

## Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте

И.Б. Соколова<sup>1</sup>, Н.Н. Зинькова<sup>1</sup>, А.А. Билибина<sup>1</sup>, П.В. Кругляков<sup>1</sup>, Е.Г. Гилерович<sup>2</sup>, Д.Г. Полинцев<sup>1</sup>, В.А. Отеллин<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> ООО «Транс–Технологии», Санкт–Петербург

<sup>2</sup> ГУ Научно–исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт–Петербург

<sup>3</sup> Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН Россия, Санкт–Петербург

### Cellular therapy potential in the treatment of ischemic stroke in experiment

I.B. Sokolova<sup>1</sup>, N.N. Zin'kova<sup>1</sup>, A.A. Bilibina<sup>1</sup>, P.V. Kruglyakov<sup>1</sup>, E.G. Gielerovich<sup>2</sup>, D.G. Polyntsev<sup>1</sup>, V.A. Ottelin<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> «Trans–Technologies» JSC (joint–stock company), Saint–Petersburg

<sup>2</sup> Institute of Experimental Medicine, RAMS, Saint–Petersburg

<sup>3</sup> I.P. Pavlov Institute of Physiology, RAS, Saint–Petersburg

Изучена возможность и эффективность внутривенной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток после ишемического инсульта у крыс. Показано, что данный терапевтический метод активирует пролиферацию эндогенных нейрональных стволовых клеток в субэпендимной зоне боковых желудочков мозга и ангиогенез в пограничной с повреждением области, способствует сохранению жизнеспособности нейронов в этой же зоне, уменьшает объем повреждения тканей мозга и ускоряет восстановление когнитивных функций животных.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, ишемический инсульт, ангиогенез, нейроны.

### Введение

Ишемический инсульт – результат тяжелейшего расстройства мозгового кровообращения – в большинстве случаев приводит к инвалидизации и социальной дезадаптации пациентов. Это связано с тем, что головной мозг очень чувствителен к недостатку кислорода. Понижение скорости кровотока до 10 мл/100 г в мин и ниже вызывает каскад биохимических реакций, приводящий к формированию инфаркта мозга. Так называемое «ядро» инсульта формируется через 3–6 ч после прекращения кровотока в мозговой артерии. «Доформирование» зоны повреждения продолжается 48–72 ч, а иногда и дольше. Лечение должно быть начато в течение 6 ч после проявления первых признаков заболевания – в период «терапевтического окна», пока возможно сохранение жизнеспособности нейронов в зоне ишемического повреждения – пенумбре. Однако на практике этого, как правило, не происходит. Первые часы после ишемического инсульта уходят на доставку больного в стационар, обследование, постановку диагноза и т. д. В связи с этим необходимо разрабатывать новые подходы к терапии ишемического инсульта, применение которых было бы отсрочено по времени хотя бы на несколько суток.

Клеточная терапия с помощью мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) – один из перспективных методов лечения ишемического инсульта. ММСК – мультипотентные клетки, способные дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном, адипоцитарном, миоцитарном, кардиомиоцитарном, а также в нейрональном и глиальном направлениях [1–4]. Разработаны и апробированы методики выделения ММСК из костного мозга (КМ) человека и животных, их дальнейшего культивирования и наращивания *in vitro* до необходимого количества с сохранением свойств. Это позволяет использовать для клеточной терапии аутогенный материал и, тем самым, избежать проблем с иммунной совместимостью трансплантата и реципиента. Кроме того,

The possibility and efficacy of intravenous transplantation of mesenchymal stem cells after ischemic stroke in rats were studied. This therapeutic method has been shown to activate the proliferation of endogenous neuronal stem cells in the subependymal area of the brain lateral ventricles and angiogenesis in the nearby area, promote the neuron vitality within the same area, decrease the extent of brain tissue damaged and hasten recovery of the cognitive functions in animals.

**Key words:** multipotent mesenchymal stem cells, ischemic stroke/cerebral infarction, neurons.

ММСК влияют на течение воспалительной реакции в зоне тканевого повреждения [5] и активируют ангиогенез в пограничной с повреждением зоне [6, 7].

Цель данной работы – охарактеризовать распределение эндогенных ММСК в мозге после ишемического инсульта, дать морфологическую и поведенческую оценку воздействия ММСК на животного и сравнить эффективность введения ММСК на разных сроках после инсульта.

### Материал и методы

Эксперименты проведены на 3–4-х месячных крысах–самцах (n = 182) инбредной линии Вистар–Киото массой 150–170 г.

**Выделение ММСК.** Суспензию КМ выделяли из диафизов бедренных костей животных сразу после декапитации, промывая их средой культивирования  $\alpha$ MEM (Hyclone, Новая Зеландия) с 20% сыворотки крови эмбрионов коров (Gibco, США) и 100 мкг/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco, США). КМ высевали на пластиковые чашки Петри (Sarstedt, Германия) и, отмыв через 48 ч после эксплантации от форменных элементов крови с помощью раствора PBS (20 мМ фосфатный буфер, pH 7,4; 0,1 М NaCl), культивировали ММСК в монослое при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 6–7 сут. Для пересева культуры ММСК использовали раствор трипсина и ЭДТА (Hyclone, Новая Зеландия). Замену питательной среды проводили каждые трое суток.

**Фенотипирование ММСК** крыс проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACScan (Beckton Dickinson, США). ММСК окрашивали антителами против негативного маркера CD45 (Beckton Dickinson, США) и антителами против позитивных маркеров CD90, CD106, CD44 (Beckton Dickinson, США). Для этого клетки снимали с чашек раствором трипсина и ЭДТА, дважды промывали раствором PBS, на 1 ч переносили в раствор моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромом,

в разведении 1:20. Затем клетки дважды промывали раствором PBS и оценивали интенсивность свечения. Фенотипирование проводили после первого, второго и третьего пересева культуры.

Для более полной характеристики полученных клеток их подвергали направленной дифференцировке *in vitro* в так называемых ортодоксальных (остеогенном, хондрогенном и адипоцитарном) и в нейрональном направлениях по описанным ранее протоколам [5, 6].

