

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-126-134

## ВЛИЯНИЕ ПУТЕЙ И ДОЗ ВВЕДЕНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ (ОБЗОР)

*Н.В. Пак, Е.В. Мурзина, Н.В. Аксенова, Т.Г. Крылова, В.Н. Александров*

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Терапевтический потенциал мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) признан неоспоримым: помимо способности дифференцироваться в различные типы клеток и тем самым участвовать в восстановлении поврежденных тканей и органов они обладают способностью влиять на процессы регенерации посредством секреции паракринных факторов. То есть терапия посредством ММСК представляет собой особый вид медицинского вмешательства, который обладает как системным диапазоном терапевтической эффективности, так и локальной активностью на отдельных участках органов. В течение последних десятилетий терапия ММСК постоянно находится в процессе осторожного перехода от исследовательских разработок к клинически одобренным методам лечения. Согласно данным клинических испытаний, она редко демонстрирует серьезные нежелательные явления, хорошо переносится и достаточно безопасна в краткосрочном диапазоне, однако вместе с тем она имеет ряд ограничений по применению, в основном вследствие риска злокачественной трансформации. Успешность трансплантации стволовых клеток при лечении различных заболеваний подтверждена как в доклинических исследованиях, так и в клинической практике. Главными вопросами, возникающими при оценке терапевтической эффективности клеточной терапии посредством ММСК, являются тип клеток (адипогенные, костномозговые и т. д.), способ их введения, количество вводимых клеток, оптимальное количество инъекций. Появляется все больше экспериментальных и клинических данных, свидетельствующих о том, что как адекватный путь введения, так и адекватная доза могут повысить вероятность успеха терапии с использованием ММСК. Каждый путь введения клеток сопряжен с определенными издержками и преимуществами. Однако в целом данные о сравнительной эффективности различных путей введения клеток достаточно противоречивы. Вопрос оптимальной дозы трансплантируемых клеток также дебатруется, поскольку высокие дозы ММСК могут повышать риски осложнений и не оказывать должного эффекта как при системном, так и при локальном введении. Эти аспекты требуют дополнительной систематизации имеющихся данных для достижения максимального эффекта применения клеточной терапии путем выбора наиболее безопасных и целесообразных подходов.

*Ключевые слова:* мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, клеточная терапия, трансплантация, способ введения, доза введения.

## EFFECT OF THE DELIVERY ROUTE AND DOSE OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE EFFICACY OF CELL THERAPY (REVIEW)

*N.V. Pak, E.V. Murzina, N.V. Aksenova, T.G. Krylova, V.N. Aleksandrov*

Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Multipotent mesenchymal stem cells (MMSCs) are known to be excellent therapeutic agents. Apart from their ability to differentiate into various cell types, and thus participate in the repair of injured tissues and organs, they can influence the regeneration process through secretion of paracrine factors. Thus, MMSC therapy represents a special type of medical intervention that has both a systemic range of therapeutic efficacy and local activity on

**Для корреспонденции:** Пак Наталья Викторовна. Адрес: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6. Тел. (812) 292-32-63. E-mail: natalya\_pak@mail.ru

**Corresponding author:** Natalya Pak. Address: 6, Akademika Lebedeva str., St. Petersburg, 194044, Russian Federation. Phone: (812) 292-32-63. E-mail: natalya\_pak@mail.ru

individual sites of an organ. Over the past decades, MMSC therapy has continuously been in a cautious transition from research development to clinically approved therapies. Clinical trial data has shown that this therapy is rarely associated with severe adverse events, is well tolerated and quite safe in the short-term period. However, it has a number of limitations for use, mainly due to the risk of malignant transformation. The success of stem cell transplantation in the treatment of various diseases has been confirmed both in preclinical studies and in clinical practice. The main issues that arise when assessing the therapeutic efficacy of MMSC-associated therapy are the type of cells (adipogenic, bone marrow, etc.), delivery route, number of cells injected, and the optimal number of injections. There is a growing body of experimental and clinical evidence suggesting that both an adequate delivery route and an adequate dose can increase the likelihood of success of MMSC-associated. Each cell delivery route has costs and benefits. However, there is generally contradictory evidence on the comparative efficacy of different cell delivery routes. The optimal dose of transplanted cells is also debated, as high MMSC doses may increase the risks of complications and may not have the proper effect both when administered systemically and locally. These aspects require further systematization of available data to maximize the effect of cell therapy by selecting the safest and most appropriate approaches.

*Keywords: multipotent mesenchymal stem cells, cell therapy, transplantation, delivery route, delivery dose.*

## ВВЕДЕНИЕ

Современное развитие биотехнологии, молекулярной и клеточной биологии позволяет рассматривать стволовую клетку как одно из средств лечения многочисленных заболеваний. Терапевтическое действие ММСК происходит по трем направлениям: дифференцирование и замещение клеток поврежденных тканей, продукция биологически активных молекул, а также осуществление межклеточного контакта и взаимодействие с иммунными клетками [1–3].

Лечение посредством ММСК в целом считается безопасной процедурой, но имеет некоторые ограничения. При этом основными рисками применения ММСК являются их возможная онкогенность (трансформация в опухоли, стимуляция роста опухолей) [4, 5], а также индукция выраженных провоспалительных процессов [4] и фиброзов (трансформация в миофибробласты) [4, 6, 7]. Во многих исследованиях предлагаются алгоритмы для улучшения приживаемости и дифференцировки трансплантированных клеток. Одни стратегии направлены на повышение устойчивости клеток к микроокружению в тканях реципиента, другие – на увеличение выживаемости клеток после трансплантации. Эти стратегии могут варьировать от простой модификации условий культивирования, известной как предварительное кондиционирование клеток, до генетической модификации клеток во избежание клеточного старения [8]. Существенным элементом повышения эффективности клеточной терапии и уменьшения риска побочных явлений является поиск оптимальных путей введения и доз вводимых ММСК. Несмотря на большое количество доклинических и клинических исследований, безопасность и эффективность терапии, связанной с ММСК, по-прежнему остается проблематичной для клинического применения [9, 10].

