

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

EXTRACELLULAR VESICLES IN DIAGNOSIS AND TREATMENT OF HEMORRHAGIC STROKE (LITERATURE REVIEW)

**I. Lomova
M. Tikhonova**

Summary. The review presents recent research data devoted to the study the role of extracellular vesicles (EV) in hemorrhagic stroke (HI). The relevance of the search for new approaches to solving the problem of intracerebral hemorrhage (ICH) is highlighted, with an emphasis on new possibilities for limiting intracerebral hematoma using erythrocyte EVs, as well as the role of EVs in secondary inflammation and brain regeneration after HI. The influence of endothelial and blood cell EVs on the development of cerebral vasospasm and secondary ischemic stroke against the background of subarachnoid hemorrhage, as well as possible ways to block the action of pathogenic EVs, are separately considered. The importance of vesicular microRNAs in the differential diagnosis of hemorrhagic and ischemic stroke was noted, which, if HI is excluded, will speed up the provision of reperfusion therapy already in emergency care. The potential role of EVs, including those from mesenchymal stem cells, was noted in the delivery of regenerative agents across the BBB into the damaged brain and increasing neuroplasticity after HI.

Keywords: hemorrhagic stroke, extracellular vesicles, intracerebral hemorrhage, subarachnoid hemorrhage, cerebral vasospasm, microRNA of extracellular vesicles, hematoma growth, hemostatic therapy, regeneration, mesenchymal stem cells.

Ломова Ирина Павловна

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИЛ цереброваскулярной патологии научно-исследовательского центра ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург
irpalo@mail.ru

Тихонова Маргарита Борисовна

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова
atsuna@mail.ru

Аннотация. В обзоре представлены данные исследований последних лет, посвященные изучению роли внеклеточных везикул (ВВ) при геморрагическом инсульте (ГИ). Освещена актуальность поиска новых подходов к решению проблемы внутримозгового кровоизлияния (ВМК) с акцентом на новые возможности ограничения внутримозговой гематомы с помощью эритроцитарных ВВ, а также роль ВВ во вторичном воспалении и регенерации головного мозга после ГИ. Отдельно рассмотрено влияние ВВ эндотелия и клеток крови на развитие церебрального вазоспазма и вторичного ишемического инсульта на фоне субарахноидального кровоизлияния, а также возможные пути блокирования действия патогенных ВВ. Отмечено значение везикулярных микроРНК в дифференциальной диагностике геморрагического и ишемического инсульта, что, при исключении ГИ, ускорит оказание реперфузионной терапии уже в условиях скорой помощи. Отмечена потенциальная роль ВВ, в том числе из мезенхимальных стволовых клеток, в доставке регенеративных агентов через ГЭБ в поврежденный мозг и в повышении нейропластичности после ГИ.

Ключевые слова: геморрагический инсульт, внеклеточные везикулы, внутримозговое кровоизлияние, субарахноидальное кровоизлияние, церебральный вазоспазм, микроРНК внеклеточных везикул, рост гематомы, гемостатическая терапия, регенерация, мезенхимальные стволовые клетки.

Введение

В последнее десятилетие отмечается огромный прогресс в диагностических и терапевтических возможностях при цереброваскулярных заболеваниях (ЦВЗ). На основании более глубокого понимания патологических механизмов, лежащих в основе ЦВЗ, были определены новые диагностические направления, терапевтические мишени и разработаны новые стратегии лечения [1].

Геморрагический инсульт (ГИ) является наиболее разрушительной формой инсульта, с уровнем смертности до 40 % и наибольшей потерей лет жизни с поправкой на инвалидность среди выживших. Каждый год примерно 5 миллионов человек во всем мире перено-

сят ГИ, две трети из которых выживают с инвалидностью [2]. В 2019 году 6,6 миллиона смертей во всем мире были вызваны инсультом. Из них 3,3 миллиона были связаны с ишемическим инсультом, 2,9 миллиона — с внутримозговым кровоизлиянием и 0,4 миллиона — с субарахноидальным кровоизлиянием [3]. ГИ составляют около 13 % инсультов и возникают в результате разрыва сосудов в головном мозге, иногда из-за аневризмы или артериовенозной мальформации. Развитие ГИ также тесно связано с артериальной гипертензией, церебральной амилоидной ангиопатией и антикоагулянтной терапией, которые сопряжены с риском кровоизлияния в мозг [4]. У пациентов с прогрессирующей гипертензией в стенке перфорирующих ветвей сосудов возникает гиперплазия интимы с гиалинизацией, называемая «псевдоаневризмами» [5], что предрасполагает их к очаговому некро-

зу и разрыву стенки сосуда. Гипертензивный ГИ чаще встречается в подкорковых структурах — скорлупе, таламусе и мосте [6].

