

Т.Т. Нуркенов² , А.К. Цой¹ , Г.Е. Жусупова² ,
Ф.С. Олжаев¹ , В.Ю. Огай³, Б.А. Умбаев¹,
Т.М. Шалахметова² , Ш.Н. Аскарлова^{1*} 

¹ЧУ «National Laboratory Astana», АОО «Nazarbayev University»,

Лаборатория биоинженерии и регенеративной медицины, Казахстан, г. Нур-Султан

²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

³РГП «Национальный Центр Биотехнологии» КН МОН РК, Казахстан, г. Нур-Султан

*e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Целью работы явилась оценка эффективности применения сочетанной терапии экстракта полифенолов, выделенных из корней *Limonium gmelinii* и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в условиях экспериментально индуцированного ишемического поражения головного мозга *in vivo*. Объектом настоящего исследования явились аутбредные крысы-самцы линии Wistar весом 280-300 гр. Для создания модели фокального ишемического инсульта проводили окклюзию средней мозговой артерии (ОСМА). Животные опытных групп получали кермек Гмелина внутривентрикулярно, трансплантацию МСК проводили инъекционно через общую бедренную вену. Прижизненную оценку выживаемости и распределения трансплантированных МСК осуществляли при помощи аппарата микро КТ IVIS Spectrum. Анализ сенсомоторных функций животных проводили с помощью теста «Сужающаяся дорожка». Результаты исследования показали, что трансплантированные МСК локализуются в головном мозге только у животных с ОСМА, однако их локализация в грудной и брюшной области была отмечена как у животных с индуцированным инсультом, так и без него. Оценка сенсомоторной деятельности показала, что у животных, получавших трансплантацию МСК, происходило частичное восстановление двигательных функций, а при комбинированной терапии экстрактом кермека Гмелина и МСК на 14 сутки двигательная активность крыс восстанавливалась практически до контрольных величин. Таким образом, комбинированная терапия экстрактом кермека Гмелина и мезенхимальными стволовыми клетками является более эффективным подходом по сравнению с монотерапией МСК.

Ключевые слова: ишемический инсульт, кермек Гмелина, растительные полифенолы, мезенхимальные стволовые клетки.

T.T. Nurkenov², A.K. Tsoy¹, G.E. Zhusupova², F.S. Olzhayev¹,
V.Yu. Ogay³, B.A. Umbayev¹, T.M. Shalakhmetova², Sh.N. Askarova^{1*}

¹National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Kazakhstan, Nur-Sultan

²Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

³National Center for Biotechnology, Kazakhstan, Nur-Sultan

*e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

Combined action of vegetable polyphenols and mesenchymal stem cells on ischemic damage of the brain

The aim of the work was to evaluate the effectiveness of combined therapy of the extract of polyphenols isolated from the roots of *Limonium Gmelinii* and mesenchymal stem cells (MSCs) under conditions of experimentally induced ischemic brain damage *in vivo*. The object of this study were outbred male Wistar rats weighing 280-300 g. To create a model of focal ischemic stroke, occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) was performed. Animals of the experimental groups received Kermek of Gmelin intragastrically; MSC transplantation was carried out by injection through the common femoral vein. Intravital assessment of the survival and distribution of transplanted MSCs was carried out using a micro CT IVIS Spectrum apparatus. Analysis of the sensorimotor functions of animals

was performed using the test " Beam walk." The results of the study showed that transplanted MSCs are localized in the brain only in animals with MCAO, however, their localization in the thoracic and abdominal region was noted both in animals with and without stroke. Evaluation of sensorimotor activity showed that in animals that received MSC transplantation, partial restoration of motor functions occurred, and with combined therapy with Limonium Gmelinii extract and MSC on day 14, the motor activity of rats was restored almost to the control values. Thus, combined therapy with Limonium Gmelinii extract and mesenchymal stem cells is a more effective approach as compared to MSC monotherapy.

Key words: ischemic stroke, Limonium Gmelinii, plant polyphenols, mesenchymal stem cells.

Т.Т. Нуркенов², А.К. Цой¹, Г.Е. Жусупова², Ф.С. Олжаев¹,
В.Ю. Огай³, Б.А. Умбаев¹, Т.М. Шалахметова², Ш.Н. Аскарлова^{1*}

¹Астана ұлттық зертханасы, Назарбаев Университеті, Қазақстан, Нұрсұлтан қ.

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

³Ұлттық Биотехнология Орталығы, Қазақстан, Нұрсұлтан қ.

*e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

Мидың ишемиялық зақымдануындағы өсімдік полифенолдары мен мезенхималық бағаналы жасушаларының бірлескен әсері

Бұл жұмыстың мақсаты *in vivo* мидың экспериментальды ишемиялық зақымдануы жағдайында *Limonium gmelinii* тамырларынан оқшауланған полифенол сығындысы мен мезенхималық бағаналы жасушаларының (МБЖ) бірлескен терапиясының тиімділігін бағалау болды. Осы зерттеудің объектісі, салмағы 280-300 г еркек Wistar егеуқұйрықтары болды. Фокальды ишемиялық инсульт моделін құру үшін орта ми артерия окклюзиясы (ОМАО) жасалды. Тәжірибелік топтардың жануарлары Кермек Гмелинді интрагастриялық жолмен қабылдады; МБЖ трансплантациясы жалпы сан тамыр арқылы инъекция арқылы жасалды. Трансплантацияланған МБЖ-дің өмір сүру деңгейі мен таралуын бағалау IVIS Spectrum micro КТ аппаратын қолдану арқылы жүзеге асырылды. Жануарлардың сенсомоторлық функцияларын талдау «Тарылатын жол» сынағының көмегімен жүргізілді. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, трансплантацияланған МБЖ-лар мида тек ОМАО-мен ауыратын жануарларда локализацияланған, бірақ олардың кеуде және іш аймағында оқшаулануы инсультпен немесе инсультсыз жануарларда байқалды. Сенсоримоторлық белсенділікті бағалау көрсеткендей, МБЖ трансплантациясын алған жануарларда қозғалтқыш функцияларын ішінара қалпына келу орын алды, ал *Limonium gmelinii* сығындысы мен МБЖ аралас терапия жүргізгенде, 14-ші күні егеуқұйрықтардың қозғалтқыш белсенділігі бақылау шамасына дейін қалпына келді. Осылайша, *Limonium gmelinii* сығындысымен және мезенхималық бағаналы жасушаларымен біріктірілген терапия МБЖ монотерапиясымен салыстырғанда тиімді әдіс болып табылады.