**Цель работы** – провести информационно-аналитическое исследование экспериментальных и клини-

ческих данных об эффективности различных путей и доз применения стволовых клеток как средства терапии различных заболеваний.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для системного воздействия на организм введение ММСК, как правило, осуществляется внутривенно или внутриартериально. При системном введении ММСК способны к направленной миграции (хоумингу) в места повреждения тканей в ответ на секрецию хемокинов и цитокинов [11]. Несмотря на то что точный механизм хоуминга ММСК в зону повреждения до конца не выяснен, известно, что он представляет собой многоэтапный процесс, в котором существенную роль играют хемотаксические факторы [8]. Хемоаттракция ММСК в ткань-мишень, по-видимому, в основном опосредована осью стромального фактора (SDF-1)/CXCR4, но в миграции ММСК также возможно участие моноцитарного хемоаттрактантного белка/CCR2 и гепатоцитарного белка, а также цитокинов, таких как TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  или G-CSF [12–14]. Очевидно, что внутрисосудистое введение является наименее инвазивным путем доставки, и следовательно, наиболее предпочтительным с клинической точки зрения. Однако этот путь имеет существенные недостатки, основным из которых является способность достаточно высокого процента введенных клеток задерживаться в капиллярной сети легких (эффект первого прохождения) и других органов, таких как печень, почки. Принимая во внимание, что в процессе трансмиграции ММСК должны преодолевать мембраны между эндотелиальными клетками сосудов и тканью-мишенью, очевидно, что путем системной инфузии довольно сложно целевым образом максимально эффективно доставить клетки в ткани-мишени. При этом ММСК могут образовывать микроэмболы, которые создают серьезные последствия для функционирования органов, учитывая, что предполагаемый диаметр

клеток составляет 20–30 мкм [8, 15]. При внутриартериальном пути введения ММСК в экспериментах на мышинных моделях обнаружено образование микроокклюзий, количество которых находилось в прямой зависимости от концентрации клеток, что вызывало серьезные опасения по поводу безопасности исследуемого способа доставки [16]. Присутствие ММСК или их дегрида в легочной капиллярной сети после внутривенного введения не сводится к просто временной задержке – там происходит макрофагальный фагоцитоз, а уже после этого детрит ММСК переносится далее с кровью в другие органы [17]. Одним из способов улучшения «самонаведения» клеточной диффузии является предварительное кондиционирование тканей-мишеней. Например, в ряде исследований было показано, что введение экспериментальным животным ряда гормонов, хемокинов, факторов роста, ферментов, а также воздействие на них физическими факторами (ультразвук, облучение) способствовало усилению миграции ММСК в очаг повреждения [8].

Следует отметить, что процедуру инъекции может осложнить ресуспендирование клеток в растворах с низким осмотическим давлением, поскольку механический стресс способен вызвать разрушение клеточных мембран и последующую гибель большого процента популяции клеток [18].

Установлено, что период полувыведения ММСК после системного введения составляет около 12 часов, однако при этом, как отмечалось ранее, большая часть клеток задерживается в легких, где они утилизируются или откуда мигрируют в течение 24 часов [2, 6, 8, 19]. После введения клеток непосредственно в ткани на фоне венозной блокады детрит попадает в кровеносное русло гораздо позже и в меньшем количестве. Основная часть имплантированных ММСК в течение 7 суток обнаруживается в других органах и тканях (печень, селезенка и пр.) [2, 20]. Есть данные, что после подкожной имплантации ММСК могут выживать в течение 30 суток [2, 21], однако после этого в печени, почках и селезенке не обнаруживаются [17]. После внутривенного введения клетки могут определяться в легких течение 150 суток [20]. Введение ММСК с помощью хирургической имплантации или трансэндокардиальной инъекции приводило к сохранению только 16 и 11% ММСК в миокарде соответственно [5]. Интракоронарная инфузия также вызывала задержку 11% ММСК. В целом поврежденных тканей-мишеней реально достигают примерно 0,1–2,7% введенных стволовых клеток [22]. Прочие имплантированные ММСК в основном оказывают дистанционное воздействие на регенерационные процессы посредством цитокинов, экзосом и микровезикул и проявляют преимущественно противовоспалительные, иммуномодулирующие и анти-апоптотические эффекты [23]. Следует отметить, что не

только эксперименты на животных, но и некоторые клинические испытания с использованием ММСК для лечения несовершенного остеогенеза показали, что в органе-мишени обнаруживается менее 1% клеток [15].

Опубликованы данные, свидетельствующие о том, что ММСК при локальном введении мобилизуют прогениторные клетки в очаг поражения, тем самым усиливая регенеративную активность [5, 20, 21]. При этом они улучшают заживление ран и выживаемость кожных трансплантатов. Однако, по данным экспериментальных исследований, ММСК недолго задерживаются в месте введения: в течение 1 часа большинство из них мигрирует в окружающие ткани, а через 2 суток в месте введения уже не определяются [2, 21].