В последнее время, благодаря непрерывным исследованиям внеклеточных везикул (ВВ), мембранных наночастиц, выделяемых при активации, стрессе и повреждении всеми клетками организма, значительно повысилось признание их роли в патогенезе ЦВЗ [7]. ВВ можно разделить на основе их размера и биогенеза. Экзосомы, самые маленькие ВВ, имеют диаметр от 30 до 150 нм, генерируются внутриклеточно из многовезикулярных тел и высвобождаются во внеклеточное пространство. ВВ среднего размера, которые образуются путем отпочковывания от плазматической мембраны, диаметром от 100 до 1000 нм, известны как микровезикулы или эктосомы. ВВ конститутивно высвобождаются с поверхности клеток, но их образование может быть усилено клеточной активацией [8]. В настоящее время проточная цитометрия является наиболее распространенной технологией для исследования ВВ. Помимо этого, также применяются такие методы исследования ВВ, как электронная микроскопия, масс-спектрометрия и анализ отслеживания наночастиц. ВВ часто классифицируются в соответствии с их поверхностными белками. Они включают в основном трансмембранные или липидсвязанные белки: 1) тетраспанины, такие как CD63, CD9 и CD81; 2) интегрины и молекулы клеточной адгезии; 3) рецепторы фактора роста; 4) гетеротримерные G-белки; 5) фосфатидилсеринсвязывающие белки. [9]. ВВ также являются носителями различных типов РНК, среди которых микроРНК была тесно связана с ССЗ [10]. МикроРНК представляют собой короткие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне [11]. В периферическом кровообращении ВВ отвечают за защиту микроРНК от деградации циркулирующими рибонуклеазами [12]. ВВ, высвобождаемые во внеклеточное пространство, могут передавать информацию соседним или удаленным клеткам, воздействуя на рецепторы, и/или интернализироваться посредством эндоцитоза, фагоцитоза или прямого слияния с клетками, доставляя свои «грузы» в цитозоль и изменяя физиологическое состояние клеток-реципиентов, тем самым способствуя патофизиологическим изменениям. ВВ могут передавать генетическую информацию, индуцируя транзиторные или стойкие модификации в клетках-реципиентах [13]. Обнаружено также, что происхождение, количество и внутреннее содержание (нуклеиновые кислоты, белки и липиды) ВВ изменчивы при различных ЦВЗ. ВВ, полученные из крови, могут использоваться для различения типов инсульта, а также для определения динамики и прогноза ЦВЗ [14,15].

Внутричерепное кровоизлияние

При внутричерепном кровоизлиянии (ВМК) образование гематомы ведет к повышению внутричерепного

давления, повреждению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), отеку мозга, апоптозу нейронов и неврологической дисфункции. Объем гематомы является наиболее сильным предиктором инвалидизации и смертности после ВМК. 30-дневная смертность пациентов с объемом гематомы > 60 мл (при глубоких и долевыми кровоизлияниями) составила 93 % и 71 % соответственно; при объеме 30–60 мл смертность составляла 64 % и 60 %, соответственно; при объеме <30 мл смертность составила 23 % и 7 %, соответственно. [17]. ГИ представляет значительный риск, поскольку повышенное давление приводит к масс-эффекту и опасным для жизни событиям, таким как смещение и вклинение головного мозга [18].

Вторичное повреждение головного мозга развивается из-за воспаления, окислительного стресса или цитотоксичности, вызванной лизатами эритроцитов. В настоящее время клинически применяемые терапевтические средства для лечения такого вторичного повреждения головного мозга недоступны. [17]. После ГИ в течение нескольких дней происходит диapedез нейтрофилов и активируется микроглия. Образование свободных радикалов может способствовать повреждению головного мозга, вызванному дисбалансом железа [19]. Кроме того, разрушение гематоэнцефалического барьера из-за токсического воздействия красных кровяных телец и /или продуктов распада гемоглобина приводит к увеличению содержания воды в мозге в области геморагии, что приводит к отеку и нарастанию повреждения мозга [20].

Недавние достижения в исследованиях ВВ показали преимущественное высвобождение ВВ из определенных типов клеток в зависимости от типа инсульта, этапа заболевания. Некоторые из высвобождаемых ВВ были связаны с повышенным нейровоспалением, микросудистой дисфункцией и нейрональной цитотоксичностью, в то время как другие предлагали определенную степень нейропротекции [21]

Значение ВВ для ограничения роста гематомы

Ограничение роста гематомы является многообещающим терапевтическим подходом. Влияние ВВ на гемостатический процесс обусловлено их прокоагулянтной поверхностью, появляющейся в процессе их образования вследствие экстернализации анионных фосфолипидов, главным образом фосфатидилсерина (ФС), которые способствуют сборке и активации теназных и протромбиназных комплексов. Таким образом, ВВ представляют собой фрагменты мембраны, сдерживающие фосфолипид-прокоагулянт ФС, который служит каталитической поверхностью для комплексного образования факторов свертывания крови как по внешнему, так и по внутреннему пути гемостаза [22]. ВВ, полученные из эритроцитов

(ЭрВВ), являются новыми активными гемостатическими средствами, что подтверждено в исследованиях с использованием интегрального теста гемостаза — тромбодинамики. Выявлено, что при концентрациях, превышающих 500·10⁶ /μl, микрочастицы эритроцитов увеличивали скорость роста стационарного сгустка до значительно более высоких уровней, чем микрочастицы тромбоцитов или искусственные фосфолипидные везикулы, состоящие из фосфатидилхолина и фосфатидилсерина [23]. Ashish K Rehni et al изучили потенциал ЭрВВ в ограничении роста гематомы и улучшении результатов после операции при ВМК [24]. Выявлено, что введение ЭрВВ снижает скорость кровотечения на экспериментальных моделях, а присутствие ЭрВВ ускоряет свертывание крови *in vitro* в крови нормальных людей, а также субъектов, страдающих нарушениями свертываемости [22]. Наблюдали, что лечение ЭрВВ эффективно ограничивает размер гематомы, когда оно начато уже через 4,5 ч после операции у крыс.