**Окрашивание ММСК флуорохромом РКН-26** проводили после третьего пересева культуры. Для этого клетки снимали с чашек раствором трипсина и ЭДТА, дважды промывали раствором PBS, на 4 мин помещали в раствор РКН-26 (из расчета 33 мкл на 10 млн клеток), блокировали дальнейшее окрашивание сывороткой крови эмбрионов коров (Gibco, США). Окрашенные клетки суспендировали в питательной среде без сыворотки ( $\alpha$ MEM + 100 мкг/мл пенициллина/стрептомицина) с финальной концентрацией  $5 \times 10^6$  клеток в 100 мкл. Эффективность окрашивания ММСК оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа (Leica, Германия).

**Экспериментальный ишемический инсульту** подопытных животных был смоделирован посредством окклюзии средней мозговой артерии (СМАо) [8]. Крыс наркотизировали кетаминном (125 мг/кг) интраперитонеально. Во время операции и до выхода из наркоза температуру тела животных поддерживали на уровне 37°C. С левой стороны черепа от латерального края глазницы до ушной раковины разрезали кожу, обнажая овальное отверстие (foramen ovale) тройничного нерва. С помощью бормашины под контролем операционного микроскопа это отверстие расширяли до размеров примерно 4×4 мм. Вскрывали твердую мозговую оболочку. С помощью микроманипулятора выделяли среднюю мозговую артерию и производили ее электрокоагуляцию на протяжении 2–3 мм. Операционную рану послойно ушивали.

Группы экспериментальных животных и проведенные на них исследования представлены в табл. 1.

В течение 6 недель после СМАо по 15 животных из групп № 1, 2 и 4 проходили **поведенческое тестирование в водном лабиринте Морриса**. Оценивали время, за которое животное было способно находить скрытую под водой платформу, основываясь на внешних ориентирах. Для водного теста использовали бассейн с жесткими пластиковыми стенками диаметром 145 см и глубиной 50 см. Тестирование начинали через 2 и 5 нед после СМАо, каждая сессия длилась одну неделю.

**Декапитация** в группах № 2 и 3 была проведена через 1, 2, 3, 5 суток и через 1, 2, 4 и 6 нед. после СМАо; в группе № 4 – через 1, 2, 4 и 6 нед.; в группе № 1 – только через 6 нед. На всех сроках декапитации, *кроме 6 нед.*, по 6 животных из каждой группы подвергали **прижизненной фиксации** – перфузии через левый желудочек сердца 4% раствором параформальдегида в PBS. Затем у них непосредственно после декапитации извлекали головной мозг и вырезали сегмент, включающий видимую зону повреждения и интактные краевые зоны. Вырезанный блок разрезали пополам по зоне повреждения: половину блока фиксировали по стандартной методике в параформальдегиде, другую половину – криофиксировали. Перед криофиксацией образцы мозга помещали в раствор криопротектора – сахарозы на 1 сут. Затем кусочки ткани охлаждали в парах азота в течение 10 с, погружали в жидкий азот на 1 ч и помещали в холодильную камеру с температурой –70°C.

В связи с проведением **морфометрического анализа** через 6 недель фиксировали по 10 животных из каждой группы. Непосредственно после декапитации извлекали головной мозг и вырезали сегмент, включающий видимую зону повреждения и интактные краевые зоны. В данном случае выделенный сегмент головного мозга не делили на 2 части, а поступали следующим образом: у 6 животных его фиксировали по стандартной методике в параформальдегиде, а у 4 – криофиксировали.

Структуры мозга идентифицировали по атласу [9].

**Детекцию флуоресцентно меченных ММСК** в головном мозге проводили с помощью флуоресцентного микроскопа (Leica, Германия) на гистологических срезах толщиной 7 мкм (криофиксация), изготовленных на криостатном микротоме Leica (Leica, Германия).

**Объем повреждения** головного мозга определяли следующим образом. Из блоков ткани мозга после парафиновой фиксации 6 животных из каждой группы, декапитированных через 6 нед. после СМАо, изготавливали серийные срезы толщиной 7 мкм. Площади ипсилатерального ( $S_{\text{ипс}}$ ) и контралатерального ( $S_{\text{контр}}$ ) полушарий с помощью программы PhotoM определяли на каждом 15–м срезе. Объем повреждения ткани мозга ( $V_{\text{повр}}$ ) рассчитывали по формуле:

$$V_{\text{повр}} = \sum_n (S_{\text{контр}} - S_{\text{ипс}}) \times L,$$

где  $\sum_n$  – сумма площадей повреждения мозговой ткани на  $n$  срезах;  $L$  – толщина 15 срезов, которая равна 105 мкм.

Полученные количественные данные были обработаны с помощью программы Statistica (Stat Soft Inc).

Таблица 1. Группы экспериментальных животных

№	Группа	Экспериментальное воздействие	Морфологический анализ	Иммуногистохимическое исследование	Морфометрический анализ	Динамика постинсультных процессов в мозге на сроках		Поведенческое тестирование
						1, 2, 3, 5 дней	1, 2, 4, 6 недель	
1	ЛО	Все операционные процедуры, кроме СМАо	+	–	–			+
2	Контроль	СМАо	+	+	+	+	+	+
3	Клеточная терапия	Трансплантация ММСК в день СМАо	+	+	+	+	+	+
4	Клеточная терапия	Трансплантация ММСК через 3 суток после СМАо	+	+	+		+	+

Иммуногистохимический анализ проводили для изучения процесса пролиферации клеток в субэпендимной зоне боковых желудочков головного мозга; развития глиоза в зоне повреждения мозговой ткани; жизнеспособности нейронов в пограничной с повреждением области; активации ангиогенеза в ткани мозга. Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием первичных антител к Ki67 (ядерный маркер пролиферации), GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок – маркерный белок астроцитов клеток), NeuN (маркерный белок ядер нейронов), vWF (фактор фон Виллебранда, выявляющийся в эндотелиальных клетках).

