экспериментальное обоснование использования MSC в терапии инсульта включает в себя ряд различных механизмов действия, таких как дифференциация на различные типы клеток, необходимых для восстановления, модуляция иммунной системы, индукция ангиогенеза и нейрогенеза, секреция нейропротекторных и нейротрофических факторов [15]. Общим для эффектов MSC в ЦНС и других тканях является их способность избирательно воздействовать на

области повреждений. Поэтому взрослые стволовые клетки могут быть хорошим выбором для терапии инсульта, поскольку они секретируют разнообразные биологически активные вещества, включая трофические факторы и внеклеточные везикулы (EVs, круговые мембранные фрагменты размером 0,1-1 мкм, отделившиеся с поверхности клетки), в поврежденный мозг, вызывая нейрогенез, ангиогенез и синаптогенез [19-21]. Кроме того, как было отмечено, трансплантируемые MSC **вызывают ослабление воспаления** [22], уменьшение толщины рубца [23], усиление аутофагии [24], нормализацию метаболических профилей [25] и, возможно, замену поврежденных клеток [26] при различных заболеваниях головного мозга.

Критическим ограничением терапии взрослыми стволовыми клетками при инсульте является отсутствие полного понимания механизма действия, опосредующего наблюдаемые терапевтические преимущества. Эмбриональные стволовые клетки (ESCs) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs) могут заменить недостающие клетки головного мозга в области инфаркта [19]. Однако установлено, что существуют препятствия, связанные с истинной заменой нейронов для восстановления нейронной функции после инсульта [27], а терапия ESC/iPSC может приводить к образованию опухолей. Более того, доклинические исследования показали, что большинство трансплантированных клеток исчезают из ткани мозга в течение нескольких недель [28].

Первоначальные исследования *in vitro* показали, что MSC способны дифференцироваться в клетки множественных зародышевых линий, включая нейронные и глиальные клетки, что приводит к надежде на то, что трансдифференцировка трансплантированного MSC может сыграть роль в улучшении результатов после инсульта [13, 29]. *In vitro* также было описано дифференцирование MSC в эндотелий. Несколько групп ученых описали экспрессию нейронных и глиальных маркеров MSC в ЦНС после трансплантации при инсульте в моделях на грызунах [30, 31, 32]. Также сообщалось об экспрессии белка, связанного с рецептором гамма-аминомасляной кислоты, белка синаптического рецептора [33]. Однако доказательства того, что MSC становятся полноценными функциональными заменами для нейронов или глии, отсутствуют. Например, MSC не образуют каналы с ионным возбуждением, необходимые для генерации потенциалов действия [34], а

улучшение поведенческого результата, обнаруженное при введении MSC через 24 часа после начала инсульта, не сопровождается уменьшением объема инфаркта, вопреки ожиданиям [14, 35, 36]. По-видимому поведенческое состояние окончательно улучшается на основе нейронной пластичности без сопутствующего уменьшения объема инфаркта [37, 38]. В целом вопрос о том, дифференцируются ли MSC непосредственно в нейроны и глиальные клетки, которые заменяют поврежденную ткань ЦНС после инсульта, предстоит доказать [29, 39].

Существует мнение, что участие MSC в восстановлении после инсульта связано с повышенной пролиферацией клеток в субвентрикулярной и субгранулярной зонах, что предполагает мобилизацию эндогенных предшественников нейронов. Это подтверждает важную роль MSC в пролиферации, дифференцировке и миграции новых нейронов из первичного источника в поврежденные участки. Значительное увеличение новых клеток присутствует в субвентрикулярной зоне после ишемии и еще более усиливается при лечении MSC [31, 40]. Паракринная секреция MSC способствует выживанию некоторых клеток мозга, включая нейроны, и способствуют пролиферации других клеток, например, глии [41]. MSC также может ограничить вторичную нейродегенерацию после инсульта [42]. Интересен тот факт, что MSC могут увеличивать пластичность неповрежденных нейронов и активировать астроглиальные клетки, чтобы индуцировать секрецию нейропротекторных молекул. MSC устойчиво и специфически повышают уровень нейротрофического фактора глиальных клеток в культуре астроцитов *in vitro* [43]. Установлено, что MSC после трансплантации через кровь достигают область ишемического мозга и активируют гены, экспрессия которых усиливает нейрогенез, ангиогенез и синаптогенез [44]. Кроме того, обнаружено, что компоненты внеклеточного матрикса, такие как фибронектин, секретируемый MSC, могут также способствовать выживанию и синаптогенезу нейронов окружающей зоны (пенумбры), что указывает на другие функциональные возможности MSC в ЦНС, кроме замены клеток [45]. Можно заключить, что эти результаты подтверждают роль MSC в регуляции числа клеток после инсульта, независимо от того, включает ли это прямую замену погибших клеток или косвенные механизмы репарации повреждения.

Ишемический инсульт вызывает сильный воспалительный ответ, который приводит к по-

следующему привлечению лейкоцитов в зону инфаркта [46]. Мезенхимальные стромальные клетки также являются иммуномодулирующими, в частности, были обнаружена способность ослаблять как врожденные, так и адаптивные иммунные ответы. Кроме того, воздействие MSC на цитокины, такие как интерферон- $\gamma$ , способствует иммунорегуляторному фенотипу MSC, что приводит к дальнейшему подавлению Т-клеток или естественных клеток-киллеров [47]. Эксперименты *in vitro* показали явное снижение пролиферации лейкоцитов и изменений в дифференцировке при сокультивировании с MSC [48].