По сравнению с применением для лечения в качестве гемостатического средства рекомбинантного FVIIa (rFVIIa), использование ЭрВВ было предпочтительно по нескольким причинам. В то время как прокоагулянтная активность rFVIIa опосредована активацией тканевого фактора [25], ЭрВВ не содержат тканевого фактора и с наименьшей вероятностью вызывают тромбоз [26]. Во-вторых, ЭрВВ усиливают как тромбоцитарный, так и коагуляционный гемостаз, в то время как rFVIIa усиливают только коагуляционный гемостаз [25]. Кроме того, ЭрВВ оказывают прокоагулянтное действие широкого спектра, активируя больше факторов свертывания крови, чем rFVIIa [27].

Предыдущие исследования показали, что период полураспада ЭрВВ в крови короткий (≈90 секунд), и ЭрВВ изолируются в основном в печени и селезенке. Введение ЭрВВ крысам не оказывает вредного воздействия на физиологические параметры или тромбоз в жизненно важных органах [28]. Лечение ЭрВВ в течение 2-часового периода с использованием болюса и инфузии оказало максимальный терапевтический эффект на уменьшение роста гематомы после ВМК. Лечение ЭрВВ существенно не модулирует уровни D-димера в плазме, что указывает на отсутствие тромботических осложнений после терапии ЭрВВ. В клинической практике у пациентов, у которых наблюдается увеличение гематомы, её рост снижается за 3–6 часов после начала ВМК [29]. Поскольку ЭрВВ были эффективны при ограничении роста гематомы в эксперименте при введении препарата в течение 4,5 часов после операции, ожидается, что ЭрВВ будут эффективны у большой группы пациентов. Тем не менее, перед их клиническим применением необходимы подробные последующие исследования.

Роль ВВ при вторичном повреждении мозга после ВМК

Вторичное воспалительное повреждение способствует ухудшению клинических исходов, и лейкоциты, в частности, их подтип-моноциты, имеют особое значение. В 2 независимых группах пациентов с ВМК было обнаружено, что более высокое количество моноцитов было связано с 30-дневным летальным исходом [30]. Известно, что моноциты включают подтипы моноцитов / макрофагов M1 и M2 с различными свойствами. Клетки M1 участвуют в острых воспалительных путях, тогда как макрофаги M2 преимущественно секретируют противовоспалительные медиаторы в условиях острого воспаления. Более высокое соотношение M1/M2 подразумевает более воспалительную среду, в то время как низкое соотношение M1/M2 предполагает среду для репарации, регенерации [31].

В одноцентровом проспективном обсервационном исследовании K.B. Walsh et al. были зарегистрированы последовательные случаи ВМК в течение 12 часов после появления симптомов. Также отобраны контрольные группы, соответствующие возрасту (±5 лет), расе и полу, оценено количество моноцитарных ВВ (МВВ): M1 и M2. Сравнивали показатели МВВ M1 и M2 в разных случаях и в контроле. В исследование были включены 19 пар ВМК «случай-контроль». Медианное количество M1 МВВ существенно не отличалось между случаями ВМК (8,63 × 10⁷ /миллилитр (мл)) по сравнению с контролем (8,64 × 10⁷ /мл), (P = 0,525). Медианное количество МВВ M2 было значительно выше в случаях ВМК (1,61 × 10⁶ /мл), по сравнению с контролем (4,46 × 10⁵ /мл) (P = 0,027). Пришли к выводу, что более высокое количество МВВ M2 в случаях ВМК по сравнению с контролем отражает развитие хронического воспалительного статуса у пациентов с ВМК, клеточной активации или апоптоза. Необходимы дальнейшие исследования, включая серийные пробы плазмы, для выяснения патофизиологии МВВ после ВМК [32].

В двух исследованиях были обнаружены повышенные уровни циркулирующих аннексин-V-позитивных ВВ (содержащих анионный ФС на своей поверхности) у пациентов с ГИ по сравнению с контролем [33,34]. В более подробном исследовании Lackner et al. обнаружено повышенное количество ВВ, происходящих из эндотелия (CD105+, CD106+, CD54+ или CD62e+), лейкоцитов (CD45+) и эритроцитов (CD235+) у пациентов с ГИ [35]. Эти результаты были подтверждены Sanborn et al., которые также обнаружили временно повышенные уровни аннексин-V-позитивных субпопуляций ВВ как нейтрофильного (CD66b+), так и эритроцитарного (CD235a+) происхождения. Кроме того, уровень ВВ, полученных из эндотелиальных клеток (CD146+), ТФ-положительных (CD142+), был повышен в течение всего 10-дневного периода наблюдения [36].

С другой стороны, предполагается, что циркулирующие ВВ участвуют в усилении путей восстановления после инсульта посредством паракринной передачи сигналов. Чтобы проверить эту гипотезу в исследовании, полученные из крови аллогенные ВВ от крыс и ксеногенные ВВ от людей, у которых наблюдалось спонтанное хорошее выздоровление после ВМК, вводили крысам внутривенно через 24 ч после подкоркового ВМК. Через 28 дней при обоих методах лечения отмечали улучшение показателей по шкале оценки двигательной функции животных, выявили большую сохранность волокон в окружающей очаг зоне мозга (при МРТ с диффузионно-тензорной анизотропией), обнаружили повышенные уровни маркеров иммунофлуоресценции миелина (MOG) и снижение маркеров астроцитов (GFAP) по сравнению с контролем. Сравнение белкового содержимого циркулирующих ВВ через 28 дней от животных с хорошим и плохим восстановлением показало, что снижение экспрессии путей активации иммунной системы (CO4, KLKB1, PROC, FA9 и C1QA) и усиление восстановительных процессов, таких как направление аксонов (RAC1), миелинизация (MBP) и синаптический транспорт везикул (SYN1) соответствует лучшей сохранности тканей. Повышенная экспрессия PCSK9 (дифференцировка нейронов) у животных, получавших ксеногенные ВВ, предполагает усиление путей репарации. Таким образом, введение полученных из крови ВВ улучшило выздоровление после ВМК. Эти результаты открывают новую и многообещающую возможность для дальнейшего развития восстановительной терапии для улучшения результатов после ВМК [37]. Исследование Cui H.J et al подтвердило способность ВВ, выделенных из эндотелиальных клеток-предшественников, способствовать ангиогенной репарации и восстановлению функций [38]. Недавно также было подтверждено, что специфичная для ВВ эндотелиальных клеток микроРНК, miR-126, индуцирует ангиогенез после ВМК [39]. Eun Chae Lee et al подтвердили, что miR-126 способствует ангиогенезу после ВМК в ответ на ангиогенные факторы роста, включая VEGF или фактор роста фибробластов. Избыточная экспрессия miR-126 дополнительно подтверждает его потенциальный ангиогенный эффект [40].