При сравнительном исследовании трех различных путей доставки ММСК (внутрибрюшинного, внутривенного и анального) на модели колита у мышей было показано, что внутрибрюшинная доставка обеспечивала более высокое содержание ММСК в органах и более быстрое выздоровление экспериментальных животных [15]. Эффективность терапии оценивали по гистологическому индексу, общей массе тела животных и их выживаемости. Распределение и приживание ММСК в органах анализировали и количественно оценивали с помощью ММСК GFP+ (green fluorescent protein), а также с использованием флуоресцентной визуализации в ближней инфракрасной области. Приводятся данные, что ММСК, введенные внутрибрюшинно, образуют агрегаты с макрофагами и лимфоцитами в брюшной полости и секретируют TSG-6 (tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein), что, скорее всего, и является основным противовоспалительным механизмом ММСК. Увеличение TSG-6 выявлялось в сыворотке крови после трансплантации ММСК, при этом самый высокий уровень сывороточного TSG-6 обнаруживался после внутрибрюшинного введения. Следует отметить, что в брюшной полости содержится большое количество иммунных клеток, которые могут стать компонентами агрегатов ММСК. Такая тесная межклеточная перекрестная связь между ММСК и иммунными клетками может быть еще одним фактором, способствующим улучшению терапевтических эффектов [15]. Отмечалось также, что внутрибрюшинная инъекция обеспечивала лучшее восстановление слизистой оболочки и более высокое приживание клеток в воспаленной толстой кишке.

Внутрибрюшинное введение ММСК оказывало положительное влияние на восстановление мышей с экспериментальной компрессионной травмой спинного мозга (ТСМ) [24]. Оценочным критерием являлось влияние трансплантации ММСК на сохранение белого вещества. Было показано, что в опытных группах животных, получивших ММСК в дозе  $8 \times 10^5$  клеток/мышь, регистрировали большее

количество сохраненных волокон. Кроме того, для этих групп были характерны более высокие уровни трофических факторов (нейротрофический фактор головного мозга, фактор роста нервов, нейротрофин-3 и нейротрофин-4) в спинном мозге, которые улучшали двигательную активность. Таким образом, внутривенные или внутривенные инъекции ММСК способствовали благоприятным результатам в качестве средства лечения ТСМ без существенной статистической разницы между ними, подтверждая идею о том, что эти клетки не заменяют поврежденные клетки спинного мозга, а действуют через локальные паракринные эффекты.

F. Yousefi et al. (2013) было показано, что внутривенная инъекция ММСК способна снижать количество воспалительных клеток-агрессоров в головном мозге и улучшать клинические показатели у мышей с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом [25].

Есть данные, что внутривенное введение ММСК способно подавлять воспаление брюшины за счет восстановления мезотелиального слоя и снижения активации комплемента при грибковом или дрожжевом перитоните у крыс и почти полностью предотвращать развитие экспериментального аутоиммунного увеита у мышей за счет подавления Th1/Th7 иммунных ответов, защищая сетчатку глаза от иммуно-опосредованного повреждения [24].

В исследованиях M. Wang et al. (2016) показано, что наилучшие результаты при лечении колита в эксперименте достигались посредством внутривенной трансплантации ММСК [15]. Выявлено, что ММСК GFP+ мигрировали в воспаленную толстую кишку и даже проходили через всю кишечную стенку, достигая люминальной стороны. Этот вывод согласуется с данными, в соответствии с которыми внутривенно введенные ММСК мигрируют и приживаются в воспаленной толстой кишке [26]. Точные механизмы этого явления до сих пор не известны, однако можно предположить, что в процесс вовлечены цитокины. Известно, что генетическая модификация ММСК для повышения экспрессии CXCR4 приводит к увеличению миграции клеток в кишечник при радиационном энтерите, а вследствие этого – к улучшению состояния. Экспериментальные исследования H. Yang et al. (2019) показали, что однократная внутривенная инъекция ММСК ( $2 \times 10^6$  клеток/мышь) значительно улучшала клинические параметры массы тела и длины толстой кишки, а также размеры язв и гистологические показатели у мышей с колитом по сравнению с таковыми в контрольной группе [27].

Тем не менее в некоторых случаях внутривенная инъекция характеризуется как более успешная по сравнению с внутривенной [28]. Это несоответствие может быть связано с разными типами

ММСК, полученными из жировой ткани и костного мозга, различающимися по скорости пролиферации, способности к дифференцировке, по экспрессии цитокинового секрета и хемокинового рецептора, которые могут влиять на миграцию, приживание и даже локальную функцию [29, 30]. Есть данные, что при регенерации кости терапия на основе ММСК костного мозга демонстрируют самый высокий остеогенный потенциал по сравнению с ММСК, полученными из других тканей [8]. Кроме того, разные источники ММСК с разными путями доставки оказывают разное терапевтическое воздействие на повреждения легких и сердечно-сосудистой системы [31]. Следовательно, биологические различия ММСК из разных источников следует учитывать при интерпретации результатов исследований и выборе для конкретного клинического применения. Между тем существует мнение, что невозможно установить, какой из источников (костный мозг или жировая ткань) стволовых клеток обеспечивает лучшие результаты для клеточной терапии, поскольку иммунофенотипы стволовых клеток костного мозга и жировой ткани идентичны более чем на 90% [9]. Помимо этого, при оценке эффективности важно учитывать, что ММСК обладают способностью оказывать свое терапевтическое действие дистально, за счет модуляторных цитокинов [32].

Было предложено внутримышечное введение ММСК в качестве лучшей альтернативы внутривенному введению [33]. Экспериментальные данные L.R. Braid et al. (2018) свидетельствуют о том, что если клетки, введенные внутривенно, не обнаруживались уже через несколько дней после введения, а клетки, доставленные внутривенно и подкожно, обнаруживались в течение 3–4 недель, то ММСК, введенные внутримышечно, выживали *in situ* более 5 месяцев. Аллогенная однократная внутримышечная трансплантация ММСК, полученных из пупочного канатика, крысам с моделированной ишемией задних конечностей способствовала функциональному и морфологическому восстановлению ишемизированной скелетной мышечной ткани [34]. При этом клетки, вводимые подкожно животным, стимулировали ангиогенез в области повреждения. В целом довольно многочисленные экспериментальные исследования показали положительное влияние ММСК на функциональное восстановление при ишемическом инсульте, что связывают со способностью ММСК усиливать эндогенный восстановительный потенциал нервной ткани [35, 36]. Это обусловлено действием выделяемых клетками биоактивных веществ, которые активируют и стимулируют другие типы клеток [37]. Выбор оптимального пути доставки ММСК при ишемии головного мозга зависит от типа повреждения центральной нервной системы (ЦНС) (очаговое или многоочаговое). Особенности

очагового повреждения ЦНС позволяют предположить, что наиболее подходящим способом может оказаться интрацеребральная трансплантация клеток непосредственно в очаг повреждения, а при нескольких областях поражения – системная интраваскулярная или эндолюмбальная [37].