Важно отметить, что многие из эффектов, которые MSC оказывает на иммунную систему, напрямую связаны с процессами, лежащими в основе нейронного восстановления после инсульта. Например, MSC содействует прекращению воспалительных явлений постинсультной воспалительной среды, которая может препятствовать восстановлению, и может смещать профили макрофагов на те, которые более благоприятны для восстановления [49]. Ключевой особенностью трансфузии MSC является отдаленный эффект, который эти клетки могут оказывать на иммунологическую функцию. Например, системно вводимый MSC может быть захвачен в легких, но обладать иммуномодулирующим действием на отдаленные органы, включая мозг [50, 51]. Интересно, что селезенка играет важную роль в опосредовании системного иммунного ответа на ишемический инсульт; спленэктомия приводит к значительному уменьшению нейродегенерации и снижению иммунного ответа после окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) у крыс [52]. Заметное накопление MSC в селезенке после внутривенного введения намекает на возможные роли системной иммуномодуляции здесь [53], хотя эта гипотеза еще не проверена.

Мезенхимальные стромальные клетки экспрессируют молекулы HLA на очень низких уровнях [54]. В результате MSC являются иммунопривилегированными – их активность не меняется в зависимости от степени соответствия МНС между донором и реципиентом. Поэтому многие из их иммуномодулирующих эффектов наблюдаются как в аутологичной, так и в аллогенной обстановке, что предполагает широкое терапевтическое применение. Однако сообщения об иммунных реакциях, стимулируемые MSC, предполагают, что это может быть относительное, а не абсолютное свойство [55], хотя

MSC не показывают признаков иммунологической сенсibilизации в головном мозге при назначении после инсульта [50].

Влияние MSC на иммунный ответ во время инсульта непосредственно исследовали сравнительно немногие работы. Было отмечено снижение рекрутирования макрофагов и активация врожденного иммунного ответа после инсульта [56]. Потребность в таких исследованиях подчеркивается тем фактом, что воздействие MSC на иммунную систему может варьироваться в зависимости от уровня специфического хемокина, условий заболевания и видов [57, 58]. Эта необходимость еще более подчеркивается тем фактом, что, по крайней мере, для MSC, данных в первые дни после начала инсульта, любые эффекты MSC на иммунную систему должны интерпретироваться в контексте состояния иммуносупрессии, которое возникает после инсульта [59].

Считается, что ангиогенез внутри зоны инфаркта и окружающей пенумбры играет ключевую роль в обеспечении выживания и регенерации нейронов после инсульта. Мезенхимальные стромальные клетки выделяют разнообразные цитокины, многие из которых являются проангиогенными. Хотя точные субстанции могут различаться в зависимости от источника клеток, неоднократно описывалась секреция фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), основного фактора роста фибробластов и фактора роста плаценты [60, 61]. Интересно, что многие ангиогенные факторы имеют дополнительные нейротекторные свойства. Например, VEGF не только индуцирует ангиогенез, но также является противовоспалительным и способствует рекрутированию и дифференциации эндогенных предшественников нейронов [62]. Широкие эффекты ангиогенных молекул могут поэтому помочь объяснить различные терапевтические преимущества MSC при инсульте. Кроме того, MSC обладают сходством с перицитами, которые могут позволить трансплантированным MSC иметь дополнительные роли, связанные с посттравматическим восстановлением нервной системы, такие как поддержание сосудистого питания и поддержка нормального взаимодействия перицитов с астроцитами и эндотелием для поддержания целостности гематоэнцефалического барьера [63].

Было обнаружено, что мезенхимальные стромальные клетки, полученные после экспериментального инсульта, выделяют большое количество нейротекторных и нейротрофических

факторов, которые способствуют восстановлению через многочисленные пути. В соответствии с этим введение MSC-кондиционированных носителей воспроизводит многие эффекты прямой трансплантации MSC [64, 65]. Таким образом, MSC служат в качестве платформы доставки для широкого спектра секретлируемых молекул, действующих синергически и параллельно по нескольким биологическим путям. Ряд факторов, секретлируемых MSC, влияют на выживаемость и пролиферацию клеток после инсульта. Инсульт приводит к некрозу и апоптозу нейронов, эндотелиальных и глиальных клеток. Исследования последовательно обнаружили, что MSC, введенные после инсульта, уменьшают апоптоз и увеличивает пролиферацию нескольких типов клеток, включая эндогенные нейронные стволовые клетки и глию [40, 56, 66]. Это, вероятно, происходит как посредством секреции факторов выживания, так и антиапоптотических факторов и посредством не прямой стимуляции паренхиматозных клеток ЦНС для секреции нейротрофических, нейропротекторных и проолигодендрогенных факторов [31, 67, 68], например, инсулиноподобного фактора роста 1, нейротрофического фактора мозга, эпидермального фактора роста и фактора стволовых клеток [40, 69, 70, 71]. Особенно важным косвенным эффектом MSC при инсульте может быть индукция tPA в астроцитах, что способствует росту нейритов и нейропротекции [72]. Секреция MSC ангиогенных факторов, таких как VEGF, может иметь дополнительную роль в смысле реабилитации [62]. Результатом этой деятельности MSC является увеличение нейрогенеза, улучшение целостности белого вещества и синаптогенез [14].

#### **Источники мезенхимальных стволовых клеток**

Большинство исследований на животных по трансплантации MSC при инсульте использовали MSC, полученный из костного мозга, в меньшей степени изучая MSC, полученные из жировой ткани или пуповины [73]. К сожалению, было проведено сравнительно небольшое количество исследований, непосредственно сравнивающих относительную эффективность MSC, полученной из нескольких источников в условиях инсульта. Эти другие источники MSC помимо костного мозга или аллогенных MSC от молодых доноров могут быть привлекательны с учетом очевидного снижения количества и функций MSC из костного мозга у лиц пожилого

возраста. Обе жировая ткань и пуповина являются перспективными источниками MSC. Сообщалось, что стволовые клетки, полученные из жировой ткани (ADSC), обладают некоторыми преимуществами по сравнению с стволовыми клетками, полученными из костного мозга. В экспериментах на мышах, которые подверглись ОСМА с MSC, полученными либо из жировой ткани, либо из костного мозга, было обнаружено, что клетки из жировой ткани не только способствовали уменьшению объема инфаркта головного мозга и неврологического восстановления, но также проявляли большую независимость от донорского возраста [74]. Относительно большое количество ADSC можно отделить от подкожной жировой ткани с минимально инвазивными процедурами.