Түйін сөздер: ишемиялық инсульт, *Limonium Gmelinii*, өсімдік полифенолдары, мезенхималық бағаналы жасушалары.

Введение

Инсульт является третьей причиной смертности населения после болезней сердца и онкологических заболеваний, и лидирующей причиной инвалидизации людей пожилого возраста в большинстве стран мира, в том числе в Казахстане [1, 2]. 85% всех инсультов имеют ишемическую природу и вызываются острой тромботической окклюзией сосудов головного мозга, что приводит к нарушению кровотока и кислородному голоданию нервных клеток [3]. Учитывая высокую распространённость, наряду с другими сердечно-сосудистыми заболеваниями, ишемический инсульт (ИИ) является глобальной проблемой медико-социального характера. Исходя из вышесказанного, вопрос о поиске эф-

фективных специфических и базисных средств для терапии ИИ стоит весьма остро.

Основными принципами патогенетического лечения ИИ является восстановление кровотока в зоне ишемии (рециркуляция, реперфузия), поддержание метаболизма мозговой ткани и защита ее от структурных повреждений (нейропротекция). В последние десятилетия наиболее эффективным методом лечения ИИ является проведение медикаментозного тромболизиса, направленного на восстановление магистрального кровотока на пораженном участке с целью предотвращения необратимых изменений в тканях головного мозга [4]. Однако, ввиду узкого временного «терапевтического окна», не более 3 часов с момента развития острого нарушения мозгового кровообращения, и высокого риска

развития геморрагических осложнений, спектр терапевтических средств очень ограничен [5].

Одним из перспективных направлений пост-ишемической реваскуляризации пораженного участка головного мозга является клеточно-терапевтический подход с использованием мезенхимальных стволовых клеток. Лейтмотивом терапии стволовыми клетками (СК) является возможность нейропротективного действия трансплантированных СК, за счет продуцируемых ими биологически активных компонентов [6] и их способности восполнить клеточный дефицит, возникающий в результате повреждения и гибели нейроглиальных клеток [7]. В литературе встречаются данные об успешном применении стволовых клеток с целью ангиогенной терапии как в качестве монотерапии, так и в комбинированном применении [8, 9]. Также встречаются данные, что при использовании МСК, выделяемых из КМ и жировой ткани, отмечается улучшение неврологической картины в модели ИИ, которая проявляется в нормализации двигательной активности и улучшении когнитивных функций у животных [10, 11].

Следующим немаловажным звеном в устранении последствий ишемического поражения тканей головного мозга является коррекция реперфузионного синдрома, возникающего после восстановления магистрального артериального кровотока в поврежденной области головного мозга [12]. Реперфузионное повреждение тканей мозга в основном обусловлено запуском каскадного механизма реакций, результатом действия которого является накопление продуктов свободнорадикального окисления и развитие окислительного стресса. Примечательно, что генерация АФК продолжается как на стадии ишемии, так и на стадии реперфузии и вследствие этого гибель ишемизированной клетки может наступить спустя несколько часов, дней или даже недель после наступления ишемического инсульта [13]. В этой связи окислительный стресс, как основной компонент патофизиологии ишемического и реперфузионного повреждения мозга, обуславливает назначение антиоксидантной терапии даже в отсроченном порядке.

Среди веществ с антиоксидантными свойствами большой интерес представляют растительные полифенолы, поскольку помимо выраженных антиоксидантных свойств они отличаются широким спектром биологического действия как на клеточном уровне, так и на тканевом: ингибируют протеинкиназы, активируют глутатион-S-трансферазу, оказывают влияние на

сортировку Т-лимфоцитов, оказывают модулирующее действие на компоненты иммунной системы и др. [14-19]. Показано также, что различные полифенолы растительного происхождения обладают нейропротекторными свойствами [20-22]. Таким образом, поиск новых растительных ресурсов, богатых биодоступными полифенолами, является актуальной задачей.

Одним из растений, содержащих большое количество полифенолов, является кермек Гмелина (*L. Gmelinii*) – представитель рода *Limonium* (кермек), в большом количестве произрастающий на территории Казахстана. Сухой экстракт из корней кермека Гмелина (субстанция Лимонидин) разрешен Комитетом контроля медицинской и фармацевтической деятельности МЗ РК в соответствии с приказом № 559 от 21.07.2015 для применения в медицине в качестве лекарственного средства. Более того, ранее было показано, что экстракт кермека Гмелина оказывает комплексное цитопротекторное действие на нейроны, астроциты и эндотелиоциты головного мозга *in vitro* и *in vivo* [23].

Исходя из всего вышесказанного, целью настоящего исследования явилась оценка терапевтического потенциала МСК, а также сочетанного воздействия растительного экстракта из кермека Гмелина и МСК при индуцированном фокальном ишемическом инсульте у крыс.

Материалы и методы

В исследовании использовали аутбредных крыс-самцов линии Wistar весом 280-300 гр. Животные содержались в условиях вивария в режиме 12 часового цикла день/ночь, при температуре 22-23°C. Все эксперименты с животными проводились только после одобрения локального этического комитета.