ВВ при субарахноидальном кровоизлиянии, при развитии церебрального вазоспазма

Субарахноидальное кровоизлияние (САК) является серьезной проблемой. В целом, уровень смертности, связанный с САК, составляет от 32 % до 67 %, что делает его наиболее летальным типом геморрагического инсульта [41,42]. После результатов успешности лечения разорвавшейся аневризмы, церебральный вазоспазм является основной причиной инвалидности и смертности, связанных с САК. Спазм сосудов головного мозга — это очень сложное, недостаточно изученное явление, которое усугубляет неврологические исходы при ГИ.

Известно, что механизмы, лежащие в основе вазоспазма (ВС), указывают на различные патологические процессы, но методы лечения, нацеленные на эти пути, были малоэффективными. Поэтому необходимо изучить механизм ВС с новой точки зрения. Появление ВВ дает нам новый ключ к пониманию ВС. Общей характеристикой ВВ являются их динамические свойства в биологических жидкостях, где они могут взаимодействовать с контактирующими клетками. Эффекты ВВ разного происхождения сильно различаются. Воздействие ВВ в большей степени связано с аномальной сосудистой активностью, возникающей в результате повреждения эндотелия. Влияние ВВ на сосудистую активность было отражено в регуляции сосудорасширяющих веществ, таких как NO [43]. Было также показано, что ВВ, полученные из активированных эндотелиальных клеток, могут передавать дисфункцию другим эндотелиальным клеткам-реципиентам, например, снижая биодоступность оксида азота (NO) или нарушая эндотелий-зависимую вазорелаксацию [44]. Предыдущие исследования ВС были сосредоточены на сокращении гладкой мускулатуры, воспалении, тромбозе, распространяющейся деполяризации. Методы лечения, основанные на этих теориях не показали удовлетворительных результатов. Терапевтические методы, такие как применение блокаторов эндотелина, блокаторов кальциевых каналов значимо не улучшали неврологические исходы. Поэтому требуется новый подход для изучения механизмов церебрального ВС [46].

P.Lackner et al предположили, ВВ играют роль в патогенезе ВС и могут служить биомаркерами ВС. Они оценивали у 20 пациентов с САК эндотелиальные, лейкоцитарные, тромбоцитарные и эритроцитарные ВВ в течение 15 дней от начала ГИ. Скорость мозгового кровотока (CBF) оценена при транскраниальной доплерографии. 20 здоровых пациентов наблюдались в контроле. Выявили, что эндотелиальные, лейкоцитарные, эритроцитарные ВВ были повышены у пациентов с САК, по сравнению с контролем. CD105(+) и CD62e(+) эндотелиальные ВВ были значительно выше у пациентов с САК с высокими показателями CBF, свидетельствующими о выраженности ВС. CD105(+) эндотелиальные ВВ особенно нарастали во время пика CBF по доплерографическим показателям. У пациентов с ишемическим инсультом, развившимся на фоне вазоспазма, CD41(+) тромбоцитарные ВВ были повышены в дополнение к эндотелиальным ВВ. CD41(+) тромбоцитарные ВВ были значительно выше у пациентов с развившимися неврологическими проявлениями инвалидности (modified Rankin Scale score ≥ 1) по сравнению с теми, у кого было полное восстановление (modified Rankin Scale score=0) при выписке из стационара. Таким образом, эндотелиальные ВВ были повышены у пациентов с САК, их повышение отмечалось на фоне повышенной линейной скорости кровотока при транскраниальной доплерографии, и может быть новым биомаркером ВС. Тромбоцитарные ВВ могли

быть вовлечены в патогенез церебрального инфаркта на фоне вазоспазма, что приводило к неврологическим нарушениям [35].

ВВ содержат множество биологически активных веществ, таких как матриксные металлопротеиназы и активные формы кислорода, которые усложняют их роль в качестве функциональных медиаторов. Трудно заблокировать эти сложные процессы с помощью лечения только воспаления, окислительного стресса или других таргетных методов. Из-за дифференцированной структурной и многомерной активности ВВ все еще существуют нерешенные проблемы, требующие решения при применении фундаментальных исследований для клинической трансляции. Первоочередной проблемой является характеристика подтипов ВВ и биологически активных веществ. Второй способ заключается в блокировании взаимодействий между ВВ и клетками-мишенями. Поэтому, во-первых, технология протеомики может оказать поддержку в идентификации патогенных факторов, содержащихся в ВВ. Во-вторых, может оказаться многообещающим разработать белки, поглощающие/блокирующие ВВ, для предотвращения ВС. При исследовании ВВ ликвора во время вазоспазма было выделено более 140 белков. Magdalena M Przybycien-Szymanska et al. определили конкретные белки-кандидаты, которые потенциально могут служить ранними биомаркерами ВС после САК: снижалась регуляция ApoE, ApoD, белка синаптической ядерной оболочки 1, кластерина, α -1-кислого гликопротеина, ингибитора протеазы С1 плазмы и изомеразы простагландина H2d. Гаптоглобин, цепи фибриногена α и γ , белок синаптической ядерной оболочки 2 и субъединицы α и β гемоглобина были активированы. Некоторые из этих белков связаны с иммунными и метаболическими процессами, а некоторые были специфически связаны с цереброваскулярными заболеваниями [42].