Показано, что внутрипортальное и внутривенное введение ММСК при экспериментальном циррозе печени способствует более быстрому восстановлению функции печени. При этом наибольшее снижение массы печени отмечалось при внутрипортальном введении стволовых клеток [38]. Введение меченых акридиновым оранжевым ММСК внутривенно, внутрибрюшинно, в печеночную артерию или в портальную вену в дозе  $4 \times 10^6$  клеток/кг массы тела показало значительное увеличение количества клеток в печени после ее субтотальной резекции вне зависимости от способа введения [39]. При этом внутрибрюшинный способ введения клеток характеризовался как наименее эффективный.

При коррекции диабета в эксперименте внутривенное введение ММСК костного мозга статистически значимо способствовало уменьшению уровня глюкозы у животных опытной группы относительно контрольной [40].

Обнаружено, что имплантация ММСК способствует неврологическому восстановлению при моделировании черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у крыс [41]. Внутривенное введение клеток крысам снижало количество микроглии и других воспалительных клеток, а также выработку провоспалительных цитокинов и стимулировало синтез противовоспалительных цитокинов, приводящих к ингибированию воспалительных реакций, вызванных ЧМТ [42].

В клинической практике мультипотентный и секреторный потенциал ММСК находит применение в сфере регенеративной медицины для восстановления поврежденных травмами или развившейся патологией тканевых структур организма (комбустиология, травматология, стоматология и пр.) При этом введение стволовых клеток пациенту, как правило, осуществляется внутривенно для обеспечения системного воздействия на организм больного [2, 23]. Прямое сравнение методов доставки здесь часто отсутствует из-за проблем с материально-технической базой [5]. Есть данные, что однократное применение ММСК в достаточной дозе сопровождается благоприятным клиническим эффектом через 3–6 месяцев (и более), а в некоторых случаях ожидаемый лечебный результат достигается повторным курсом лечения через 1–2 недели (4–6 месяцев) [2, 43–46].

Представлен опыт внутривенного введения ММСК пациентам с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) на фоне ишемической болезни сердца. Показано, что внутривенное введение ауто-

логичных ММСК в дозе  $50 \times 10^6$  клеток в сочетании со стандартной медикаментозной терапией улучшает основные параметры гемодинамики и снижает уровень биохимических маркеров ХСН [47]. Кроме того, есть данные об успешном применении интракоронарного и интрамиокардиального путей введения клеток при лечении ишемических проблем в клинической практике [48].

На сегодняшний день проведено 125 клинических испытаний с применением ММСК при неврологических заболеваниях [31], в том числе при лечении ЧМТ. Введение аутологичных ММСК костного мозга пациентам в подострую фазу ЧМТ приводило к улучшению неврологической функции у 40% больных [49, 50], способствовало восстановлению сознания, двигательной и когнитивной функций [51]. Для терапии ЧМТ применяется внутривенный путь введения, поскольку доставка ММСК через внутримозговой путь хоть и считается наиболее эффективной, однако является и наиболее инвазивной [31].

Результаты клинических исследований по терапии цирроза печени с использованием ММСК противоречивы и не всегда совпадают с результатами экспериментальных исследований [52]. Тем не менее неконтролируемые клинические исследования показали, что введение аутологичных ММСК в артериальное русло печени путем эндоваскулярной хирургии безопасно, хорошо переносится, дает положительный эффект у пациентов с циррозом печени различной этиологии [53].

Для лечения пациентов с патологией коленного сустава доставка аутологичных ММСК осуществлялась путем внутрисуставного введения культуры клеток, выделенных из разных источников [9, 54]. При этом отмечалось, что отдаленные контрольные показатели значительно превосходили аналогичные в контрольной группе, получавшей традиционное лечение [54].

Применение внутрибрюшинной трансплантации клеток в клинической практике имеет существенные ограничения, обусловленные возможными осложнениями. Эти осложнения включают катетерную инфекцию и механическое повреждение внутрибрюшных структур [15]. В то же время следует отметить, что высокая васкуляризация брюшины позволяет большему количеству трансплантированных клеток одновременно получать доступ к лимфатической и кровеносной системам, что, безусловно, способствует их приживлению в местах повреждения тканей и зонах воспалений [24]. Очевидно, что тренд к расширению применения интраперитонеальных инъекций в процессе применения клеточной терапии будет нарастать и повлияет на интенсификацию инновационных разработок, направленных на предотвращение осложнений.

Количество вводимых клеток также является важной составляющей терапевтического успеха применения ММСК. Повышение начальной дозы вводимых клеток обеспечивает увеличение количества клеток, достигающих места повреждения. В экспериментальных исследованиях применяются различные дозы ММСК, позиционирующиеся как эффективные. В протоколах экспериментальных исследований фигурируют дозы от  $3 \times 10^5$  клеток/мышь до  $2 \times 10^6$  клеток/мышь [15, 24, 25]. Иногда для наблюдения какого-либо эффекта применяются и большие дозы, до  $5 \times 10^6$  клеток/мышь [37, 55]. Однако, по заключению исследователей, внутривенные инъекции ММСК в большой дозе (до  $1 \times 10^7$  клеток/мышь) могут привести к увеличению смертности мышей из-за потенциальной эмболии легочных сосудов.