Для MSC из пуповины были характерны преимущественно секретлируемые факторы, связанные с нейропротекцией, нейрогенезом и ангиогенезом [75, 76], а также благоприятные возможности дифференциации и низкий иммунитет. Если предположить, что в будущем в клинике будут использоваться многочисленные источники MSC, необходимо, чтобы дифференцирующая способность, профиль секреции цитокинов и иммуномодулирующие способности MSC, полученные из нескольких тканей, были полностью охарактеризованы и непосредственно сравнивались исходя из результатов.

Трансплантация мезенхимальных стромальных клеток может быть либо аутологичной, или аллогенной. Аутологичная трансплантация имеет небольшой риск иммунореактивности, но требует недель для культивирования и расширения клеток для трансплантации, что серьезно ограничивает их использование в условиях острого заболевания [77]. Кроме того, MSC, полученные от пациентов с хроническими заболеваниями или преклонным возрастом, что характерно для пациентов с инсультом, постоянно демонстрирует снижение темпов роста в культуре [78]. Вместе с тем, иммунопривилегированность MSC предполагает безопасность аллогенного подхода к их использованию после инсульта [79]. Безопасность аллогенной MSC-терапии может быть тесно связана с их кратковременным существованием у хозяина после применения. В подтверждение тому, клинические исследования у людей со многими различными болезненными состояниями установили, что трансплантация аллогенных MSC безопасна [80]. Аллогенные MSC могут быть стандартизированы с точки зрения производства, а также различаться по

степени их пролиферации и нейрореактивной способности, по сравнению с клетками, полученными от пожилых пациентов с хроническими заболеваниями. Использование аллогенных MSC уменьшает время, необходимое для получения достаточного количества клеток. В клинических исследованиях при внутривенном применении аллогенных стволовых клеток (MultiStem®) у пациентов с острым инсультом стволовые клетки применялись в течение 24-48 часов после появления симптомов [81]. На животных моделях были показаны функциональные преимущества аллогенных перед аутологичными MSC [82]. У крыс, которые подверглись ОСМА, MSC способствовали развитию ангиогенеза и улучшению исхода заболевания и [83]. Это указывает на то, что инсульт может влиять на экспрессию нейротрофических или ангиогенных молекул в эндогенных MSC *in vivo*. Однако существуют и противоречивые результаты. После контакта с сывороткой хозяина аллогенные MSC могут активировать комплемент врожденного иммунитета и быть им повреждены, что приводит к их цитотоксичности и дисфункции, а жизнеспособность аллогенных MSC после инфузии значительно снижается по сравнению с аутологичными MSC [84]. Это позволяет предположить, что аутологичные MSC могут иметь преимущества перед аллогенными MSC, и что ингибирование активации комплемента может стать одной из стратегий по улучшению существующих методов лечения на основе MSC.

#### **Динамика распределения введенных мезенхимальных стволовых клеток**

После инсульта целостность сосудов мозга нарушается, что может привести к накоплению MSC в мозге через пассивный захват [51]. При этом еще предстоит выяснить в какой степени и как MSC пересекает гематоэнцефалический барьер. Молекулы размером более 400 Да не могут проходить через ГЭБ, что может повлиять на эффективность клеточной терапии у пациентов с инсультом. Однако результаты терапии может улучшить через внутривенное совместное введение стволовых клеток и маннита, осмотического агента, который может регулировать проницаемость ГЭБ. В модельных экспериментах было показано, что манипуляции с ГЭБ с использованием внутривенно маннита до лечения MSC привели к увеличению уровней трофических факторов в пораженном мозге [85]. Кроме того, насколько хоуминг и приживание в области

травмы необходимы для MSC при обеспечении терапевтической эффективности, также не полностью понятно. Как указывалось, мезенхимальные стромальные клетки могут иметь отдаленные иммуномодулирующие эффекты, например MSC, захваченные в легких, активируются и влияют на функцию иммунной системы, в частности секретировав противовоспалительный белок TSG-6, подавляющий чрезмерный воспалительный ответ [50, 51], что позволяет предположить, что эффекты MSC при инсульте могут быть реализованы в отсутствие значительного набора MSC в области инфаркта [86].

Необходимо отметить, что способ применения стволовых клеток может существенно влиять на количество клеток, доставленных в целевые области, а также на частоту побочных эффектов. После инсульта MSC можно вводить локально, то есть путем прямой инъекции в пораженную область мозга (внутричерепное введение), или через венозные или артериальные пути. При этом достижение MSC очага повреждения мозга зависит от способа их введения, то есть маршрута доставки. Установлено, что мезенхимальные стромальные клетки избирательно притягиваются к участкам травм и воспаления [87], благодаря выработке воспалительных цитокинов микроокружением поврежденной ткани мозга, например SDF-1 (стромальный фактор-1), экспрессируемый в астроцитах, нейронах и эндотелии [88] и существованию хемокиновых рецепторов, экспрессирующихся в МСК, например CXCR4 (рецептор SDF-1) [89]. В условиях *in vitro* также можно вызвать миграцию MSC, подвергая их гипоксии [90].

Мезенхимальные стромальные клетки представляют собой относительно большие клетки с диаметром от 10 до 30 мкм [91]. Поэтому большая часть внутривенно введенных МСК обычно попадает в легкие и пассивно захватываются в их сосудистой системе, формируя эмболы в кровеносных сосудах легкого из-за их большого размера и наличия рецепторов адгезии на клеточной поверхности, что может прерывать кровотоки на прекапиллярном уровне. Несмотря на эти осложнения, исследования показывают положительные результаты после системной инфузии MSC [53], поскольку после инсульта MSC также направляются в области поражения головного мозга [50], где большинство из них находится в ишемическом ядре и его пограничной зоне. Эта ткань является потенциально жизнеспособной, где происходят множественные процессы восстановления клеток. В частности

MSC восстанавливают белое вещество и способствуют росту аксонов и ремиелинизации в ЦНС, что тесно связано с функциональным восстановлением Впоследствии, через год после инсульта, большинство выживших MSC находится в ишемическом мозге, присутствуя в очень малых количествах в других органах [92].