Для проведения реакции срезы головного мозга депарфинизировали в трех порциях орто-ксилола, затем регидратировали в спиртах понижающейся концентрации по стандартной методике. Промывали в дистиллированной воде и переносили в 3% перекись водорода для блокировки эндогенной пероксидазы. Срезы промывали в PBS и наносили на них первичные антитела. После инкубации во влажных камерах двукратно промывали в PBS. Дальнейшую обработку производили при помощи наборов LSAB2/HRP-rat (Dako, Дания) или Envision+ System-HRP (Dako, Дания). При использовании набора LSAB2/HRP-rat после инкубации с вторичными антителами из набора и двукратной промывки PBS наносили конъюгат стрептавидина и пероксидазы из того же набора. Инкубировали во влажных камерах при комнатной температуре. При использовании Envision+ после инкубации с первичными антителами и двукратной промывки PBS наносили раствор из набора. Инкубировали во влажных камерах при комнатной температуре.

Затем (при использовании любого набора) после двукратной промывки наносили рабочий раствор хромогена DAB (из набора DAB+, Dako, Дания). Образование окрашенного продукта реакции контролировали под микроскопом. Препараты докрашивали астровым синим, толуидиновым синим или гематоксилином, дегидратацию и заключение в пермант проводили по стандартной методике.

При проведении реакции с антителами к Ki67 и vWF перед нанесением первичных антител проводили процедуру теплового демаскирования антигена. Для этого срезы помещали в раствор для демаскирования антигенов (Dako, Дания) и инкубировали на водяной бане при температуре +95°C в течение 20 мин. Затем срезы промывали PBS и проводили все вышеописанные процедуры. При проведении реакции с антителами к GFAP перед инкубацией с первичными антителами дополнительно проводили блокировку неспецифического окрашивания в 12% сыворотке крови свиней (Dako, Дания) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем проводили все вышеописанные процедуры. Для каждого антитела проводили положительный и отрицательный контроль окрашивания (табл. 2).

Количество сосудов подсчитывали на препаратах, окрашенных по методу vWF, в левом полушарии в неокортексе (первичная соматосенсорная кора) и головке хвостатого ядра по границе повреждения ткани в пределах 30 мкм под микроскопом Leica (Leica, Германия) через 6 нед. после СМАо. В правом полушарии сосуды были подсчитаны в симметричной области. Полученные количественные данные были обработаны с помощью программы Statistica (Stat Soft Inc).

### Результаты

Анализ культуры ММСК методом проточной цитофлуориметрии показал, что она состояла из CD 45<sup>+</sup>-клеток (клеток гемопоэтического ряда) – 3% и CD90<sup>+</sup>-клеток (собственно ММСК) – 97%, среди которых было 15% CD 106<sup>+</sup> – клеток (рис. 1). Полученные клетки были способны дифференцироваться в остеогенном, адипоцитарном, хондрогенном направлениях и в направлении нейронального ряда. В наших экспериментах в нейрональном направлении дифференцировалось около 70% ММСК [6].

Трансплантация ММСК животным после СМАо повысила уровень выживаемости (табл. 3) примерно в 1,7 раза.

Таблица 2. Условия проведения иммуногистохимических реакций

Антитело	Производитель	Разведение	Проведение теплового демаскирования	Проведение блокировки неспецифического окрашивания	Условия инкубации с первичными антителами	Условия инкубации со вторичными антителами	Условия инкубации с конъюгатом стрептавидина и пероксидазы	Условия инкубации с Envision+	Положительный контроль	Отрицательный контроль
Ki67	BD Pharmingen	1:100	Да	Нет	18 ч, +4°C	20 мин, комнатная t	30 мин, комнатная t	–	Тонкий кишечник крысы	Миокард крысы
GFAP	Dako, Дания	Готовые к использованию, не разведенные	Нет	Да	18 ч, +4°C	30 мин, комнатная t	30 мин, комнатная t	–	Мозжечок крысы	Миокард крысы
NeuN	Chemicon	1:300	Нет	Нет	18 ч, +4°C	30 мин, комнатная t	30 мин, комнатная t	–	Спинальный мозг крысы	Миокард крысы
vWF	Dako, Дания	1:50	Да	Нет	30 мин, комнатная t	–	–	30 мин, комнатная t	–	–

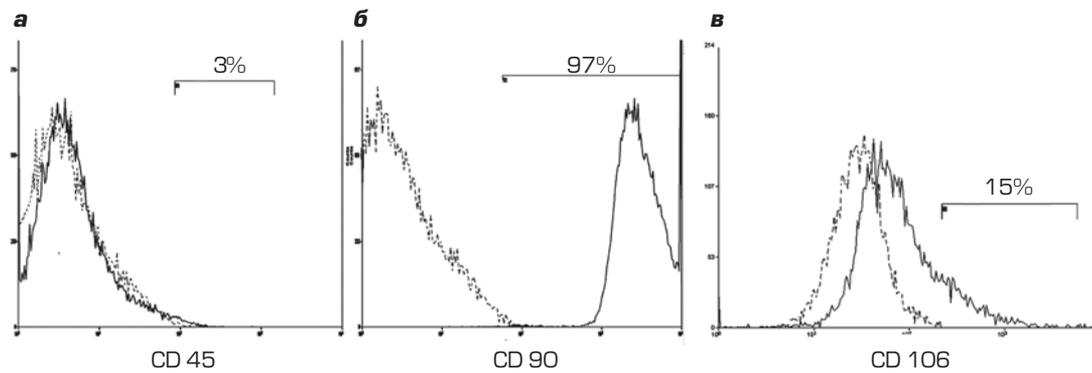


Рис. 1. Распределение интенсивности свечения клеток, выделенных из костного мозга крыс, меченных антителами против негативного (CD45, а) и позитивных (CD90, б; CD106, в) маркеров ММСК, полученное методом проточной цитометрии на 2-м пассаже после выделения. По горизонтали – интенсивность свечения клеток, экспрессирующих CD90 (а) или CD45 (б), окрашенных антителами, конъюгированными с PE и FITC соответственно; по вертикали – число клеток. Пик 1 – неокрашенные клетки (контроль), пик 2 – окрашенные клетки: а – 3 % клеток экспрессируют CD45 и относятся к гемопоэтическому ряду; б – 97 % клеток популяции экспрессируют CD90 и являются ММСК; в – 15% клеток популяции экспрессируют CD106; пунктирная линия – неокрашенные клетки

Таблица 3. Количество погибших в ходе исследования животных в разных группах

Группа	Количество животных	Погибло в течение 6 недель СМАо	Общая смертность, %	Количество животных, включенных в обработку
Ложнооперированные	10	0	0	10
Контроль	20	10	50	10
Группа клеточной терапии	15	5	30	10

**Поведенческое тестирование.** Результаты тестирования в водном лабиринте Морриса представлены на рис. 2 а, б. Видно, что когнитивная функция восстанавливалась практически до исходного уровня через 2 нед. после СМАо при условии, что была проведена трансплантация ММСК (группа № 3). При этом у контрольных животных (группа № 2) в течение всего периода наблюдения (6 нед.) поведенческий статус не восстановился.