Трансплантация МСК и введение растительного экстракта

Для проведения экспериментов животные были разбиты на 4 группы, по 10 животных в каждой: 1) контрольные животные; 2) животные у которых индуцировали инсульт; 3) животные с индуцированным инсультом, которым проводили однократную внутривенную трансплантацию МСК, трансфецированных люциферазой, в количестве 1×10^6 клеток на следующий день после ОСМА; 4) животные с индуцированным инсультом, которых подвергали терапии экстрактом кермека Гмелина внутрижелудочно в дозировке 200 мг/кг в течение 28 дней, и проводили однократную трансплантацию МСК в ко-

личестве 1×10^6 . За сутки до индукции инсульта, на следующий день, на 1, 7, 14 и 28 день после ОСМА проводили оценку сенсомоторных функций животных.

МСК выделяли из костного мозга бедренных и большеберцовых костей 4-недельных крыс согласно описанному ранее протоколу [24]. Вкратце, трубчатые кости (бедренные, плечевые) крыс помещали в фосфатный буфер, содержащий 1% антибиотиков (пенициллин/стрептомицин), и очищали от мягких тканей. Эпифизы удаляли, а из диафизов вымывали костный мозг с помощью полноценной питательной среды DMEM, содержащей 10% FBS (фетальная бычья сыворотка) и 1% антибиотиков. Выделенную массу ресуспендировали и помещали в пробирку, с последующим центрифугированием при 300g в течение 10 минут. После удаления супернатанта осажденные клетки разводили в полноценной среде DMEM и высевали на культуральные матрасы. По достижении 95% конфлюэнтности проводили механическую очистку культуры МСК путем встряхивания культуральных матрасов на орбитальном шейкере при 800 оборотах в течение 1 часа. Затем клетки монослоя пересеивали на покровные стекла и проводили оценку чистоты полученной культуры.

Оценку чистоты культуры МСК проводили с помощью иммунофлуоресцентного анализа МСК негативных маркеров CD34 и CD19, которые экспрессируются в гемопоэтических клетках, а также специфических МСК позитивных маркеров CD90 и CD105.

Микроскопический анализ, в том числе и флуоресцентный, проводили с помощью микроскопов Olympus IX83 и Carl Zeiss AxioObserver Z1. Флуоресцентные изображения получали с помощью охлаждаемой CCD камеры и программного обеспечения MetaMorph.

Для экспериментального изучения действия МСК и растительных полифенолов на головной мозг использовали модель ИИ, вызванного окклюзией средней мозговой артерии. Данная модель отличается удобством для оценки морфологического и физиологического анализа изменений тканей головного мозга, отличается стабильностью повреждений структур головного мозга. Также выбранная модель ОСМА отличается от других экспериментальных моделей возможностью вызывать значительные размеры ИИ [25], имеет сходство с развитием ИИ у человека и позволяет оценить размеры ишемического некроза и образование рубцовой ткани. Указанная модель фокальной ишемии была вос-

произведена у 20 крыс посредством ОСМА в соответствии с ранее описанным протоколом [26].

Для возможности прижизненного мониторинга приживаемости и биораспределения МСК после трансплантации была проведена трансфекция МСК люциферазным лентивирусным вектором. Для оценки эффективности трансфекции клеток лентивирусными частицами, меченые МСК высевались на матрасы и культивировались до достижения 80% конфлюэнтности. Контролем служили МСК, не подвергавшиеся трансфекции. Для выявления биолюминесценции в культуральную среду обоих матрасов добавляли 150µг/мл D-люциферина светлячка, после чего матрасы с клетками помещали в рабочую камеру имиджера IVIS spectrum CT (Caliper, USA).

Прижизненная оценка выживаемости и распределения меченых люциферазой МСК в различных органах проводилась на 1, 7, 14, и 28 день после трансплантации при помощи аппарата микро КТ (IVIS Spectrum CT; Caliper). Для оценки локализации МСК животным внутрибрюшинно вводили люциферин (Santa Cruz Biotechnology) в количестве 150 мг на килограмм массы тела животного за 10-15 минут до визуализации. Аппарат микро КТ (IVIS Spectrum CT; Caliper) использовали в режиме накопления сигнала биолюминесценции. Изображения получали с помощью программного обеспечения Living Image 4.3.1 (Caliper).

Оценка сенсомоторных функций у крыс

Анализ опорно-двигательной функции передних и задних конечностей лабораторных животных проводили с помощью теста для оценки сенсомоторики «Сужающаяся дорожка» (рисунки 1А). Суть данного теста заключается в том, что животное, пересекая специальную доску, интенсивно освещенную в самом начале и имеющую постепенное сужение по всей длине, стремится попасть в затемненный бокс (рисунок 1В).

Для оценки моторно-двигательной функции лабораторных животных подсчитывали количество постановок конечности на нижнюю доску (ошибка), количество соскальзывания конечности с верхней доски на нижнюю (когда кисть или стопа размещена на обеих досках) и общее количество шагов, сделанных от стартовой линии до захода животного в темную камеру. Учет ошибок и соскальзываний проводили для передних и задних лап отдельно. Видеозаписи анализировали покадрово с помощью программного обеспечения RealTimer.



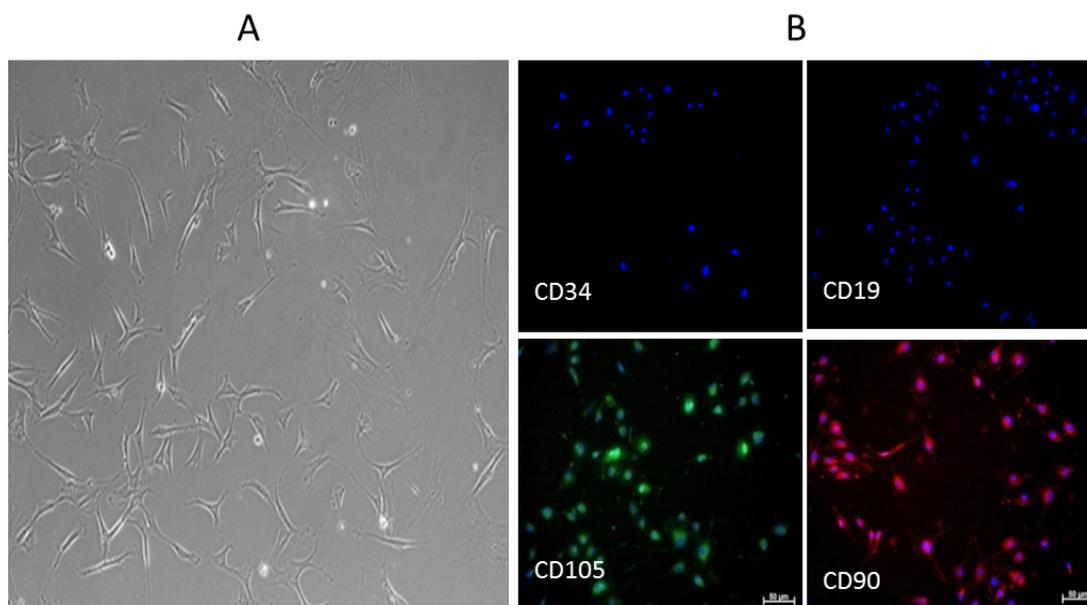
А – Установка «Сужающаяся дорожка»; В – Тестирование животного