Для достижения терапевтического эффекта у крыс в эксперименте, как правило, применяются дозы ММСК в диапазоне от  $5 \times 10^5$  до  $5 \times 10^6$  клеток/крыса [55, 56]. При этом выживаемость клеток после трансплантации в реципиентную ткань зависит не только от дозы, но и от продолжительности и условий культивирования, таких как наличие сыворотки или кислорода, механического стресса во время процедуры имплантации или гибели клеток из-за отсутствия фиксации [56, 57]. Есть мнение, что при региональном введении (эндолумбальном, внутрибрюшинном, внутримышечном) происходит десятикратное снижение терапевтической дозы клеток [2].

Существенной проблемой является перевод экспериментальной дозировки клеточного продукта для применения в клинической практике. Как упоминалось выше, обычно используемая доза клеток составляет  $1 \times 10^6$  клеток/мышь (массой тела 30 г), что эквивалентно  $33 \times 10^6$  клеток/кг, или приблизительно 2,3 миллиарда клеток для взрослого человека весом 70 кг [14]. По предположению исследователей, высокие дозы ММСК могут повысить риски осложнений, в том числе аллоиммунизацию при применении аллогенных ММСК, а также не оказывать должного эффекта как при внутривенном, так и при локальном применении [2, 22, 58]. С другой стороны, понятия «оптимальная доза» вводимых системно ММСК в клинической практике пока не существует, поскольку отсутствует четкая корреляция доза–эффект [8]. На сегодняшний день стандартной считается доза 1–2 млн клеток на 1 кг массы [2, 58]. При этом в процессе клеточной терапии у новорожденных применяются в 5–10 раз более высокие дозы клеток по сравнению со стандартными, но, как правило, однократно [2, 43].

Эффективность различных путей введения клеток была исследована с помощью моделирования в эксперименте и в клинических условиях при лечении болезни Паркинсона с использованием аутологич-

ных ММСК [59]. Суммарная доза 160 тыс. клеток на 1 кг массы (малая доза), введенных внутривенно, приводила к статистически значимому снижению двигательных расстройств по сравнению с исходными данными. При этом трансназальное введение ММСК в аналогичной дозе пациентам другой группы оказывало похожий эффект. На основании полученных данных при разработке длительной поддерживающей терапии болезни Паркинсона было рекомендовано учитывать эффективность малоинвазивных способов введения ММСК в малых дозах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подавляющее большинство доклинических и клинических исследований показали, что имплантация ММСК эффективна, безопасна и хорошо переносима. Анализ данных научной литературы свидетельствует об активном исследовательском поиске оптимальных дозировок и путей доставки клеточного продукта. Следует отметить, что в целях устранения возможных побочных явлений в настоящее время предпринимаются усилия по разработке возможности использования экзосом и внеклеточных везикул в качестве «бесклеточного» способа реализации свойств ММСК. С учетом необходимости обоснования терапевтической стратегии четким и глубоким пониманием механизмов заболевания становится очевидным, что применение клеточного продукта в практическом здравоохранении требует максимальной адаптации к типу заболевания или повреждения в плане выбора имплантируемых доз ММСК и способов их доставки. В целом результаты исследований и мнения разных авторов по этому вопросу далеко неоднозначны и порой противоречивы, поэтому разностороннее изучение терапевтического потенциала ММСК по-прежнему остается актуальным.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem cells. Transl Med.* 2017; 6 (6): 1445–1451. doi: 10.1002/sctm.17-0051.
2. Потанин МП. Пути повышения эффективности клеточной терапии на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Гены и клетки.* 2021; 16 (4): 22–28. Potapnev MP. Ways to improve the efficiency of cell therapy based on multipotent mesenchymal stromal cells. *Genes and cells.* 2021; 16 (4): 22–28. [In Russ, English abstract]. doi: 10.23868/202112003.
3. Москалев АВ, Гумилевский БЮ, Апчел АВ, Цыган ВН. Стволовые клетки и их физиологические эффекты. *Вестник Российской военно-медицинской академии.* 2019; 68 (4): 172–180. Moskalev AV, Gumilevsky BYu, Apchel AV, Tsygan VN. Stem cells and their physiological