Эти результаты были подтверждены МРТ-визуализацией всего тела при введении внутривенно радиоактивно меченого MSC крысам с ОСМА и без инсульта, а также биолюминесцентной визуализацией, которая позволяет неинвазивно отслеживать распределение инъецированных MSC и их потомства по всему организму в течение нескольких дней. В течение первых 2 часов после инсульта MSC временно задерживаются в легких, а затем обнаруживаются в области ишемии мозга [53]. Таким образом, точное распределение MSC различается в зависимости от пути их введения [93]. Внедрение MSC по внутриартериальному или внутримозговому пути уменьшает предотвращение легочных эффектов и, следовательно, приводит к меньшему количеству MSC в легких, но эти подходы более инвазивны и поэтому приводят к определенным рискам, а также MSC могут вызывать микросудистую обструкцию [94]. Несмотря на то, что отдельные исследователи сравнивали эффективность различных путей доставки MSC, необходимы дальнейшие экспериментальные доказательства.

#### **Доклинические и клинические исследования безопасности и эффективности MSC при терапии инсульта**

В последние годы растет число доклинических исследований MSC в условиях экспериментального ишемического инсульта. Был показан благоприятный эффект MSC на функциональное восстановление в отношении видов грызунов и приматов, путей доставки (внутривенный, внутриартериальный и внутримозговой) [93], типа MSC (аллогенный и аутологичный) [80], времени введения в связи с инсультом (от 5 недель до 1 месяца после инсульта) и дозы вводимых MSC [45]. Эти данные свидетельствуют о том, что на животных моделях инсульта MSC оказывают терапевтический эффект в широком диапазоне доз, могут быть введены уже в 1 месяц после ишемии головного мозга и могут быть полезными независимо от источника MSC или путей их доставки. Будущие доклинические исследования могут расширить этот опыт, например, путем изучения

того, как эффекты MSC взаимодействуют с различными формами реабилитации или обычно используемыми фармакологическими методами после инсульта, или путем сравнения действия MSC при различных формах инсульта, при этом, как и при любой новой потенциальной терапии, необходимо учитывать влияние сопутствующих заболеваний. Так, расхождения в действии стволовых клеток в доклинических и клинических исследованиях могут быть частично связаны с различиями в регенеративном потенциале здоровых молодых животных и пожилых пациентов с хроническими заболеваниями. Одно из подобных исследований показало, что лечение с помощью MSC костного мозга у диабетических крыс I типа увеличивало смертность и нарушало гематоэнцефалический барьер (BBB), что приводило к кровоизлиянию в мозг, и подчеркнуло, что терапия стволовыми клетками не может быть полезной при инсульте у пациентов с диабетом [95]. Доклинические и клинические исследования также показали, что пролиферация и ангиогенная способность эндотелиальных клеток-предшественников и MSC были нарушены у пациентов с ишемической болезнью сердца и нарушениями обмена [96]. Поэтому необходимы дальнейшие исследования, изучающие последствия терапии стволовыми клетками для инсульта у животных и людей с различными хроническими заболеваниями.

Основываясь на результатах доклинических исследований использования MSC после инсульта и их потенциальные преимущества в отношении других клеточных методов лечения (например, получение из нескольких источников, иммунопривилегированность), возникает значительный интерес к применению MSC на разных стадиях заболевания. Важно отметить, что все завершённые исследования изучали полезность MSC в относительно поздние моменты времени, то есть по крайней мере через 23 дня после инсульта. Это подчеркивает тот факт, что исследования, проведенные на пациентах после 23 дней после инсульта, фокусируются на восстановительной стратегии, что является важным отличием по сравнению с исследованиями инсульта у пациентов в первые часы после инсульта, то есть в острый период развития заболевания.

Все текущие и завершённые клинические исследования рассматривали эффективность аутологичной трансплантации MSC у пациентов. Хотя результаты исследований не всегда однозначны, они подтвердили отсутствие каких-ли-

бо проблем, связанных с заболеваемостью или смертностью в связи с MSC-терапией. Первый отчет о трансплантации MSC у пациентов с инсультом был проведен Bang et al. [97]. В этом исследовании пациенты с ишемическим инсультом были рандомизированы на контрольные и экспериментальные группы, при этом экспериментальные группы получали внутривенную инфузию  $10^8$  аутологичных BM-MSC через 4-9 недель после появления симптомов. Авторы наблюдали значительно улучшенные оценки Рэнкина, позволяющие оценивать степень инвалидизации после инсульта, и индексы Бартеля, дающие возможность определить степень зависимости пациента от посторонней помощи, до 6 месяцев после трансплантации MSC по сравнению с контрольными группами.

Было отмечено, что MSC, пассированные в аутологичной человеческой сыворотке, растут быстрее, чем в фетальной телячьей сыворотке, уменьшая время подготовки клеток и риск трансмиссивных заболеваний при продолжающемся внутривенном введении аутологичных MSC от 36 до 133 дней после инсульта. Хотя это исследование не включало контрольную группу, авторы установили, что применение MSC не сопровождалось опухолями ЦНС, аномальным ростом клеток или неврологическим ухудшением. Не было обнаружено доказательств неблагоприятных событий, таких как венозная тромбоэмболия, системная злокачественность или системная инфекция после инфузии MSC [77]. В другом исследовании сообщалось, что внутривенная трансплантация аутологичных MSC у шести пациентов с хроническим инсультом (3-12 месяцев после) была безопасной по сравнению с шестью контрольными, и что лечение MSC не было связано с каким-либо значительным изменением неврологических функций [98]. В совокупности эти и другие данные поддерживают предположение о том, что внутривенное переливание MSC у пациентов с хроническим инсультом безопасно и может улучшить качество жизни. Также важно отметить, что недостаточно доклинических данных, исследующих влияние MSC, введенных через 30 дней после начала инсульта, соответственно, существует значительное несоответствие в клинических исследованиях действия MSC по отношению к числу дней после инсульта когда вводились MSC.