Рисунок 1 – Тест – система для оценки сенсомоторной функции передних и задних конечностей

Полученные данные представлены в виде средней \pm стандартная погрешность средней величины (Mean \pm SEM). Статистическая достоверность результатов оценки сенсомоторной активности животных оценивалась при помощи однофакторного дисперсионного анализа (one way ANOVA). Различия между группами исследования считались достоверными при $p \leq 0,05$. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения для статистического анализа SigmaPlot 11.

Результаты и обсуждение

МСК, выделенные из костного мозга бедренных и большеберцовых костей 4-х недельных крыс и высеянные на культуральные матрасы, достигли ~50%-ной конfluence на седьмой день культивирования и имели правильную фибробластоподобную морфологию (рисунок 2А). Мезенхимальная природа клеток была подтверждена положительной иммунофлуоресцентной окраской на маркеры CD90, CD105, CD34 и CD19 (рисунок 2В).

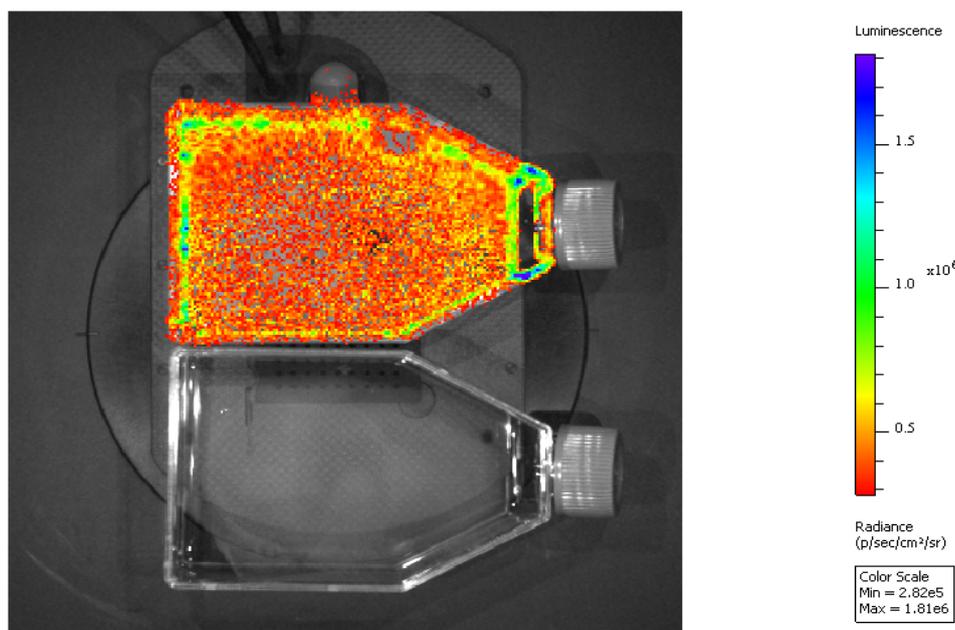


А – Фазово-контрастные микрофотографии отсортированных МСК на седьмой день культивирования (20X, NA 0.45 objective); В – Иммунофлуоресцентные микрофотографии клеток, меченых CD34, CD19, CD90 и CD105 антителами и красителем DAPI (x20)

Рисунок 2 – Морфология и иммунофенотипический анализ МСК, выделенных из костного мозга

Результаты трансфекции МСК люциферазным лентивирусным вектором для оценки приживаемости и биораспределения МСК после трансплантации отражены на рисунке 3, где представлены фотографии двух матрасов, полученные в режиме биолюминесценции. Матрас,

содержащий трансфицированные МСК (сверху) интенсивно люминесцировал, в то время как контрольные клетки, не подвергавшиеся трансфекции, не светились (снизу), что свидетельствует об экспрессии люциферазы в трансфицированных МСК.



Сверху – культура трансфицированных МСК, снизу – контроль (МСК без трансфекции).