**Распределение ММСК в головном мозге.** Исследования криосрезов мозга животных из групп клеточной терапии с помощью флуоресцентного микроскопа показало, что меченые ММСК, трансплантированные внутривенно в день СМАо (группа № 3), появлялись в мозге на 3 сут. Они распределялись вокруг сосудов в обоих полушариях. В контралатеральном полушарии были выявлены единичные меченые клетки, в ипсилатеральном – практически вокруг всех сосудов. Такое распределение ММСК сохранялось в течение 6 нед. (рис. 3 а, б). При внутривенной трансплантации через 3 сут. (группа № 4) меченые ММСК были выявлены в мозге также через 3 сут после введения. Единичные ММСК находили в субependимной зоне боковых желудочков и только у нескольких животных – в хвостатом ядре. Через 6 нед. мы видели меченые клетки только вокруг желудочков мозга (рис. 3 в, г).

**Морфологический анализ мозга.** Динамику постинсультных процессов в мозге через 1, 2, 3, 5 сут после СМАо изучали только у контрольных животных (группа № 2) и животных, которым ММСК были введены в день СМАо (группа № 3). На 1-е, 2-е и 3-и сут. после СМАо в головном мозге животных всех групп формировался некротический очаг. В пограничной с повреждением области вокруг сосудов появились скопления клеточных элементов – периваскулярные муфты, состоящие из лимфоцитов, плазматических клеток и иногда эозинофилов. В группе № 3, по сравнению с контролем, периваскулярные муфты были больше по объему, клетки в них расположены в несколько рядов.

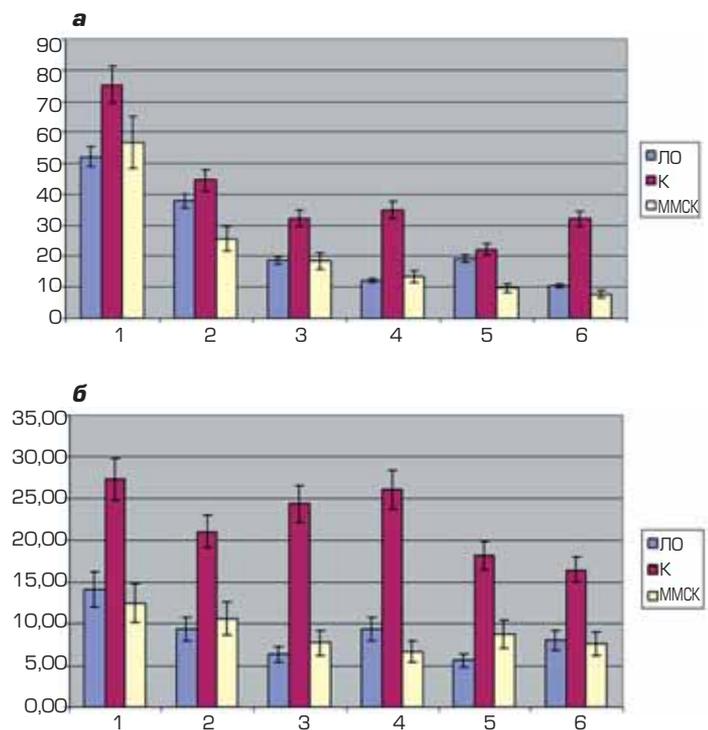


Рис. 2. Результаты поведенческого тестирования животных в водном лабиринте Морриса через 2 (а) и 5 (б) недель после СМАо:

ЛО – ложнооперированные животные; К – группа 2 (без введения ММСК);

ММСК – группа 3 (введение МСК в день СМАо).

По горизонтальной оси отмечены дни тестирования, по вертикальной – время, затраченное на поиск скрытой платформы

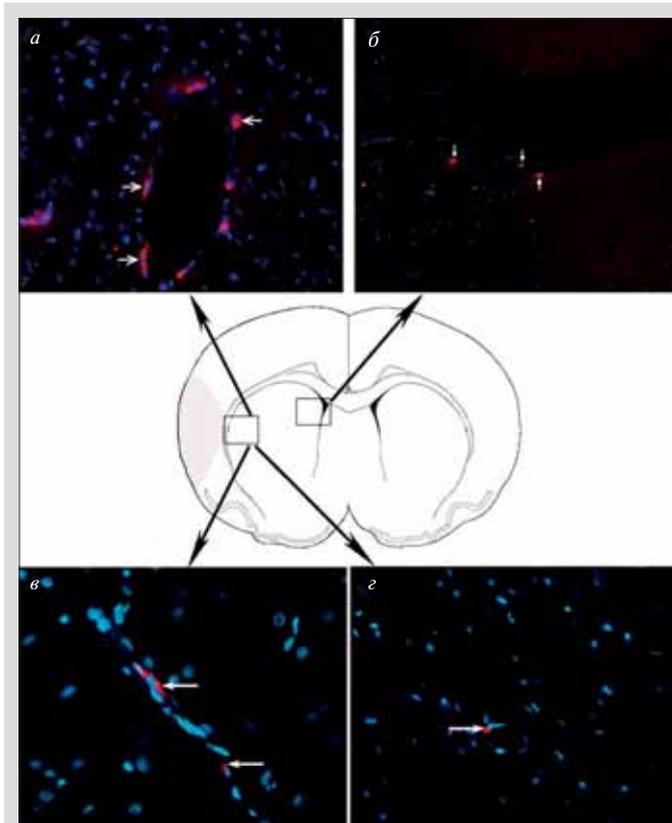


Рис. 3. Распределение флуоресцентно меченных ММСК (стрелки) в поврежденном головном мозге животных через 6 недель после СМАо, криосрезы, окраска ДНК DAPI: а – флуоресцентно меченные ММСК вблизи сосуда в хвостатом ядре поврежденного полушария через 3 суток после СМАо; группа 3. Об. 40х; б – флуоресцентно меченные ММСК в боковом желудочке поврежденного полушария через 6 недель после СМАо; группа 3. Об. 20х; в, г – флуоресцентно меченные ММСК вблизи сосуда в хвостатом ядре поврежденного полушария через 6 недель после СМАо; группа 2. Об. 40х