Присутствие отрицательно заряженного ФС на поверхности является общей чертой многих ВВ и может служить мишенью для блокирования их эффектов. Zhou et al. продемонстрировали, что лактадгерин (эпидермальный фактор роста глобул молочного жира 8), белок, поглощающий ВВ, может значительно уменьшить коагулопатию, вызванную ВВ у мышей с черепно-мозговой травмой (ЧМТ), путем усиления ФС-опосредованного фагоцитоза [45]. Это первый случай, когда очищающий эффект лактадгерина на ВВ был использован для лечения вторичных повреждений, вызванных ВВ, и показал хорошие результаты.

Этот подход стоит исследовать дальше, и он может быть эффективным для всех чрезмерно опасных ВВ, потому что он зависит от присутствия ФС, а не биомаркеров. В исследовании Y. Gao et al. проведено обобщение знаний о динамике ВВ in vivo и выявление их причин-

ной роли в возникновении и развитии церебрального вазоспазма. Обнаружили, что различные ВВ проявляют динамические характеристики в жидкостях организма и прямо или косвенно влияют на церебральный вазоспазм или провоцируют его. Из-за различных веществ, переносимых ВВ из разных клеток, существуют также различия в механизмах, которые приводят к нарушению вазомоторной функции. Y. Gao et al. предполагают, что поглотители микрочастиц могут быть многообещающим терапевтическим методом против осложнений, связанных с ВВ при церебральном вазоспазме [46].

Значение везикулярных микроРНК в диагностике подтипов инсульта

Kalani M.Y.S. et al стремились идентифицировать находящиеся в крови внеклеточные микроРНК, полученные из ВВ, ассоциированные с основными подтипами инсульта, используя клинические образцы, взятые у субъектов со спонтанным внутримозговым кровоизлиянием (ВМК, n=19), аневризматическим субарахноидальным кровоизлиянием (САК, n=17) и ишемическим инсультом (ИИ, n=21). Исследователи выделили РНК из ВВ плазмы, секвенировали 20 малых РНК и провели биоинформационный анализ, чтобы идентифицировать биомаркеры микроРНК, характерные для разных подтипов инсульта. Выявлено 67 микроРНК, которые значительно различались в зависимости от подтипа инсульта. Подмножество микроРНК различалось между геморрагическим и ишемическим инсультами, и регрессионный анализ LASSO позволил отличить САК от других подтипов с точностью $0,972 \pm 0,002$. Дальнейшие анализы предсказали 25 классификаторов микроРНК, которые стратифицируют ВМК от ИИ с точностью $0,811 \pm 0,004$ и отличают ГИ от ИИ с точностью $0,813 \pm 0,003$. МикроРНК, выделенные из ВВ крови, обладают прогностической ценностью и могут быть способны различать основные подтипы инсульта с уточнением и валидацией. Такой биомаркер однажды может помочь в сортировке пациентов в условиях скорой помощи, чтобы, исключив ГИ, незамедлительно приступить к реперфузионной терапии [15]. Требуются дальнейшие многоцентровые исследования в этом направлении.

ВВ стволовых клеток в перспективном лечении ГИ

Терапия на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в последнее время стала привлекательной и многообещающей стратегией лечения ВМК посредством иммунной регуляции и регенерации тканей. Однако накопленные исследования показали, что терапевтические эффекты на основе МСК в основном объясняются их паракринными свойствами, особенно благодаря небольшим ВВ, которые считаются ключевыми медиаторами защитной эффективности МСК [47]. Хотя МСК рассматриваются как перспективные методы лечения ГИ,

и большое количество исследований подтвердили улучшение исходов на моделях ВМК с помощью МСК, однако это лечение несет в себе риски онкогенности и иммунного отторжения [48]. Дальнейшие исследования показали, что МСК в основном действуют через паракринные механизмы, в которых ВВ являются ключевыми медиаторами их действия [49]. Кроме того, ВВ обладают преимуществами преодоления биологического барьера (ГЭБ), удобного хранения и транспортировки, удовлетворительной биобезопасности, по сравнению с МСК.

Множественные источники сообщают, что ВВ, полученные из МСК могут улучшить прогноз ВМК путем ингибирования апоптоза нейронов, уменьшения нейровоспаления и подавления дифференцировки клеток. ВВ, полученные из miR-133b модифицированных МСК, могут снижать апоптоз нейронов после ВМК путем ингибирования экспрессии RhoA и активации ERK1/2/CREB *in vitro* [50]. ВВ, полученные из МСК костного мозга, были перенесены в нейроны при субарахноидальном кровоизлиянии на мышинной модели и с помощью везикулярной miR-21 повысили выживаемость нейронов и привели к уменьшению неврологических нарушений при САК [51].