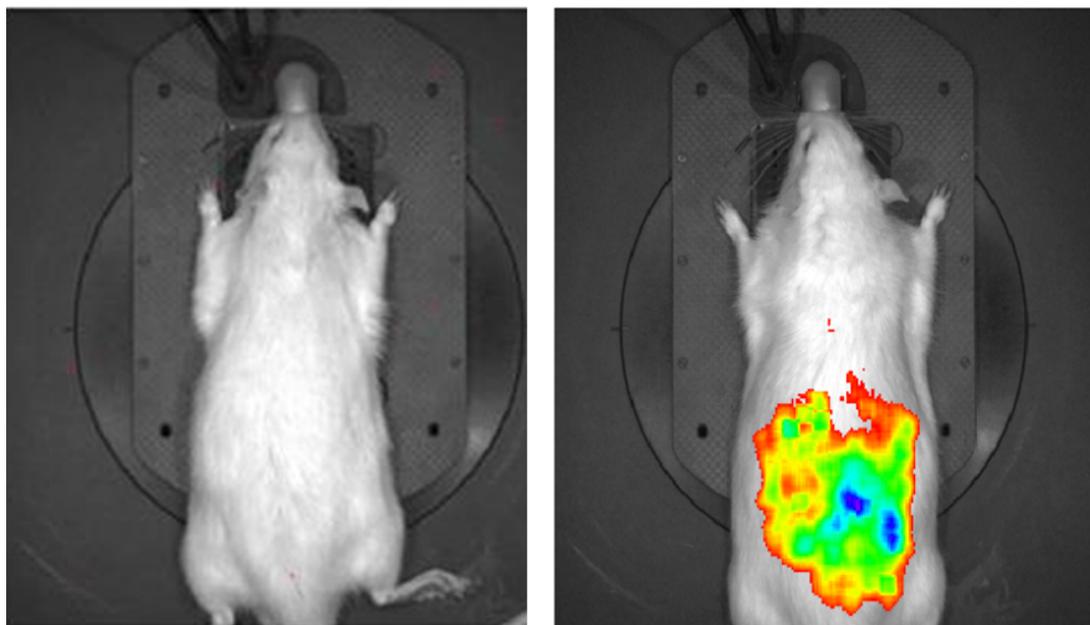
Рисунок 3 – Биолюминесцентный анализ эффективности трансфекции МСК лентивирусным вектором

После этого 1×10^6 трансфицированных МСК ввели однократно внутривенно нескольким лабораторным животным. На следующий день после трансплантации клеток, животным внутрибрюшинно вводился люциферин, и животные под наркозом помещались в аппарат микро КТ для биолюминесцентного имиджинга. Контролем служили животные, которым вводили то же самое количество клеток, но без трансфекции, и люциферин (рисунок 4). Анализ фотографий позволил сделать заключение о возможности применения данной методики для оценки биораспределения и хоуминга трансплантированных МСК в условиях *in vivo*.

Как уже упоминалось выше, для изучения нейропротекторного действия экстракта из кермека Гмелина и МСК на модели лабораторных животных, у самцов белых лабораторных крыс вызывали фокальный ишемический инсульт путем окклюзии средне-мозговой артерии (ОСМА). На следующий день после индукции инсульта животные начинали получать экстракт

из кермека Гмелина по 200 мг/кг, внутривенно в течение 28 дней и однократную внутривенную трансплантацию МСК, трансфицированных люциферазой, в количестве 1×10^6 на следующий день после ОСМА.

Было показано, что распределение МСК в теле животных с фокальным ишемическим инсультом отличается от таковой у интактных крыс. У животных, не подвергавшихся ОСМА, трансплантированные МСК локализуются преимущественно в грудной и брюшной области и полностью отсутствуют в области головы. У животных с ОСМА показано наличие биолюминесценции в головном мозге на первый и третий день после однократной трансплантации трансфицированных люциферазным вектором МСК в количестве 1×10^6 (рисунок 5) и отсутствие сигнала начиная с седьмого дня. При этом в брюшной области биолюминесценцию можно было детектировать вплоть до 28 дня после трансплантации в обеих группах животных.



Слева – контроль (МСК без трансфекции), справа – трансфицированные МСК

Рисунок 4 – *In vivo* билюминесценция люциферина

У всех прооперированных животных в первые часы после пробуждения и в первые сутки послеоперационного периода отмечалось развитие неврологического дефицита, проявляющееся развитием вялости и замедленности движений, одностороннего птоза глаза на пораженной стороне, развитием пареза или паралича правой передней и/или задней лап, тремора, гемипарезии пораженной стороны, угнетением аппетита, нарушением регуляции актов дефекации и мочеиспускания.

На седьмые сутки после начала эксперимента у нелеченых животных отмечалось развитие отрицательной динамики с нарастанием неврологического дефицита, проявляющегося в развитии глубоких сенсомоторных нарушений (рисунок 6). Так, на 7-й, 14-й и 28-й день после индукции ишемического повреждения мозга, у животных этой группы наблюдали резкое ухудшение двигательной функции, на 14%, 18% и 14% соответственно, по сравнению с дооперационными значениями (нулевая линия). В то же самое время у животных, получавших монотерапию МСК, отрицательная динамика была выражена в меньшей степени, и на 14 сутки было отмечено статистически достоверное улучшение двигательных функций по сравнению с нелеченым контролем. При комбинировании терапии МСК и растительным экстрактом статистически

достоверное улучшение двигательной активности происходило уже на 7 сутки, а на 14 сутки моторные функции крыс восстанавливались практически до контрольных (дооперационных) величин.

В ходе проведенных исследований были получены следующие результаты:

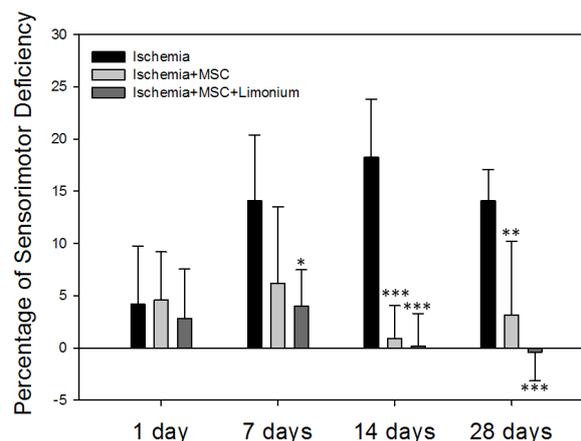


Рисунок 6 – Результаты тестирования сенсомоторных функций у крыс. Количественные данные представлены в виде разницы сенсомоторного дефицита у животных до и после операции ОСМА (сенсомоторный дефицит до операции представлен в виде нулевой линии).