Наряду с этим были опубликованы рекомендации, которые могли бы максимизировать эффективность клинических исследований MSC. Комиссия «Терапия стволовыми клетками

как формирующаяся парадигма для инсульта» (STEPS) представила ряд рекомендаций относительно доклинических и клинических исследований в отношении терапии на основе стволовых клеток при ишемическом инсульте, включая необходимость проверенных экспериментов на животных, надежные исследования безопасности на людях, и важность выбора подходящих временных точек и групп пациентов для клинических исследований. В частности, они предложили три области исследований, которые необходимы в этой сфере:

- 1) разработка методов клеточной маркировки, которые являются безопасными и надежными для клинического тестирования;
- 2) идентификация и валидация маркеров восстановления от инсульта;
- 3) формирование базы изображений при восстановлении от инсульта [99].

Исследования во всех этих областях, несомненно, будут иметь огромные преимущества для понимания роли MSC в терапии ишемического инсульта. Другие рекомендации приводятся в публикациях от «круглого стола по лечению инсульта» (STAIR), которые помимо рекомендаций по разработке доклинических и клинических исследований по восстановлению от инсульта, рекомендовали сосредоточиться на лечении с несколькими механизмами действия, а также на лечении, которое нацелено на физиологические системы за пределами мозга, например, как иммунная система [100]. Разнообразные механизмы действия MSC в сочетании с их иммуномодулирующими функциями свидетельствуют о том, что они станут перспективными кандидатами для терапии будущих ишемических инсультов.

#### **Ограничения и новые перспективы при использовании стволовых клеток в терапии**

Первичные препятствия для современных методов стволовых клеток включают:

- а) ограниченный источник прививаемых стволовых клеток;
- б) наличие оптимального временного окна для терапии стволовыми клетками;
- в) наследственная ограниченность потенциала стволовых клеток взрослых;
- г) возможные клеточно-опосредованные побочные эффекты, такие как образование опухолей или инсульт.

Во-первых, хотя оптимальная доза клеток и пути введения стволовых клеток при сердечно-сосудистых заболеваниях не установлены

[101], введение достаточной дозы клеток является обязательным для положительного эффекта стволовых клеток. В отличие от гематогенных стволовых клеток количество MSC в костном мозге резко снижается с возрастом, требуя расширения культуры [102]. Кроме того, инсульт обычно встречается у пожилых людей, а MSC, полученные от пожилых пациентов, демонстрируют снижение способности к пролиферации, самообновлению или дифференциации.

Во-вторых, существует оптимальный момент времени для применения стволовых клеток. Уровни хемокинов, трофических факторов и соответствующих микроРНК (miRs) заметно увеличивались при инсульте головного мозга во время острой его фазы, но со временем уменьшались [103]. Кроме того, мишени для клеточной терапии могут различаться в зависимости от временных окон после инсульта. Применение стволовых клеток во время острой фазы инсульта может потребоваться, чтобы получить ряд паракринных и иммуномодулирующих эффектов, которые приводят к уменьшению вторичных процессов повреждения и стимуляции восстановления после инсульта [104].

В-третьих, взрослые стволовые клетки могут иметь врожденные ограничения. MSC являются гетерогенными и содержат много разных типов предшественников или стволовых клеток с точки зрения роста, трофической поддержки и потенциалов дифференцировки. Затухание регенеративного потенциала стволовых клеток у пациентов старшего возраста с инсультом может быть вызвано старением в донорских клетках или в клетках-реципиентах. Однако инсульт-индуцированный нейрогенез наблюдался у пациентов с инсультом в возрасте 60 и 70 лет [105]. Хотя количество нейральных стволовых клеток уменьшалось с возрастом в человеческом мозге, а базальный нейрогенез нарушался у престарелых животных, степень нейрогенеза после инсульта была сходной у молодых и старых животных [106].

Наконец, серьезной проблемой терапии стволовыми клетками являются побочные эффекты, вызванные клетками, в частности, образование опухолей трансплантированными клетками, которые могут задержать восстановление после инсульта [107] и улавливание стволовых клеток в легких при внутривенном применении или сосудами головного мозга при внутриартериальном [108].

С учетом сказанного весьма многообещающей выглядит клеточная терапия, использующая

секретомы (трофические факторы, цитокины или хемокины, продуцируемые посредством паракринной секреции) или внеклеточные везикулы (EVs, например, микропузырьки и экзосомы), полученные из стволовых клеток. Она может представлять собой новую, клинически осуществимую и бесклеточную парадигму, которая позволила бы избежать проблем, связанных с клетками, таких, как образование опухолей и инфаркты, вызванные окклюзией сосудов. Стволовые клетки выделяют EVs, а также растворимые факторы (например, трофические факторы), а инсульт у людей запускает мобилизацию EVs из MSC [109]. EVs содержат биологически активные молекулы, такие как липиды, белки и miR, и более сложные субстанции, чем другие клеточные источники [110]. Инкапсуляция биоактивных молекул в EVs повышает их стабильность и биодоступность и помогает проходить ГЭБ [111]. EVs стволовых клеток играют критическую роль в обмене информацией между стволовыми клетками и поврежденными клетками и изменяют поведение клеток-мишеней. В исследованиях микропузырьки, секретируемые из MSC, способствовали регенерации седалищного нерва у крыс [112]. Таким образом, применение малых молекул, биоматериалов и биологических препаратов, которые нацелены на нишу стволовых клеток, является интересным и многообещающим направлением в регенеративной медицине, с учетом того, что небольшие молекулы относительно дешевы, более удобны в использовании. Тем не менее, в этом направлении терапии инсульта пока было проведено относительно небольшое количество исследований.