- effects. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2019; 68 (4): 172–180. [In Russ, English abstract].
4. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells*. 2019; 8 (8): 886. doi: 10.3390/cells8080886.
  5. Caplan H, Olson SD, Kumar A, George M, Prabhakara KS, Wenzel P et al. Mesenchymal stromal cell therapeutic delivery: translational challenges to clinical application. *Front Immunol*. 2019; 10: 1645. doi: 10.3389/fimmu.2019.01645.
  6. Паюшина ОВ, Цомартова Р, Черешнева ЕВ, Иванова МЮ, Кузнецов СЛ. Регуляторное влияние мезенхимных стромальных клеток на развитие фиброза печени: клеточно-молекулярные механизмы и перспективы клинического применения. *Журнал общей биологии*. 2020; 81 (2): 83–95. Payushina OV, Tsomartova R, Chereshneva EV, Ivanova MYu, Kuznetsov SL. Regulatory influence of mesenchymal stromal cells on the development of liver fibrosis: cellular and molecular mechanisms and prospects for clinical application. *Journal of General Biology*. 2020; 81 (2): 83–95. [In Russ, English abstract]. doi: 10.31857/S0044459620020062.
  7. Popova AP, Bozyk PD, Goldsmith AM, Linn MJ, Lei J, Bentley JK, Hershenson MB. Autocrine production of TGF- $\beta$ 1 promotes myofibroblastic differentiation of neonatal lung mesenchymal stem cells. *Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol*. 2010; 298: 735–743. doi: 10.1152/ajplung.00347.2009.
  8. García-Sánchez D, Fernández D, Rodríguez-Rey JC, Pérez-Campo FM. Enhancing survival, engraftment, and osteogenic potential of mesenchymal stem cells *World J Stem Cells*. 2019; 11 (10): 748–763. doi: 10.4252/wjsc.v11.i10.748.
  9. Di Matteo B, Vandenbulcke F, Vitale ND, Iacono F, Ashmore K, Marcacci M, Kon E. Minimally manipulated mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis: A systematic review of clinical evidence. *Stem Cells Int*. 2019; 2019: 1735242. doi: 10.1155/2019/1735242.
  10. Wang Z, Wang L, Su X, Pu J, Jiang M, He B. Rational transplant timing and dose of mesenchymal stromal cells in patients with acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8 (1): 1–10. doi: 10.1186/s13287-016-0450-9.
  11. Жидкова ОВ. Взаимодействие мезенхимальных стромальных и эндотелиальных клеток в условиях пониженного содержания кислорода и провоспалительной активации: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2020; 24. Zhidkova OV. Vzaimodejstvie mezenhimal'nyh stromal'nyh i endotelial'nyh kletok v usloviyah ponizhennogo soderzhaniya kisloroda i provospalitel'noj aktivacii. [Dissertation]. Moscow, 2020; 24.
  12. De Becker A, Riet IV. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World Stem Cells*. 2016; 8 (3): 73–87. doi: 10.4252/wjsc.v8.i3.73.
  13. Heirani-Tabasi A, Toosi S, Mirahmadi M, Mishan MA, Bidkhorri HR, Bahrami AR et al. Chemokine receptors expression in MSCs: Comparative analysis in different sources and passages. *Tissue Eng Regen Med*. 2017; 14 (5): 605–615. doi: 10.1007/s13770-017-0069-7.
  14. Lin W, Xu L, Zwingenberger S. Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing. *J Orthop Translat*. 2017; 9: 19–27. doi: 10.1016/j.jot.2017.03.002.
  15. Wang M, Liang C, Hu H, Zhou L, Xu B, Wang X et al. Intraperitoneal injection (IP), Intravenous injection (IV) or anal injection (AI)? Best way for mesenchymal stem cells transplantation for colitis. *Sci Rep*. 2016; 6 (1): 30696. doi: 10.1038/srep30696.
  16. Cui LL, Kerkelä E, Bakreen A, Nitzsche F, Andrzejewska A, Nowakowski A et al. The cerebral embolism evoked by intra-arterial delivery of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in rats is related to cell dose and infusion velocity. *Stem Cell Res Ther*. 2015; 6 (1): 11. doi: 10.1186/srct544.
  17. Майбородин ИВ, Маслов ПН, Михеева ТВ, Хоме-нюк СВ, Майбородина ВИ, Морозов ВВ и др. Распределение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и их детрита по организму после подкожного введения. *Журнал общей биологии*. 2020; 81 (2): 96–107. Maiborodin IV, Maslov RN, Mikheeva TV, Khomenyuk SV, Maiborodina VI, Morozov VV et al. Distribution of multipotent mesenchymal stromal cells and their detritus throughout the body after subcutaneous injection. *Journal of General Biology*. 2020; 81 (2): 96–107. [In Russ, English abstract]. doi: 10.31857/S0044459620020050.
  18. Aguado BA, Mulyasmita W, Su J, Lampe KJ, Heilshorn SC. Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18 (7–8): 806–815. doi: 10.1089/ten.tea.2011.0391.
  19. Weiss AR, Dahlke MN. Immunomodulation by mesenchymal stem cells (MSCs): mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol*. 2019; 10: 1191. doi: 10.3389/fimmu.2019.01191.
  20. Zhuang WZ, Lin YH, Su LJ, Wu MS, Jeng HY, Chang HC et al. Mesenchymal stem/stromal cell-based therapy: mechanism, systemic safety and biodistribution for precision clinical application. *J Biomed Sci*. 2021; 28 (1): 28. doi: 10.1186/s12929-021-00725-7.
  21. Levy O, Kuai R, Siren EM, Bhere D, Milton Y, Nissar N et al. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. *Sci Adv*. 2020; 6 (30): eaba6884. doi: 10.1126/sciadv.aba6884.
  22. Kouroupis D, Sanjurjo-Rodriguez C, Jones E, Correa D. Mesenchymal stem cell functionalization for enhanced therapeutic applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2019; 25 (1): 55–77. doi: 10.1089/ten.teb.2018.0118.
  23. Kabat M, Bobkov I, Kumar S, Grumet M. Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004–2018: Is efficacy optimal in narrow dose range? *Stem cells Transl Med*. 2020; 9 (1): 17–27. doi: 10.1002/sctm.19-0202.
  24. Ramalho BS, de Almeida FM, Sales CM, de Lima S, Martinez AMB. Injection of bone marrow mesenchymal stem cells by intravenous or intraperitoneal routes is a viable alternative to spinal cord injury treatment in mice. *Neural Regen Res*. 2018; 13 (6): 1046–1053. doi: 10.4103/1673-5374.233448.
  25. Yousefi F, Ebtekar M, Soleimani M, Soudi S, Hassemi SM. Comparison of *in vivo* immunomodulatory ef-