*- $p \leq 0,05$; **- $p \leq 0,01$; ***- $p \leq 0,001$ по сравнению с нелечеными животными

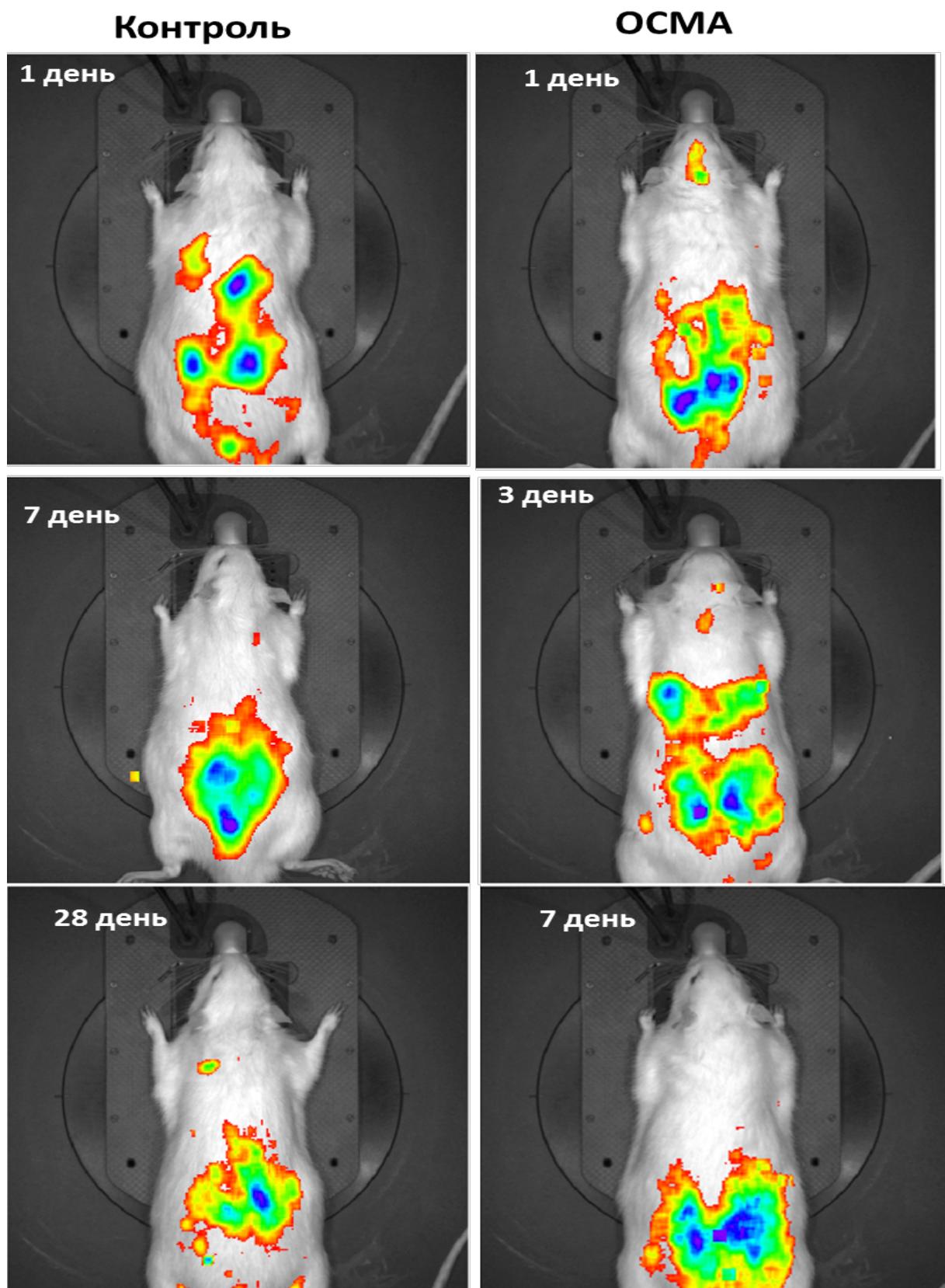


Рисунок 5 – *In vivo* биоломинесценция МСК, трансфицированных лентивирусным вектором у здоровых животных и животных с ОСМА

Были выделены мезенхимальные стволовые клетки трубчатых костей мелких лабораторных животных (крыс), и чистота полученной популяции МСК была подтверждена с помощью иммунофлуоресцентной окраски на маркеры CD90, CD105, CD34, и CD19; также был отработан метод трансфекции МСК лентивирусным вектором и прижизненная визуализация трансфицированных МСК внутри организма крыс.

Было показано, что распределение МСК в теле животных с фокальным ишемическим инсультом (окклюзия средней мозговой артерии, ОСМА) отличается от таковой у интактных крыс: у здоровых животных МСК локализуются преимущественно в висцеральных органах; у животных с хирургически вызванной окклюзией часть клеток проникает в головной мозг.

Результаты сравнительной оценки сенсомоторной деятельности лабораторных животных на протяжении 7-28 дней после ишемического инсульта показали частичное восстановление опорно-двигательной функции на фоне однократного интравенозного введения МСК (5×10^6 клеток), и значительное улучшение двигательной активности при комбинированной терапии экстрактом кермека Гмелина и МСК.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что комбинированная терапия экстрактом кермека Гмелина и мезенхимальными стволовыми клетками является более эффективным подходом по сравнению с монотерапией и требует дальнейшего изучения. Так как сухой экстракт из корней кермека Гмелина (субстанция Лимонидин) разрешен Комитетом контроля медицинской и фармацевтической деятельности МЗ РК для применения в медицине в качестве гепатопротекторного и противовоспалительного средства, он может быть рекомендован для дальнейших клинических испытаний как отдельно, так и в комбинации с клеточной терапией.

Конфликт интересов

Авторы не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Данная работа финансировалась в рамках исследовательского гранта МОН РК № AP05133266.