### Заключение

Таким образом, обзор и анализ данных научной литературы показал, что мезенхимальные стромальные клетки, обладая способностью дифференцироваться в различные типы клеток, секретировать БАВ, участвовать в процессах воспаления и аутофагии, индукции ангиогенеза, нейрогенеза, модуляции иммунной системы, могут быть применены в терапии широкого ряда заболеваний, включая восстановление от инсульта. В доклинических исследованиях было показано, что MSC улучшают двигательные и поведенческие реакции животных после развития инсульта. Вместе с тем, еще нет прямых доказательств дифференцировки MSC в нейроны, а также еще не достаточно изучены молекулярно-клеточные механизмы их участия в ишемических процес-

сах, распределении и хоуминге в организме после трансплантации. Кроме того, необходимы широкомасштабные клинические исследования, поскольку у людей, обладающих особенностями

в сосудистой и нейроанатомии, подверженных влиянию психосоциальных факторов, развитие инсульта и его реабилитация происходят отлично от экспериментальных животных.

### Литература

1. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet*. 2008;371:1612–1623.
2. NCHS Dataline Public Health Reports. 126433.
3. Johnston SC, Mendis S, Mathers CD. Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. *Lancet Neurol*. 2009;8:345–354.
4. Mauldin PD, Simpson KN, Palesch YY, Spilker JS, Hill MD, Khatri P, et al. Design of the economic evaluation for the Inter-ventional Management of Stroke (III) trial. *Int J Stroke*. 2008;3:138–144.
5. Ansari S, Rahman M, Waters MF, Hoh BL, Mocco J. Recanalization therapy for acute ischemic stroke, part 1: surgical embolectomy and chemical thrombolysis. *Neurosurg Rev*. 2011;34:1–9.
6. Ansari S, Rahman M, McConnell DJ, Waters MF, Hoh BL, Mocco J. Recanalization therapy for acute ischemic stroke, part 2: mechanical intra-arterial technologies. *Neurosurg Rev*. 2011;34:11–20.
7. Adeoye O, Hornung R, Khatri P, Kleindorfer D. Recombinant tissue-type plasminogen activator use for ischemic stroke in the United States: a doubling of treatment rates over the course of 5 years. *Stroke*. 2011;42:1952–1955.
8. Trounson A. New perspectives in human stem cell therapeutic research. *BMC Med*. 2009;7:29.
9. Mohal JS, Tailor HD, Khan WS. Sources of adult mesenchymal stem cells and their applicability for musculoskeletal applications. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7:103–109.
10. Witkowska-Zimny M, Wrobel E. Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion. *Cell Mol Biol Lett*. 2011;16:493–514.
11. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:10711–10716.
12. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000;164:247–256.
13. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*. 2007;25:2896–2902.
14. Dharmasaroja P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. *J Clin Neurosci*. 2009;16:12–20.
15. Sensebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang*. 2010;98:93–107.
16. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012;5:19.
17. Urban VS, Kiss J, Kovacs J, Gócza E, Vas V, Monostori E, Uher F. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells*. 2008; 26:244–253.
18. Vaes B, Van't Hof W, Deans R, Pinxteren J. Application of MultiStem(®) allogeneic cells for immunomodulatory therapy: clinical progress and pre-clinical challenges in prophylaxis for graft versus host disease. *Front Immunol*. 2012;3:345.
19. Chen X, Li Y, Wang L, Katakowski M, Zhang L, Chen J, et al. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology*. 2002;22:275–279.
20. Li WY, Choi YJ, Lee PH, Huh K, Kang YM, Kim HS, et al. Mesenchymal stem cells for ischemic stroke: changes in effects after ex vivo culturing. *Cell Transplant*. 2008;17:1045–1059.
21. Liu Z, Li Y, Zhang RL, Cui Y, Chopp M. Bone marrow stromal cells promote skilled motor recovery and enhance contralateral axonal connections after ischemic stroke in adult mice. *Stroke*. 2011;42:740–744.
22. Kim YJ, Park HJ, Lee G, Bang OY, Ahn YH, Joe E, et al. Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on dopaminergic neurons through anti-inflammatory action. *Glia*. 2009;57:13–23.
23. Shen LH, Li Y, Chen J, Zacharek A, Gao Q, Kapke A, et al. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27:6–13.
24. Shin JY, Park HJ, Kim HN, Oh SH, Bae JS, Ha HJ, et al. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase beta-amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy*. 2014;10:32–44.
25. Paik MJ, Li WY, Ahn YH, Lee PH, Choi S, Kim KR, et al. The free fatty acid metabolome in cerebral ischemia following human mesenchymal stem cell transplantation in rats. *Clin Chim Acta*. 2009;402:25–30.
26. Yamauchi T, Kuroda Y, Morita T, Shichinohe H, Houkin K, Dezawa M, et al. Therapeutic effects of human multilineage-differentiating stress enduring (MUSE) cell transplantation into infarct brain of mice. *PLoS ONE*. 2015;10:
27. Dihné M, Hartung HP, Seitz RJ. Restoring neuronal function after stroke by cell replacement: anatomic and functional considerations. *Stroke*. 2011;42:2342–2350.
28. Rosenblum S, Wang N, Smith TN, Pendharkar AV, Chua JY, Birk H, et al. Timing of intra-arterial neural stem cell transplantation after hypoxia-ischemia influences cell engraftment, survival, and differentiation. *Stroke*. 2012;43:1624–1631.

29. Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. *APMIS*. 2005;113:831–844.
30. Eglitis MA, Dawson D, Park KW, Mouradian MM. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport*. 1999;10:1289–1292.
31. Bao X, Feng M, Wei J, Han Q, Zhao H, Li G, et al. Transplantation of Flk-1+ human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Eur J Neurosci*. 2011;34:87–98.
32. Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:1311–1319.
33. Shichinohe H, Kuroda S, Yano S, Ohnishi T, Tamagami H, Hida K, et al. Improved expression of gamma-aminobutyric acid receptor in mice with cerebral infarct and transplanted bone marrow stromal cells: an autoradiographic and histologic analysis. *J Nucl Med*. 2006;47:486–491.
34. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:2199–2204.
35. Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Kobune M, Hirai S, et al. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther*. 2004;9:189–197.
36. Zhao M-Z, Nonoguchi N, Ikeda N, Watanabe T, Furutama D, Miyazawa D, et al. Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26:1176–1188.
37. Cramer SC, Sur M, Dobkin BH, O'Brien C, Sanger TD, Trojanowski JQ, et al. Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain*. 2011;134:1591–1609.
38. Cramer SC. Repairing the human brain after stroke. II. Restorative therapies. *Ann Neurol*. 2008;63:549–560.
39. Hilfiker A, Kasper C, Hass R, Haverich A. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation. *Langenbecks Arch Surg*. 2011;396:489–497.
40. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res*. 2003;73:778–786.
41. Mauri M, Lentini D, Gravati M, Foudah D, Biella G, Costa B, et al. Mesenchymal stem cells enhance GABAergic transmission in co-cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2012;49:395–405.
42. Zhang J, Zhang Y, Xing S, Liang Z, Zeng J. Secondary neurodegeneration in remote regions after focal cerebral infarction: a new target for stroke management. *Stroke*. 2012;43:1700–1705.
43. Shen LH, Li Y, Chopp M. Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats. *Glia*. 2010;58:1074–1081.
44. Yilmaz G, Alexander JS, Erkuran Yilmaz C, Granger DN. Induction of neuro-protective/regenerative genes in stem cells infiltrating post-ischemic brain tissue. *Exp Transl Stroke Med*. 2010;2:11.
45. Maltman DJ, Hardy SA, Przyborski SA. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem Int*. 2011;59:347–356.
46. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: From mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011;17:796–808.
47. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:386–398.
48. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007;109:228–234.
49. Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS ONE*. 2010;5:e9252.
50. Li Y, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett*. 2009;456:120–123.
51. Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med*. 2010;16:203–209.
52. Ajmo CT, Vernon DOL, Collier L, Hall AA, Garbuzova-Davis S, Willing A, et al. The spleen contributes to stroke-induced neurodegeneration. *J Neurosci Res*. 2008;86:2227–2234.
53. Detante O, Moisan A, Dimastromatteo J, Richard M-J, Riou L, Grillon E, et al. Intravenous administration of 99mTc-HM-PAO-labeled human mesenchymal stem cells after stroke: in vivo imaging and biodistribution. *Cell Transplant*. 2009;18:1369–1379.
54. Isa A, Nehlin JO, Sabir HJ, Andersen TE, Gaster M, Kassem M, et al. Impaired cell surface expression of HLA-B antigens on mesenchymal stem cells and muscle cell progenitors. *PLoS ONE*. 2010;5:e10900.
55. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EGA, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*. 2006;108:2114–2120.
56. Mora-Lee S, Sierrol-Piquer MS, Gutiérrez-Pérez M, Gomez-Pinedo U, Roobrouck VD, López T, et al. Therapeutic effects of hMAPC and hMSC transplantation after stroke in mice. *PLoS ONE*. 2012;7:e43683.
57. Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*. 2010;20:510–518.
58. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2:141–150.
59. Scheibe F, Ladhoff J, Huck J, Grohmann M, Blazej K, Oersal A, et al. Immune effects of mesenchymal stromal cells in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32:1578–1588.
60. Schinköthe T, Bloch W, Schmidt A. In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17:199–206.