- fects of intravenous and intraperitoneal administration of adipose-tissue mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Int Immunopharmacol.* 2013; 17 (3): 608–616. doi: 10.1016/j.intimp.2013.07.016.
26. Castelo-Branco MT, Soares ID, Lopes DV, Buongustino F, Martinusso CA, do Rosario A Jr et al. Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. *PLoS One.* 2012; 7 (3): e33360. doi: 10.1371/journal.pone.0033360.
  27. Yang H, Feng F, Fu Q, Xu S, Hao X, Qiu Y et al. Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells promote healing via TNF- $\alpha$ -stimulated gene-6 in inflammatory bowel disease models. *Cell Death Dis.* 2019; 10 (10): 718. doi: 10.1038/s41419-019-1957-7.
  28. Gonçalves FC, Schneider N, Pinto FO, Meyer FS, Visiolli F, Pfaffenseller B et al. Intravenous vs intraperitoneal mesenchymal stem cells administration: what is the best route for treating experimental colitis? *World J Gastroenterol.* 2014; 20 (48): 18228–18239. doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18228.
  29. Li C, Wu X, Tong J, Yang X, Zhao J, Zheng Q et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6 (1): 55. doi: 10.1186/s13287-015-0066-5.
  30. Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med.* 2016; 37 (1): 115–125. doi: 10.3892/ijmm.2015.2413.
  31. Zhang K, Jiang IY, Wang B, Li T, Shang D, Zhang X. Mesenchymal stem cell therapy: a potential treatment targeting pathological manifestations of traumatic brain injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2022; 2022: 4645021. doi: 10.1155/2022/4645021.
  32. Sala E, Genua M, Petti L, Arena V. Mesenchymal stem cells reduce colitis in mice via release of TSG6, independently of their localization to the intestine. *Gastroenterol.* 2015; 149 (1): 163–176. doi: 10.1053/j.gastro.2015.03.013.
  33. Braid LR, Wood CA, Wiese DM, Ford BN. Intramuscular administration potentiates extended dwell time of mesenchymal stromal cells compared to other routes. *Cytotherapy.* 2018; 20 (2): 232–244. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.09.
  34. Арутюнян ИВ, Фатхудинов ТХ, Ельчанинов ФВ, Макаров АВ, Васюкова ОА, Усман НЮ и др. Исследование механизмов терапевтической активности аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика в модели ишемии задних конечностей крыс. *Гены и клетки.* 2018; 13 (1): 82–89. Arutyunyan IV, Fatkhudinov TK, Elchaninov FV, Makarov AV, Vasyukova OA, Usman NYu et al. Investigation of the mechanisms of therapeutic activity of allogeneic multipotent mesenchymal umbilical cord stromal cells in a rat hind limb ischemia model. *Genes and Cells.* 2018; 13 (1): 82–89. [In Russ, English abstract]. doi: 10.23868/201805010.
  35. Fu Y, Karbaat L, Wu L, Leijten J, Both SK, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells in tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017; 23 (6): 515–528. doi: 10.1089/ten.teb.2016.0365.
  36. Калинина ЮА, Гилерович ЕГ, Коржевский ДЭ. Астроциты и их участие в механизмах терапевтического действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при ишемическом повреждении головного мозга. *Гены и клетки.* 2019; 14 (1): 33–40. Kalinina YuA, Gilerovich EG, Korzhevsky DE. Astrocytes and their involvement in the mechanisms of therapeutic action of multipotent mesenchymal stromal cells in ischemic brain injury. *Genes and Cells.* 2019; 14 (1): 33–40. [In Russ, English abstract]. doi: 10.23868/201903004.
  37. Александров ВН, Камилова ТА, Мартынов БВ, Калюжная ЛИ. Клеточная терапия при ишемическом инсульте. *Вестник Российской военно-медицинской академии.* 2013; 43 (3): 199–205. Aleksandrov VN, Kamilova TA, Martynov BV, Kalyuzhnaya LI. Kletochnaya terapiya pri ishemicheskom insul'te. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy.* 2013; 43 (3): 199–205. [In Russ].
  38. Коткас ИЕ, Земляной ВП. Эффективность использования стволовых клеток в лечении цирроза печени (экспериментальное исследование). *Таврический медико-биологический вестник.* 2020; 23 (1): 54–61. Kotkas IE, Zemlyanoy VP. The effectiveness of the use of stem cells in the treatment of liver cirrhosis (experimental study). *Tavrishesky medico-biological bulletin.* 2020; 23 (1): 54–61. [In Russ, English abstract]. doi: 10.37279/2070-8092-2020-23-1-54-61.
  39. Маклакова ИЮ, Гребнев ДЮ, Юсупова ВЧ, Примаква ЕА. Изучение хоуминга ММСК после резекции печени. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63 (1): 40–45. Maklakova IYu, Grebnev DYu, Yusupova VCh, Primakova EA. Study of MMSC homing after liver resection. *Pathological Physiology and Experimental Therapy.* 2019; 63 (1): 40–45. [In Russ, English abstract]. doi: 10.25557/0031-2991.2019.01.40-45.
  40. Дорошенко ОС, Прокопова АВ, Гостюхина АА. Биохимические показатели сыворотки крови у крыс при аллоксан-индуцированном диабете и его коррекции клетками костного мозга. *Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: тезисы докл. науч. конф.* Томск, 2020: 480–483. Doroshenko OS, Prokopova AV, Gostyukhina AA. Biochemical parameters of blood serum in rats with alloxan-induced diabetes and its correction by bone marrow cells. *Current issues of fundamental and clinical medicine: abstracts of the report of a scientific conference.* Tomsk, 2020: 480–483.
  41. Chen Y, Li J, Ma B, Li N, Wang S, Sun Z et al. MSC-derived exosomes promote recovery from traumatic brain injury via microglia/macrophages in rat. *Aging.* 2020; 12 (18): 18274–18296. doi: 10.18632/aging.103692.
  42. Matthey MA, Pati S, Lee JW. Concise review: mesenchymal stem (stromal) cells: biology and preclinical evidence for therapeutic potential for organ dysfunction