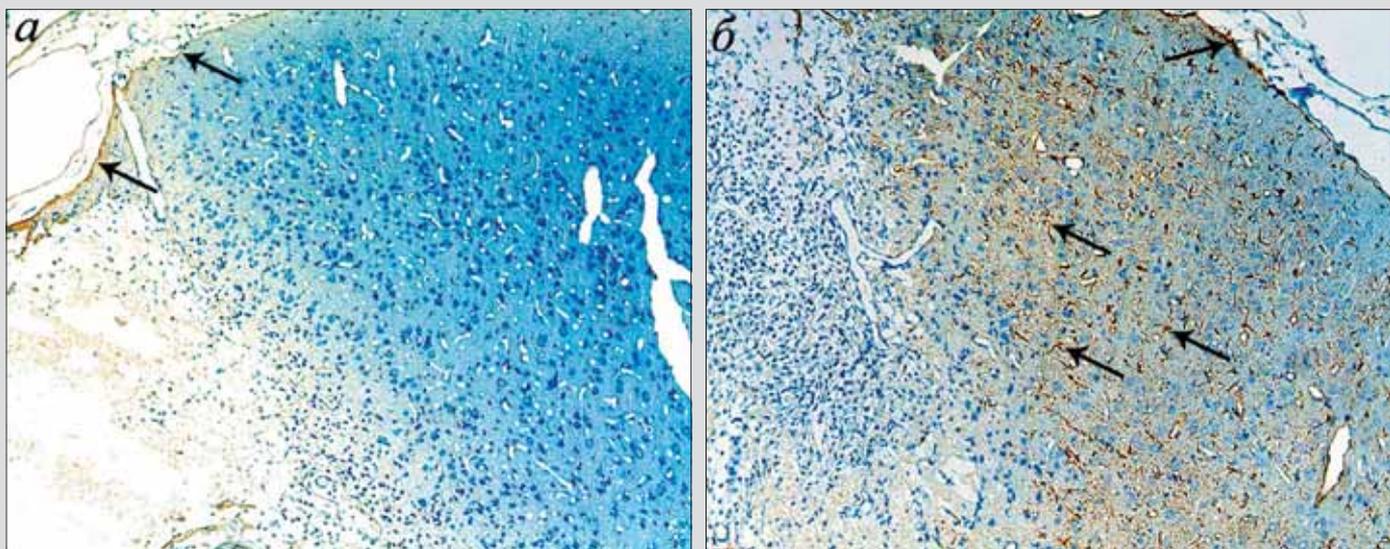


Рис. 4. Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга крысы через 5 суток после СМАо антителами против маркерного белка реактивной астроглии GFAP: а – группа 2 (контроль); б – группа 3 (введение ММСК в день СМАо) Продукт реакции – коричневого цвета, обозначен стрелками. Докраска препаратов по Ниссли. Об. 10х

Через 5 сут. после СМАо у контрольных животных на границе некротического очага был выявлен хорошо выраженный лейкоцитарный вал. Распада ткани в центре поврежденной еще не наблюдали. В группе № 3 процесс распада и очищения ткани мозга от поврежденных фрагментов проходил заметно быстрее, чем в контроле. В неповрежденной области мозга наблюдали активацию астроцитов (рис. 4 б).

На сроке 1 нед после СМАо мы включили в исследование животных, которым ММСК были введены через 3 сут. после СМАо (группа № 4). Через 1 нед. у животных из группы № 2 в очаге некроза выявили большое количество макрофагов и распадающиеся клетки. Активированных астроцитов в пенумбре еще нет (рис. 4 а). Особого рассмотрения требует состояние клеток субэпендимной зоны бокового желудочка ипсилатерального полушария. С помощью иммуногистохимической реакции с антителами к белку Ki67, выявляющей пролиферирующие клетки, в субэпендимной зоне желудочков были обнаружены редкие иммунопозитивные клетки (рис. 5 а).

Морфологическая картина постинсультных процессов в ткани мозга в группах клеточной терапии № 3 и № 4 через 1, 2, 4 и 6 нед. после СМАо практически одинакова. Через 1 нед. в субэпендимной зоне наблюдали митотически делящиеся клетки. Иммуногистохимическое окрашивание тканей мозга антителами к Ki67 показало, что при инсультах в данной области появлялась группа пролиферирующих клеток (рис. 5 б, в). Через 2 нед. в контрольной группе выявлена четкая демаркационная линия между тканевым дефектом и неповрежденной тканью. В пенумбре наблюдали клеточную инфильтрацию и гибнувшие нейроны. Очищение ткани мозга от поврежденных фрагментов еще продолжается. У животных из групп № 3 и № 4 между поврежденной и неповрежденной тканью наблюдали рубец, состоящий из 1–3 рядов глиальных клеток, расположенный между тканевым дефектом и пограничной зоной. Процесс очищения тканей мозга от погибших клеток уже полностью завершен. Через 4 нед. в ипсилатеральном полушарии контрольных животных наблюдали расширение желудочка. Большая часть неокортекса отсутствовала – на данном участке сформировалась ликворная киста.