61. Kagiwada H, Yashiki T, Ohshima A, Tadokoro M, Nagaya N, Ohgushi H. Human mesenchymal stem cells as a stable source of VEGF-producing cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2:184–189.
62. Ma Y, Zechariah A, Qu Y, Hermann DM. Effects of vascular endothelial growth factor in ischemic stroke. *J Neurosci Res.* 2012;90:1873–1882.
63. Fisher M. Pericyte signaling in the neurovascular unit. *Stroke.* 2009;40:S13–S15.
64. Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng.* 2010;12:87–117.
65. Cho YJ, Song HS, Bhang S, Lee S, Kang BG, Lee JC, et al. Therapeutic effects of human adipose stem cell-conditioned medium on stroke. *J Neurosci Res.* 2012;90:1794–1802.
66. 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;32:567–576.
67. Liu N, Zhang Y, Fan L, Yuan M, Du H, Cheng R, et al. Effects of transplantation with bone marrow-derived mesenchymal stem cells modified by Survivin on experimental stroke in rats. *J Transl Med.* 2011;9:105.
68. 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;42:1437–1444.
69. Li Y, Chen J, Zhang CL, Wang L, Lu D, Katakowski M, et al. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia.* 2005;49:407–417.
70. Zhang J, Li Y, Chen J, Yang M, Katakowski M, Lu M, et al. Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells. *Brain Res.* 2004;1030:19–27.
71. Lin Y-C, Ko T-L, Shih Y-H, Lin M-YA, Fu T-W, Hsiao H-S, et al. Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke. *Stroke.* 2011;42:2045–2053.
72. Xin H, Li Y, Shen LH, Liu X, Hozeska-Solgot A, Zhang RL, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells increase tPA expression and concomitantly decrease PAI-1 expression in astrocytes through the sonic hedgehog signaling pathway after stroke (in vitro study) *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31:2181–2188.
73. Lim JY, Jeong CH, Jun JA, Kim SM, Ryu CH, Hou Y, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2:38.
74. Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi S-I, Mizuno H, Tawada M, You F, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. *Cytotherapy.* 2011;13:675–685.
75. Lin YC, Ko TL, Shih YH, Lin MY, Fu TW, Hsiao HS, et al. Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke. *Stroke.* 2011;42:2045–2053.
76. Hsieh JY, Wang HW, Chang SJ, Liao KH, Lee IH, Lin WS, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. *PLoS ONE.* 2013;8:
77. Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, Ishiai S, Onodera R, et al. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain.* 2011;134:1790–1807.
78. Wilson A, Shehadeh LA, Yu H, Webster KA. Age-related molecular genetic changes of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Genomics.* 2010;11:229.
79. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 2003;75:389–397.
80. Figueroa FE, Carrión F, Villanueva S, Khoury M. Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: A critical review. *Biol Res.* 2012;45:269–277.
81. Hess DC, Auchus AP, Uchino K, Sila C, Clark WM, Chiu D, et al. Final results of the B01-02 phase 2 trial testing the safety and efficacy of MultiStem® in treatment of ischemic stroke. *International Stroke Conference; LA.* 2016.
82. Li Y, McIntosh K, Chen J, Zhang C, Gao Q, Borneman J, et al. Allogeneic bone marrow stromal cells promote glial-axonal remodeling without immunologic sensitization after stroke in rats. *Exp Neurol.* 2006;198:313–325.
83. Zacharek A, Shehadah A, Chen J, Cui X, Roberts C, Lu M, et al. Comparison of bone marrow stromal cells derived from stroke and normal rats for stroke treatment. *Stroke.* 2010;41:524–530.
84. Li Y, Lin F. Mesenchymal stem cells are injured by complement after their contact with serum. *Blood.* 2012;120:3436–3443.
85. Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke.* 2004;35:2385–2389.
86. Kawabori M, Kuroda S, Sugiyama T, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, et al. Intracerebral, but not intravenous, transplantation of bone marrow stromal cells enhances functional recovery in rat cerebral infarct: an optical imaging study. *Neuropathology.* 2012;32:217–226.
87. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8407–8411.
88. Ahmadian Kia N, Bahrami AR, Ebrahimi M, Matin MM, Neshati Z, Almohaddesin MR, et al. Comparative analysis of chemokine receptor's expression in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and adipose tissue. *J Mol Neurosci.* 2011;44:178–185.
89. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Héroult O, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells.* 2007;25:1737–1745.
90. Raheja LF, Genetos DC, Wong A, Yellowley CE. Hypoxic regulation of mesenchymal stem cell migration: the role of RhoA and HIF-1 $\alpha$  *Cell Biol Int.* 2011;35:981–989.

91. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009;5:54–63.
92. Shen LH, Li Y, Chen J, Cui Y, Zhang C, Kapke A, et al. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. *Stroke*. 2007;38:2150–2156.
93. Walczak P, Zhang J, Gilad AA, Kedziorek DA, Ruiz-Cabello J, Young RG, et al. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke*. 2008;39:1569–1574.
94. Grieve SM, Bhindi R, Seow J, Doyle A, Turner AJ, Tomka J, et al. Microvascular obstruction by intracoronary delivery of mesenchymal stem cells and quantification of resulting myocardial infarction by cardiac magnetic resonance. *Circ Heart Fail*. 2010;3:e5–e6.
95. Chen J, Ye X, Yan T, Zhang C, Yang XP, Cui X, et al. Adverse effects of bone marrow stromal cell treatment of stroke in diabetic rats. *Stroke*. 2011;42:3551–3558.
96. Popa-Wagner A, Buga AM, Doepfner TR, Hermann DM. Stem cell therapies in preclinical models of stroke associated with aging. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:347.
97. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol*. 2005;57:874–882.
98. Bhasin A, Srivastava MVP, Kumaran SS, Mohanty S, Bhatia R, Bose S, et al. Autologous mesenchymal stem cells in chronic stroke. *Cerebrovasc Dis Extra*. 2011;1:93–104.
99. The STEPS Participants Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS): bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic factor therapy in treating stroke. *Stroke*. 2009;40:510–515.
100. Albers GW, Goldstein LB, Hess DC, Wechsler LR, Furie KL, Gorelick PB, et al. Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies. *Stroke*. 2011;42:2645–2650.
101. Golpanian S, Schulman IH, Ebert RF, Heldman AW, DiFede DL, Yang PC, et al. Concise review: review and perspective of cell dosage and routes of administration from preclinical and clinical studies of stem cell therapy for heart disease. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5:186–191.
102. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009;217:318–324.
103. Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, Carothers JJ, Zheng J, Hale D, et al. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63:84–96.
104. Savitz SI. Developing cellular therapies for stroke. *Stroke*. 2015;46:2026–2031.
105. Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:13198–13202.
106. Darsalia V, Heldmann U, Lindvall O, Kokaia Z. Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke*. 2005;36:1790–1795.
107. Kawai H, Yamashita T, Ohta Y, Deguchi K, Nagotani S, Zhang X, et al. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30:1487–1493.
108. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001;32:1005–1011.
109. Kim SJ, Moon GJ, Cho YH, Kang HY, Hyung NK, Kim D, et al. Circulating mesenchymal stem cells microparticles in patients with cerebrovascular disease. *PLoS ONE*. 2012;7.
110. Lai RC, Tan SS, Teh BJ, Sze SK, Arslan F, de Kleijn DP, et al. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. *Int J Proteomics*. 2012;2012:971907.
111. Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, et al. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther*. 2010;18:1606–1614.
112. Raisi A, Azizi S, Delirez N, Heshmatian B, Farshid AA, Amini K. The mesenchymal stem cell-derived microvesicles enhance sciatic nerve regeneration in rat: a novel approach in peripheral nerve cell therapy. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014;76:991–997.