- following trauma or sepsis. *Stem Cells*. 2017; 35 (2): 316–324. doi: 10.1002/stem.2551.
43. Nitkin CR, Rajasingh J, Pisano C, Besner GE, Thébaud B, Sampath V. Stem cell therapy for preventing neonatal diseases in the 21st century: current understanding and challenges. *Pediatr Res*. 2019; 87 (2): 265–276. doi: 10.1038/s41390-019-0425-5.
44. Hlebokazov F, Dakukina T, Potapnev M, Kosmacheva S, Moroz L, Misiuk N et al. Clinical benefits of single vs repeated courses of mesenchymal stem cell therapy in epilepsy patients. *Clin Neurol Neurosurg*. 2021; 207: 106736. doi: 10.1016/j.clineuro.2021.106736.
45. Grégoire C, Lechanteur C, Briquet A, Baudoux É, Baron F, Louis E, Beguin Y. Review article: mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017; 45 (2): 205–221. doi: 10.1111/apt.13864.
46. Elgaz S, Kuçi Z, Kuçi S, Bönig H, Bader P. Clinical use of mesenchymal stromal cells in the treatment of acute graft-versus-host disease. *Transf Med Hemother*. 2019; 46 (1): 27–34. doi: 10.1159/000496809.
47. Сергиенко НВ, Налетова ЕН. Влияние клеточной терапии на биохимические маркеры сердечной недостаточности у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2016; 1: 50–56. Sergienko NV, Naletova EN. Vliyanie kletochnoj terapii na biohimicheskie markery serdechnoj nedostatochnosti u pacientov s ishemicheskoj boleznyu serdca. *Nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»*. 2016; (1): 50–56. [In Russ].
48. Смолянинов АБ, Иволгин ДА, Айзенштадт АА. Мезенхимальные стволовые клетки: перспективы применения в кардиологии. *Кардиологический вестник*. 2013; 8 (2): 5–11. Smolyaninov AB, Ivolgin DA, Aizenshtadt AA. Mesenchymal stem cells: perspectives of cardiologic application. *Cardiological Bulletin*. 2013; 8 (2): 5–11. [In Russ, English abstract].
49. Andrzejewska A, Dabrowska S, Lukomska B, Janowski M. Mesenchymal stem cells for neurological disorders. *Adv Sci*. 2021; 8 (7): 2002944. doi: 10.1002/advs.202002944.
50. Tian C, Wang X, Wang X, Wang L, Wang X, Wu S, Wan Z. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy in the subacute stage of traumatic brain injury by lumbar puncture. *Exp Clin Transplant*. 2013; 11 (2): 176–181. doi: 10.6002/ect.2012.0053.
51. Viet QHN, Nguyen VQ, Le Hoang DM, Thi THP, Tran HP, Thi CHC. Ability to regulate immunity of mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic brain injury. *Neurol Sci*. 2022; 43 (3): 2157–2164. doi: 10.1007/s10072-021-05529-z.
52. Zhang Z, Wang FS. Stem cell therapies for liver failure and cirrhosis. *J Hepatol*. 2013; 59 (1): 183–185. doi: 10.1016/j.jhep.2013.01.018.
53. Коткас ИЕ, Енукашвили НИ, Асадулаев ШМ, Чубарь АВ. Использование клеточных технологий в лечении цирроза печени (оценка эффективности и способ визуализации введенных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток). *Наука и инновации в медицине*. 2020; 5 (3): 197–203. Kotkas IE, Enuakashvili NI, Asadulayev SM, Chubar AV. Autologous mesenchymal stem cells in treatment of liver cirrhosis: evaluation of effectiveness and visualization method. *Science & Innovations in Medicine*. 2020; 5 (3): 197–203. [In Russ, English abstract]. doi: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-197-203.
54. Конеv ВА, Лабутин ДВ, Божкова СА. Экспериментальное обоснование клинического применения стимуляторов остеогенеза в травматологии и ортопедии (обзор литературы). *Сибирское медицинское обозрение*. 2021; 4 (130): 5–17. Konev VA, Labutin DV, Bozhkova SA. Experimental justification for clinical application of bone growth stimulators in traumatology and orthopaedics (a review). *Siberian Medical Review*. 2021; 4 (130): 5–17. [In Russ, English abstract]. doi: 10.20333/25000136-2021-4-5-17.
55. Чеботарева АА. Влияние интактных и апоптоз-индуцированных мезенхимальных стволовых клеток на динамику апоптоза в почечной ткани при экспериментальном остром повреждении почек. *Вестник новых медицинских технологий*. 2016; 23 (4): 88–93. Chebotareva AA. Influence of intact and apoptosis-induced mesenchymal stem cells on the dynamics of apoptosis in the renal tissue in experimental acute kidney injury. *Bulletin of new medical technologies*. 2016; 23 (4): 88–93. [In Russ, English abstract]. doi: 10.12737/23855.
56. Демьяненко ЕВ, Глухов АИ, Грызунова ГК. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на показатели апоптоза в паренхиме почек на фоне экспериментального стресса. *Acta Biomedica Scientifica*. 2019; 4 (1): 138–142. Demyanenko EV, Glukhov AI, Gryzunova GK. Effect of mesenchymal stem cells on apoptosis rates in the renal parenchyma under experimental stress. *Acta Biomedica Scientifica*. 2019; 4 (1): 138–142. [In Russ, English abstract]. doi: 10.29413/ABS.2019-4.1.21.
57. Shakouri-Motlagh A, O'Connor AJ, Brennecke SP, Kalionis B, Heath DE. Native and solubilized decellularized extracellular matrix: A critical assessment of their potential for improving the expansion of mesenchymal stem cells. *Acta Biomater*. 2017; 55: 1–12. doi: 10.1016/j.actbio.2017.04.014.
58. Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*. 2018; 22: 824–833. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.004.
59. Алейникова НЕ, Чижик ВА, Бойко АВ, Нижегородова ДБ, Зафранская ММ, Пономарев ВВ. Опыт применения клеточной терапии болезни Паркинсона: эффективность малоинвазивных способов трансплантации. *Наука и здравоохранение*. 2021; 23 (2): 81–91. Aleinikova NE, Chizhik VA, Boyko AV, Nizhegorodova DB, Zafranskaya MM, Ponomarev VV. Experience in the use of cell therapy for Parkinson's disease: the effectiveness of minimally invasive transplantation methods. *Science and Health*. 2021; 23 (2): 81–91. [In Russ, English abstract]. doi: 10.34689/SH.2021.23.2.008.

Статья поступила в редакцию 29.08.2023 г.  
The article was submitted to the journal on 29.08.2023