ВВ из МСК могут доставлять микроРНК, белки или другое содержимое для усиления противовоспалительного эффекта [52]. ВВ могут играть иммуносупрессивную или иммуностимулирующую роль в зависимости от активных ингредиентов в составе ВВ и типа заболевания [53]. Несколько исследований предполагают, что ослабление и модуляция иммунных реакций могут быть многообещающим подходом к лечению ВМК [54, 55]. При остром инсульте продукты активации микроглии и гибели клеток запускают воспалительный каскад, который повреждает сосуды и паренхиму в течение нескольких минут или часов после ишемии или кровоизлияния. Иммунные вмешательства, которые ограничивают воспаление мозга, проницаемость сосудов и отек тканей, должны быть быстро внедрены, чтобы уменьшить опосредованное острой иммунной реакцией разрушение и избежать последующей иммуносупрессии. Следовательно, ВВ могут улучшить исход ВМК посредством иммунного вмешательства.

Заключение

Полученные и данные о роли ВВ в качестве потенциальных биомаркеров патофизиологических процессов в мозге при ГИ могут помочь в более точной диагностике, мониторинге и в прогнозировании исходов инсульта. Диагностический набор для ишемического и геморрагического инсульта на основе ВВ может быть разработан и использован для диагностического тестирования в условиях скорой помощи, что позволит проводить реперфузионную терапию до поступления пациентов в больницу и в конечном итоге привести к улучшению лечения пациентов с инсультом.

В совокупности представленные исследования выдвигают идею о том, что нацеливание на гематому, остановка ее роста является важной стратегией в терапии ВМК. Получены обнадеживающие экспериментальные данные о возможности безопасного гемостаза в случае применения нового гемостатического средства — эритроцитарных ВВ. Кроме того, должен быть комбинированный подход, состоящий из первичного вмешательства (для удаления гематомы, остановки внутричерепного кровотечения) вместе со вторичным вмешательством (иммуномодулирующим и нейропротекторным). К настоящему времени отсутствуют конкретные методы лечения, продемонстрировавшие эффективность в улучшении исходов, несмотря на растущее количество знаний о патологических механизмах, участвующих в повреждении головного мозга после ВМК [17]. Также имеются доказательства того, что, помимо каскадов повреждений, после ВМК запускаются механизмы защиты и репарации [56]. В случае САК исследование ВВ дает нам новый ключ к пониманию ВС. С другой стороны, циркулирующие эндотелиальные ВВ могут быть маркерами выраженности ВС, а одновременное повышение эндотелиальных и тромбоцитарных ВВ прогнозировало развитие ишемического инсульта и неврологических нарушений на фоне ВС [35]. Воздействие ВВ в большей степени связано с аномальной сосудистой активностью, возникающей в результате повреждения эндотелия. ВВ, полученные из активированных эндотелиальных клеток, могут передавать дисфункцию другим эндотелиальным клеткам-реципиентам, нарушая эндотелий-зависимую вазорелаксацию [44]. Хотя все больше исследований показывают, что ВВ могут быть вовлечены в ВС, мы не знаем, какой агент, переносимый ВВ является наиболее важным иницирующим фактором. Присутствие отрицательно заряженного ФС на поверхности является общей чертой многих ВВ и может служить мишенью для блокирования их эффектов. Ряд исследователей предполагают, что поглотители микрочастиц, такие как лактадгерин, могут быть многообещающим терапевтическим методом против осложнений, связанных с ВВ при церебральном вазоспазме [45,46].