Глиальный рубец между поврежденной и неповрежденной тканью имеет четко выраженную структуру. У животных из групп № 3 и № 4 в пределах неокортекса граница между поврежденной и неповрежденной тканью выражена четко, рубец структурирован. Большая часть нейронов в сохранившейся коре мозга не повреждена. При обширных дефектах ткани мозга (большая часть коры полушария, хвостатого ядра и наружная капсула) у животных, как и в контрольной группе, развивалось постинсультное осложнение – расширение желудочков. Через 6 нед. у животных с первоначально обширным инсультом выявлены значительные повреждения ткани мозга, коснувшиеся первичной и вторичной соматосенсорной, пириформной и инсулярной коры. На месте дефекта сформировалась ликворная киста с эпендимной выстилкой, полость которой очень обширна (рис. 6 а). Большинство нейронов в пограничной зоне повреждено: при окраске тионином по Нисслю ядро и цитоплазма не определялись,

иммуногистохимическая реакция на NeN не давала характерного для ядер нейронов продукта окрашивания (рис. 7 а). Иммуногистохимическая реакция на GFAP выявила мощный глиоз в пенумбре, неокортексе и, частично, в хвостатом ядре (рис. 8 а). В мозге опытных животных из группы № 3 не наблюдали единой большой полости на месте дефекта ткани. Вместо нее были выявлены мелкие полости разной величины, перемежавшиеся с клеточными островками, состоящими из капилляров (рис. 6 б). В группе № 4 была выявлена киста в виде единой полости (рис. 6 в). Большинство нейронов в пограничной с зоне не повреждены (рис. 7 б, в). Иммуногистохимическое окрашивание ткани мозга антителами к GFAP показало, что астроциты в наружной капсуле активизировались и формировали капсулу, которая, по всей видимости, препятствовала расширению желудочков и распространению гибели нервной ткани и не деформировала мозг (рис. 8 б, в).

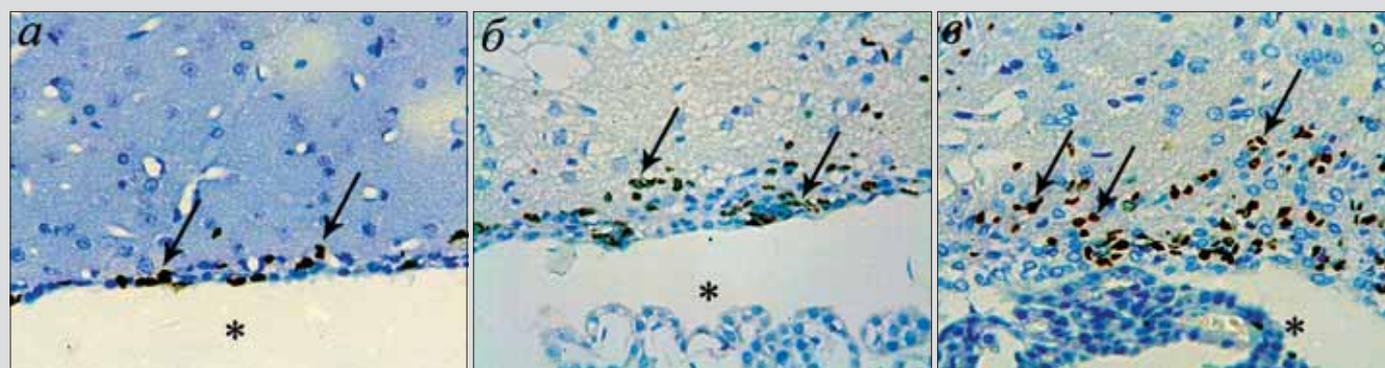


Рис. 5. Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга крысы через 1 неделю после СМАо антителами против маркерного белка делящихся клеток Ki67:

а – группа 2 (контроль);

б – группа 3 (введение МСК в день СМАо)

в – группа 4 (введение МСК через трое суток после СМАо).

Продукт реакции – коричневого цвета, отмечен стрелками; звездочкой отмечена полость бокового желудочка.

Докраска препаратов по Нисслю. Об. 10х

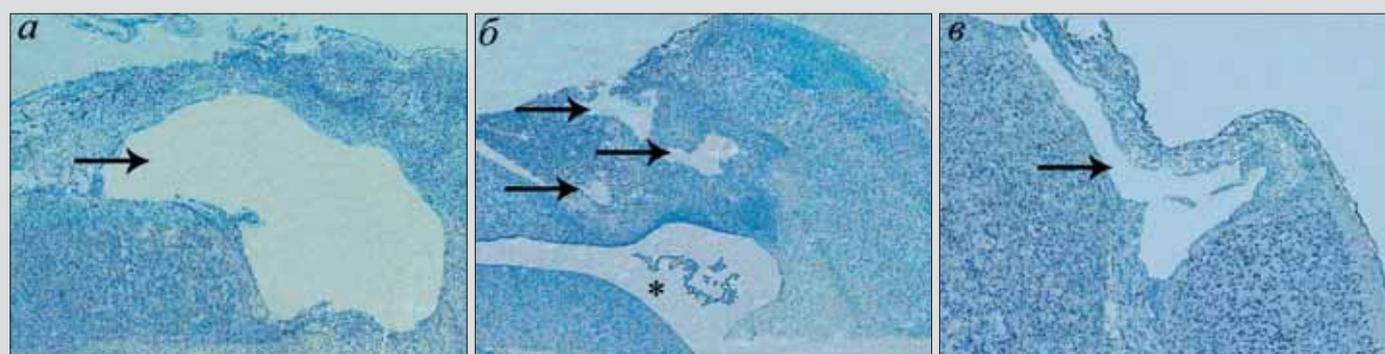


Рис. 6. Структура области ишемического повреждения головного мозга крысы через 6 недель после СМАо: ликворно-глиальные кисты (обозначены стрелками):

а – группа 2 (контроль);

б – группа 3 (введение МСК в день СМАо);

в – группа 4 (введение МСК через трое суток после СМАо).