Литература

- 1 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. (2014) Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, vol. 383, № 9913, pp. 245-254.
- 2 OECD. Health at a Glance (2011): OECD Publishing.
- 3 Smith H.K., Gavins F.N. (2012) The potential of stem cell therapy for stroke: is PISCES the sign? *FASEB J.*, vol. 26, № 6, pp. 2239-2252.
- 4 Lees K.R., Bluhmki E., von Kummer R., Brott T.G., Toni D., Grotta J.C., Albers G.W., Kaste M., Marler J.R., Hamilton S.A., Tilley B.C., Davis S.M., Donnan G.A., Hacke W., Allen K., Mau J., Meier D., del Zoppo G., De Silva D.A., Butcher K.S., Parsons M.W., Barber P.A., Levi C., Bladin C., Byrnes G. (2010) Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet*, vol. 375, № 972, pp. 1695-1703.
- 5 Sandercock P., Wardlaw J.M., Lindley R.I., Dennis M., Cohen G., Murray G., Innes K., Venables G., Czlonkowska A., Kobayashi A., Ricci S., Murray V., Berge E., Slot K.B., Hankey G.J., Correia M., Peeters A., Matz K., Lyrer P., Gubitz G., Phillips S.J., Arauz A. (2012) The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): a randomised controlled trial. *Lancet*, vol. 379, № 9834, pp. 2352-2363.
- 6 van Velthoven C.T., van de Looij Y., Kavelaars A., Zijlstra J., van Bel F., Huppi P.S., Sizonenko S., Heijnen C.J. (2012) Mesenchymal stem cells restore cortical rewiring after neonatal ischemia in mice. *Annals of neurology*, vol. 71, № 6, pp. 785-796.
- 7 Carroll J. (2012) Human cord blood for the hypoxic-ischemic neonate. *Pediatric research*, vol. 71, № 4 Pt 2, pp. 459-463.
- 8 Silvestre J.S. (2012) Pro-angiogenic cell-based therapy for the treatment of ischemic cardiovascular diseases. *Thrombosis research*, vol. 130 Suppl 1, pp. S90-94.
- 9 Булгин Д.В., Андреева О.В. (2015) Терапевтический ангиогенез с использованием факторов роста и клеток костного мозга: биологические основы и перспективы клинического применения // Вестник трансплантологии и искусственных органов, том 17, № 3.
- 10 Leu S., Lin Y.C., Yuen C.M., Yen C.H., Kao Y.H., Sun C.K., Yip H.K. (2010) Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats. *Journal of translational medicine*, vol. 8, pp. 63.
- 11 Shen L.H., Li Y., Chen J., Zacharek A., Gao Q., Kapke A., Lu M., Raginski K., Vanguri P., Smith A., Chopp M. (2007) Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 27, № 1, pp. 6-13.

- 12 Matsuo Y., Onodera H., Shiga Y., Shozuhara H., Ninomiya M., Kihara T., Tamatani T., Miyasaka M., Kogure K. (1994) Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain research*, vol. 656, №2, pp. 344-352.
- 13 Зозуля Ю.А., Барабой В.А., Сутковой Д.А. (2000) Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга. М.: Знание-М., pp. 344.
- 14 Ross J.A., Kasum C.M. (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of nutrition*, vol. 22, pp. 19-34.
- 15 Ferriola P.C., Cody V., Middleton E., Jr. (1989) Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.*, vol. 38, № 10, pp. 1617-1624.
- 16 Glossmann H., Presek P., Eigenbrodt E. (1981) Quercetin inhibits tyrosine phosphorylation by the cyclic nucleotide-independent, transforming protein kinase, pp60src. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, vol. 317, № 1, pp. 100-102.
- 17 Lyubchenko T.A., Wurth G.A., Zweifach A. (2003) The actin cytoskeleton and cytotoxic T lymphocytes: evidence for multiple roles that could affect granule exocytosis-dependent target cell killing. *J Physiol.*, vol. 547, № Pt 3, pp. 835-847.
- 18 Ratty A.K., Das N.P. (1988) Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol.*, vol. 39, № 1, pp. 69-79.
- 19 Schwartz L.B. (1987) Mediators of human mast cells and human mast cell subsets. *Ann Allergy.*, vol. 58, № 4, pp. 226-235.
- 20 Chuang D.Y., Chan M.H., Zong Y., Sheng W., He Y., Jiang J.H., Simonyi A., Gu Z., Fritsche K.L., Cui J., Lee J.C., Folk W.R., Lubahn D.B., Sun A.Y., Sun G.Y. (2013) Magnolia polyphenols attenuate oxidative and inflammatory responses in neurons and microglial cells. *J Neuroinflammation*, vol. 10, pp. 15.
- 21 Simonyi A., Wang Q., Miller R.L., Yusof M., Shelat P.B., Sun A.Y., Sun G.Y. (2005) Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Molecular neurobiology*, vol. 31, № 1-3, pp. 135-147.
- 22 Panickar K.S., Jang S. (2013) Dietary and plant polyphenols exert neuroprotective effects and improve cognitive function in cerebral ischemia. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, vol. 5, № 2, pp. 128-143.
- 23 Tsoy A., Zhussupova G., Shayakhmetov Y., Umbayev B., Askarova S. (2016) POTENTIAL OF PLANT EXTRACT FROM LIMONIUM GMELINII FOR STROKE THERAPY. *INTERNATIONAL JOURNAL OF STROKE*, vol. 11, № SUPP 3, pp. 257-257.
- 24 Zhang L., Chan C. (2010) Isolation and enrichment of rat mesenchymal stem cells (MSCs) and separation of single-colony derived MSCs. *J Vis Exp.*, № 37, e1852.
- 25 Munoz-Elias G., Marcus A.J., Coyne T.M., Woodbury D., Black I.B. (2004) Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 24, № 19, pp. 4585-4595.
- 26 Uluc K., Miranpuri A., Kujoth G.C., Akture E., Baskaya M.K. (2011) Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *Journal of visualized experiments : JoVE*, № 48:1978.