Более глубокое понимание участия ВВ в механизмах репарации мозга после ГИ является многообещающим подходом, который может привести к разработке новых терапевтических методов. Актуальным становится лечение, направленное на улучшение неврологического восстановления за счет повышения пластичности мозга, в том числе на основе анализа содержания белка в циркулирующих ВВ, изучения сигнальных путей, вовлеченных в механизмы восстановления мозга после ГИ [50, 51]. ВВ могут быть использованы как терапевтические агенты, которые проходят через ГЭБ, в том числе ВВ из МСК, а также сконструированные инженерные ВВ. Это новый подход, который может помочь продвинуть разработку новых целевых методов лечения геморрагического инсульта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boltze J, Aronowski JA, Badaut J, et al. New Mechanistic Insights, Novel Treatment Paradigms, and Clinical Progress in Cerebrovascular Diseases. *Front Aging Neurosci*. 2021 Jan 28;13:623751. doi: 10.3389/fnagi.2021.623751.
2. World Health Organization The Top 10 Causes of Death. [(accessed on 26 April 2021)]. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
3. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019;139:e56–e528. doi: 10.1161/CIR.0000000000000659.
4. Elijovich L, Patel PV, Hemphill JC 3rd. Intracerebral hemorrhage. *Semin Neurol*. 2008 Nov;28(5):657–67. doi: 10.1055/s-0028-1105974
5. Huang ZL, Zhang JK, Prim M, Coppens J. Pseudoaneurysm as a differential for the computed tomography angiography «spot sign» in atypical presentations of intracerebral hemorrhage: illustrative case. *J Neurosurg Case Lessons*. 2022;4 doi: 10.3171/case22308.
6. Mehndiratta P, Manjila S, Ostergard T et al. Cerebral amyloid angiopathy-associated intracerebral hemorrhage: pathology and management. *Neurosurg Focus*. 2012 Apr;32(4):E7. doi: 10.3171/2012.1.FOCUS11370.
7. Zhang X, Wu Y, Cheng Q et al. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Diseases: Diagnosis and Therapy. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Jun 1;10:875376. doi: 10.3389/fcell.2022.875376.
8. Zarà M, Guidetti GF, Camera M et al. Biology and Role of Extracellular Vesicles (EVs) in the Pathogenesis of Thrombosis. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 11;20(11):2840. doi: 10.3390/ijms20112840.
9. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*. 2015 Aug 1;65(8):783–797. doi: 10.1093/biosci/biv084.
10. Zhou SS, Jin JP, Wang JQ et al. miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol Sin*. 2018 Jul;39(7):1073–1084. doi: 10.1038/aps.2018.30.
11. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*. 2019 May;234(5):5451–5465. doi: 10.1002/jcp.27486.
12. Yu X, Odenthal M, Fries JW. Exosomes as miRNA Carriers: Formation-Function-Future. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 2;17(12):2028. doi: 10.3390/ijms17122028.
13. Tetta C, Ghigo E, Silengo L et al. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine*. 2013 Aug;44(1):11–9. doi: 10.1007/s12020-012-9839-0.
14. Stenz KT, Just J, Blauenfeldt RA, Drasbek KR. Extracellular Vesicles in Acute Stroke Diagnostics. *Biomedicines*. 2020 Jul 28;8(8):248. doi: 10.3390/biomedicines8080248.
15. Kalani MYS, Alsop E, Meechoovet B et al. Extracellular microRNAs in blood differentiate between ischaemic and haemorrhagic stroke subtypes. *J Extracell Vesicles*. 2020 Jan 24;9(1):1713540. doi: 10.1080/20013078.2020.1713540
16. de Freitas RCC, Hirata RDC, Hirata MH, Aikawa E. Circulating Extracellular Vesicles As Biomarkers and Drug Delivery Vehicles in Cardiovascular Diseases. *Biomolecules*. 2021 Mar 5;11(3):388. doi: 10.3390/biom11030388.
17. Tanaka K, Toyoda K. Clinical Strategies Against Early Hematoma Expansion Following Intracerebral Hemorrhage. *Front Neurosci*. 2021 Aug 30;15:677744. doi: 10.3389/fnins.2021.677744.
18. Rymer MM. Hemorrhagic stroke: intracerebral hemorrhage. *Mo Med*. 2011 Jan-Feb;108(1):50–4.
19. Xiong XY, Wang J, Qian ZM, Yang QW. Iron and intracerebral hemorrhage: from mechanism to translation. *Transl Stroke Res*. 2014 Aug;5(4):429–41. doi: 10.1007/s12975-013-0317-7.
20. Xi G, Hua Y, Bhasin RR et al. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of extravasated red blood cells on blood flow and blood-brain barrier integrity. *Stroke*. 2001 Dec 1;32(12):2932–8. doi: 10.1161/hs1201.099820.
21. Hirsch Y, Geraghty JR, Reiter CR et al. Unpacking the Role of Extracellular Vesicles in Ischemic and Hemorrhagic Stroke: Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Transl Stroke Res*. 2023 Apr;14(2):146–159. doi: 10.1007/s12975-022-01027-2.
22. Jy W, Rehni AK, Bidot C Jr, Navarro-Quero H et al. Pharmacokinetics of Human Red Blood Cell Microparticles Prepared Using High-Pressure Extrusion Method. *Front Pharmacol*. 2018 Jun 11;9:599. doi: 10.3389/fphar.2018.00599
23. Lipets EN, Antonova OA, Shustova ON et al. Use of Thrombodynamics for revealing the participation of platelet, erythrocyte, endothelial, and monocyte microparticles in coagulation activation and propagation. *PLoS One*. 2020 May 29;15(5):e0227932. doi: 10.1371/journal.pone.0227932.
24. Rehni AK, Cho S, Quero HN et al. Red Blood Cell Microparticles Limit Hematoma Growth in Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*. 2022 Oct;53(10):3182–3191. doi: 10.1161/STROKEAHA.122.039641.
25. Bosinski TJ, El Solh AA. Recombinant factor VIII, its clinical properties, and the tissue factor pathway of coagulation. *Mini Rev Med Chem*. 2006 Oct;6(10):1111–7. Doi: 10.2174/138955706778560201.
26. Jy W, Johansen ME, Bidot C Jr et al. Red cell-derived microparticles (RMP) as haemostatic agent. *Thromb Haemost*. 2013 Oct;110(4):751–60. doi: 10.1160/TH12-12-0941.
27. Johansen ME JW, Horstman LL, Bidot C, Ahn YS. Red Cell-Derived Microparticles (RMP) Correct or Improve Abnormal Coagulation Profiles in TEG in a Variety of Disorders of Different Pathology. *Blood* 2011; 118: 2277 (Accessed 9/12/2021)
28. Rehni AK, Shukla V, Navarro Quero H, et al. Preclinical Evaluation of Safety and Biodistribution of Red Cell Microparticles: A Novel Hemostatic Agent. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2019;24:474–483. doi: 10.1177/1074248419838512
29. Kazui S, Naritomi H, Yamamoto H, et al. Enlargement of spontaneous intracerebral hemorrhage. Incidence and time course. *Stroke*. 1996;27:1783–1787. doi: 10.1161/01.str.27.10.1783