Звездочкой обозначена полость бокового желудочка. Об. 10х

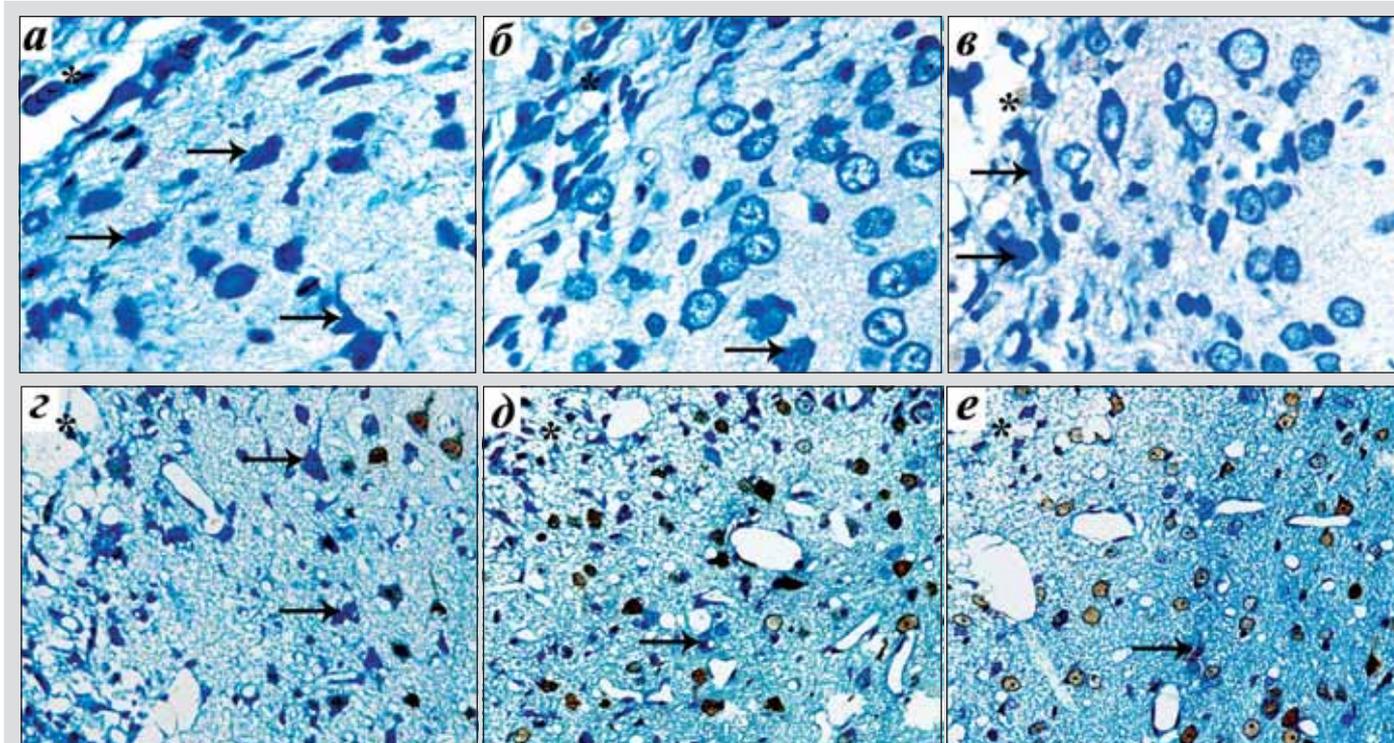


Рис. 7. Структура области ишемического повреждения головного мозга крысы через 6 недель после СМАо: пенумбра в группе 2 (а, г), группе 3 (б, д) и группе 4 (в, е); а, б, в – окраска по Ниссля. Об. 100х; г, д, е – иммуногистохимическое окрашивание антителами против маркерного белка нейронов NeuN. Коричневый цвет – продукт реакции. Стрелками отмечены поврежденные нейроны. Докраска по Ниссля. Об. 20х

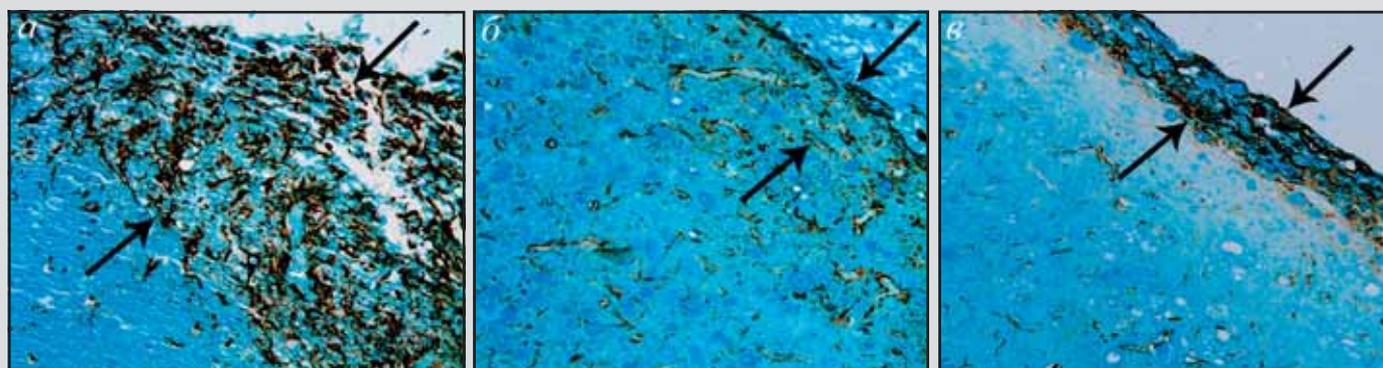


Рис. 8. Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга крысы через 6 недель после СМАо антителами против маркерного белка реактивной астроглии ГФКБ. Продукт реакции – коричневого цвета, отмечен стрелками. Докраска астровым синим. Об. 20х

**Морфометрический анализ.** Количество сосудов у животных из групп № 2, 3 и 4 представлено на рис. 9. Объем повреждения ткани мозга у животных из групп № 2, 3, 4 представлен на рис. 10.

#### Обсуждение

В качестве материала для клеточной терапии ММСК очень перспективны, т. к. для каждого пациента могут быть выделены аутогенные клетки с заданной чистотой популяции, имеющие четко охарактеризованные жизнеспособность, фенотип и дифференцировочный потенциал.

Так, именно по фенотипу: CD 45<sup>-</sup>, CD 90<sup>+</sup>, CD 106<sup>+</sup> и по способности дифференцироваться *in vitro* в остеогенном,

хондрогенном, адипоцитарном и нейрональном направлениях мы делаем вывод, что работаем именно с ММСК. При этом чистота клеточного материала не менее 97% МСК, а жизнеспособность самих клеток (определенная посредством окраски *in vitro* трипановым синим) не ниже 95%.