References

- 1 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. (2014) Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, vol. 383, № 9913, pp. 245-254.
- 2 OECD. *Health at a Glance (2011)*: OECD Publishing.
- 3 Smith H.K., Gavins F.N. (2012) The potential of stem cell therapy for stroke: is PISCES the sign? *FASEB J.*, vol. 26, № 6, pp. 2239-2252.
- 4 Lees K.R., Bluhmki E., von Kummer R., Brott T.G., Toni D., Grotta J.C., Albers G.W., Kaste M., Marler J.R., Hamilton S.A., Tilley B.C., Davis S.M., Donnan G.A., Hacke W., Allen K., Mau J., Meier D., del Zoppo G., De Silva D.A., Butcher K.S., Parsons M.W., Barber P.A., Levi C., Bladin C., Byrnes G. (2010) Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet*, vol. 375, № 972, pp. 1695-1703.
- 5 Sandercock P., Wardlaw J.M., Lindley R.I., Dennis M., Cohen G., Murray G., Innes K., Venables G., Czlonkowska A., Kobayashi A., Ricci S., Murray V., Berge E., Slot K.B., Hankey G.J., Correia M., Peeters A., Matz K., Lyrer P., Gubitz G., Phillips S.J., Arauz A. (2012) The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): a randomised controlled trial. *Lancet*, vol. 379, № 9834, pp. 2352-2363.
- 6 van Velthoven C.T., van de Looij Y., Kavelaars A., Zijlstra J., van Bel F., Huppi P.S., Sizonenko S., Heijnen C.J. (2012) Mesenchymal stem cells restore cortical rewiring after neonatal ischemia in mice. *Annals of neurology*, vol. 71, № 6, pp. 785-796.
- 7 Carroll J. (2012) Human cord blood for the hypoxic-ischemic neonate. *Pediatric research*, vol. 71, № 4 Pt 2, pp. 459-463.
- 8 Silvestre J.S. (2012) Pro-angiogenic cell-based therapy for the treatment of ischemic cardiovascular diseases. *Thrombosis research*, vol. 130 Suppl 1, pp. S90-94.
- 9 Bulgın D.V., Andreyeva O.V. (2015) Terapevticheskiy angiogenez s ispolzovaniyem faktorov rosta i kletok kostnogo mozga: biologicheskiye osnovy i perspektivy klinicheskogo primeneniya [Therapeutic angiogenesis using growth factors and bone marrow cells: biological foundations and prospects for clinical application]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*, tom 17, № 3.
- 10 Leu S., Lin Y.C., Yuen C.M., Yen C.H., Kao Y.H., Sun C.K., Yip H.K. (2010) Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats. *Journal of translational medicine*, vol. 8, pp. 63.

- 11 Shen L.H., Li Y., Chen J., Zacharek A., Gao Q., Kapke A., Lu M., Raginski K., Vanguri P., Smith A., Chopp M. (2007) Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 27, № 1, pp. 6-13.
- 12 Matsuo Y., Onodera H., Shiga Y., Shozuhara H., Ninomiya M., Kihara T., Tamatani T., Miyasaka M., Kogure K. (1994) Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain research*, vol. 656, № 2, pp. 344-352.
- 13 Zozulya Yu.A., Baraboy V.A., Sutkova D.A. (2000) Svobodnopadikal'noe okislenie i antioksidantnaja zashhita pri patologii golovnogo mozga [Free radical oxidation and antioxidant protection in brain pathology]. M: Knowledge-M, 344 p.
- 14 Ross J.A., Kasum C.M. (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of nutrition*, vol. 22, pp. 19-34.
- 15 Ferriola P.C., Cody V., Middleton E., Jr. (1989) Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.*, vol. 38, № 10, pp. 1617-1624.
- 16 Glossmann H., Presek P., Eigenbrodt E. (1981) Quercetin inhibits tyrosine phosphorylation by the cyclic nucleotide-independent, transforming protein kinase, pp60src. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, vol. 317, № 1, pp. 100-102.
- 17 Lyubchenko T.A., Wurth G.A., Zweifach A. (2003) The actin cytoskeleton and cytotoxic T lymphocytes: evidence for multiple roles that could affect granule exocytosis-dependent target cell killing. *J Physiol.*, vol. 547, № Pt 3, pp. 835-847.
- 18 Ratty A.K., Das N.P. (1988) Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol.*, vol. 39, № 1, pp. 69-79.
- 19 Schwartz L.B. (1987) Mediators of human mast cells and human mast cell subsets. *Ann Allergy.*, vol. 58, № 4, pp. 226-235.
- 20 Chuang D.Y., Chan M.H., Zong Y., Sheng W., He Y., Jiang J.H., Simonyi A., Gu Z., Fritsche K.L., Cui J., Lee J.C., Folk W.R., Lubahn D.B., Sun A.Y., Sun G.Y. (2013) Magnolia polyphenols attenuate oxidative and inflammatory responses in neurons and microglial cells. *J Neuroinflammation*, vol. 10, pp. 15.
- 21 Simonyi A., Wang Q., Miller R.L., Yusof M., Shelat P.B., Sun A.Y., Sun G.Y. (2005) Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Molecular neurobiology*, vol. 31, № 1-3, pp. 135-147.
- 22 Panickar K.S., Jang S. (2013) Dietary and plant polyphenols exert neuroprotective effects and improve cognitive function in cerebral ischemia. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, vol. 5, № 2, pp. 128-143.
- 23 Tsoy A., Zhussupova G., Shayakhmetov Y., Umbayev B., Askarova S. (2016) POTENTIAL OF PLANT EXTRACT FROM LIMONIUM GMELINII FOR STROKE THERAPY. *INTERNATIONAL JOURNAL OF STROKE*, vol. 11, № SUPP 3, pp. 257-257.
- 24 Zhang L., Chan C. (2010) Isolation and enrichment of rat mesenchymal stem cells (MSCs) and separation of single-colony derived MSCs. *J Vis Exp.*, № 37, e1852.
- 25 Munoz-Elias G., Marcus A.J., Coyne T.M., Woodbury D., Black I.B. (2004) Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 24, № 19, pp. 4585-4595.
- 26 Uluc K., Miranpuri A., Kujoth G.C., Akture E., Baskaya M.K. (2011) Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *Journal of visualized experiments : JoVE*, № 48:1978.