30. Walsh KB, Sekar P, Langefeld CD et al. Monocyte Count and 30-Day Case Fatality in Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*. 2015 Aug;46(8):2302-4. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.009880.
31. Klebe D, McBride D, Flores JJ et al. Modulating the immune response towards a neuroregenerative peri-injury milieu after cerebral hemorrhage. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2015 doi: 10.1007/s11481-015-9613-1.
32. Walsh KB, Campos B, Hart K et al. M2 Monocyte Microparticles Are Increased in Intracerebral Hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017 Oct;26(10):2369–2375. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.05.027
33. Huang M, Hu YY, Dong XQ. High concentrations of procoagulant microparticles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with acute basal ganglia hemorrhage are associated with poor outcome. *Surg Neurol*. 2009 Nov;72(5):481-9; discussion 489. doi: 10.1016/j.surneu.2008.12.016.
34. Dong XQ, Huang M, Hu YY et al. Time course of plasma microparticle concentrations after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Acta Neurol Scand*. 2011 Apr;123(4):280–8. doi: 10.1111/j.1600-0404.2010.01399.x
35. Lackner P, Dietmann A, Beer R et al. Cellular microparticles as a marker for cerebral vasospasm in spontaneous subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2010 Oct;41(10):2353–7. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.584995.
36. Sanborn MR, Thom SR, Bohman LE et al. Temporal dynamics of microparticle elevation following subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2012 Sep;117(3):579–86. doi: 10.3171/2012.6.JNS111163.
37. Laso-García F, Casado-Fernández L, Piniella D et al. Circulating extracellular vesicles promote recovery in a preclinical model of intracerebral hemorrhage. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2023 Mar 21;32:247–262. doi: 10.1016/j.omtn.2023.03.006.
38. Cui HJ, Yang AL, Zhou HJ et al. Buyang huanwu decoction promotes angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-2 activation through the PI3K/Akt pathway in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *BMC Complement Altern Med*. 2015 Mar 28;15:91. doi: 10.1186/s12906-015-0605-8.
39. Venkat P, Cui C, Chopp M et al. MiR-126 Mediates Brain Endothelial Cell Exosome Treatment-Induced Neurorestorative Effects After Stroke in Type 2 Diabetes Mellitus Mice. *Stroke*. 2019 Oct;50(10):2865–2874. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.025371
40. Lee EC, Ha TW, Lee DH et al. Utility of Exosomes in Ischemic and Hemorrhagic Stroke Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 28;23(15):8367. doi: 10.3390/ijms23158367
41. Neifert SN, Chapman EK, Martini ML et al. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: the Last Decade. *Transl Stroke Res*. 2021 Jun;12(3):428-446. doi: 10.1007/s12975-020-00867-0.
42. Przybycien-Szymanska MM, Ashley WW Jr. Biomarker Discovery in Cerebral Vasospasm after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2015 Jul;24(7):1453–64. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.03.047
43. Said AS, Doctor A. Influence of red blood cell-derived microparticles upon vasoregulation. *Blood Transfus*. 2017 Oct;15(6):522-534. doi: 10.2450/2017.0353-16
44. Fu L, Hu XX, Lin ZB et al. Circulating microparticles from patients with valvular heart disease and cardiac surgery inhibit endothelium-dependent vasodilation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2015 Sep;150(3):666–72. doi: 10.1016/j.jtcvs.2015.05.069.
45. Zhou Y, Cai W, Zhao Z et al. Lactadherin promotes microvesicle clearance to prevent coagulopathy and improves survival of severe TBI mice. *Blood*. 2018 Feb 1;131(5):563–572. doi: 10.1182/blood-2017-08-801738
46. Gao Y, Li K, Li X et al. Exploration of cerebral vasospasm from the perspective of microparticles. *Front Neurosci*. 2022 Oct 28;16:1013437. doi: 10.3389/fnins.2022.1013437.
47. Zou Y, Liao L, Dai J et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles/exosome: A promising therapeutic strategy for intracerebral hemorrhage. *Regen Ther*. 2023 Feb 18;22:181–190. doi: 10.1016/j.reth.2023.01.006.
48. Mousavinejad M, Andrews PW, Shoraki EK. Current Biosafety Considerations in Stem Cell Therapy. *Cell J*. 2016 Jul-Sep;18(2):281-7. doi: 10.22074/cellj.2016.4324.
49. Kusuma GD, Carthew J, Lim R, Frith JE. Effect of the Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to Engineer the Therapeutic Effect. *Stem Cells Dev*. 2017 May 1;26(9):617–631. doi: 10.1089/scd.2016.0349.
50. Shen H, Yao X, Li H et al. Role of Exosomes Derived from miR-133b Modified MSCs in an Experimental Rat Model of Intracerebral Hemorrhage. *J Mol Neurosci*. 2018 Mar;64(3):421–430. doi: 10.1007/s12031-018-1041-2.
51. Gao X, Xiong Y, Li Q et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of miR-21-5p from mesenchymal stromal cells to neurons alleviates early brain injury to improve cognitive function via the PTEN/Akt pathway after subarachnoid hemorrhage. *Cell Death Dis*. 2020 May 13;11(5):363. doi: 10.1038/s41419-020-2530-0.
52. Elia CA, Losurdo M, Malosio ML, Coco S. Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells Exert Pleiotropic Effects on Amyloid- β , Inflammation, and Regeneration: A Spark of Hope for Alzheimer's Disease from Tiny Structures? *Bioessays*. 2019 Apr;41(4):e1800199. doi: 10.1002/bies.201800199.
53. Scholl JN, Dias CK, Muller et al. Extracellular vesicles in cancer progression: are they part of the problem or part of the solution? *Nanomedicine (Lond)*. 2020 Nov;15(26):2625–2641. doi: 10.2217/nmm-2020-0256.
54. Wang J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. *Prog Neurobiol*. 2010 Dec;92(4):463–77. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.08.001.
55. Xu S, Lu J, Shao A et al. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Front Immunol*. 2020 Feb 26;11:294. doi: 10.3389/fimmu.2020.00294
56. Crilly S, Withers SE, Allan SM et al. Revisiting promising preclinical intracerebral hemorrhage studies to highlight repurposable drugs for translation. *Int J Stroke*. 2021 Feb;16(2):123–136. doi: 10.1177/1747493020972240.