Внутривенное введение выбрано как наиболее щадящий способ трансплантации ММСК. К настоящему времени показано, что ММСК, как клетки с высоким уровнем экспрессии CXCR4 – рецептора к SDF-1 (stromal cell derived factor), обладают тропностью к зонам тканевого повреждения, где повышается содержание SDF-1 [10]. В настоящей работе ММСК, введенные в хвостовую вену в день СМАо или через 3 сут. после СМАо, были выявлены в мозге на 3 сут. после

трансплантации. Как известно СМАо нарушает целостность гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Казалось бы, с током крови ММСК, трансплантированные в день СМАо, должны попасть в мозг непосредственно после введения. Но этого не происходит ни в 1-е, ни во 2-е сут. после трансплантации. В своих предыдущих работах [5] мы показали, что и при инфаркте миокарда ММСК, введенные в вену в день операции, появлялись в тканях сердца в единичном количестве на 2-е сут., а массово – на 3-и. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что ММСК не просто пассивно разносятся по организму током крови, а осуществляют направленную миграцию в области тканевого воспаления. К сожалению, в настоящее время этот вопрос до конца не изучен. Разницу в количестве меченых клеток и их распределении в ткани мозга у животных группы № 3 и группы № 4 мы объясняем тем, что ММСК, введенные в день СМАо, успевают пройти в головной мозг до восстановления целостности ГЭБ, а через 4–6 сут. после СМАо (когда в организме происходит миграция ММСК, трансплантированных внутривенно через 3 сут. после СМАо) его целостность практически восстановлена [11]. Мы не располагаем данными о том, что ММСК могут проходить ГЭБ.

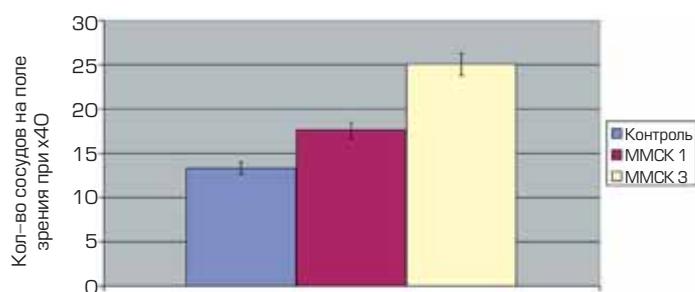


Рис. 9. Количество сосудов в пограничной с повреждением зоне через 6 недель после СМАо: контроль – группа 2 (без введения ММСК); ММСК 1 – группа 3 (введение ММСК в день СМАо); ММСК 3 – группа 4 (введение ММСК через трое суток после СМАо)

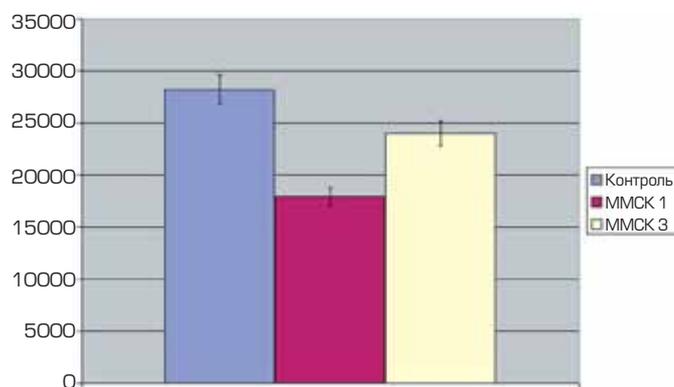


Рис. 10. Объем дефекта головного мозга через 6 недель после СМАо. контроль – группа 2 (без введения ММСК); ММСК 1 – группа 3 (введение ММСК в день СМАо); ММСК 3 – группа 4 (введение ММСК через трое суток после СМАо)

Однако, несмотря на такую значительную разницу в распределении ММСК, результаты морфологического анализа ткани мозга после СМАо у животных из групп № 3 и 4 практически одинаковы. Трансплантация ММСК в день СМАо привела к более раннему формированию глиального рубца между поврежденной и неповрежденной тканью мозга (на 5-е сут. в группе клеточной терапии и 7-е сут. – в группе контроля). Известно, что глиальный рубец препятствует прорастанию аксонов. Кроме того, его формирование способствует стабилизации ткани мозга после инсульта: митотически делящиеся астроциты окружают поврежденную зону и новообразованные сосуды, способствуя восстановлению ГЭБ, предупреждая сильную воспалительную реакцию, начало аутоиммунной реакции и ограничивая клеточную дегенерацию [12]. Через 6 нед. после СМАо в группах клеточной терапии сформировался глиальный рубец, площадь которого была существенно меньше, чем в контроле. В контрольной группе мощный глиоз затрагивал пенумбру, неокортекс и хвостатое ядро. В группах клеточной терапии глиоз не деформировал ткань и локализовался преимущественно в пограничной с повреждением зоне.

Через 1 нед. у животных из групп № 2, 3, и 4 была выявлена пролиферация клеток в субэпендимной зоне желудочков головного мозга. Однако после трансплантации ММСК мы обнаружили значительное количество делящихся клеток, особенно в группе № 4, а у животных контрольной группы – единичные пролиферирующие клетки. Ранее было показано, что СМАо вызывает деление клеток субэпендимной зоны желудочков мозга у крыс [13–15]. Более того, была показана возможность миграции вновь образованных клеток из эпендимной зоны к области повреждения. Эти клетки окрашивались антителами против нейрональных маркеров, что свидетельствовало об их дифференцировке в нейрональном направлении. Вероятно, данный процесс можно расценивать как ограниченную репарацию нервной ткани.

Трансплантация ММСК как в день СМАо, так и через 3 сут. после инсульта значительно ускорила течение воспалительной реакции: в группах клеточной терапии воспаление закончилось через 2 нед, в контрольной через 4 нед. Как показано ранее, ММСК *in vitro* способны секретировать набор факторов, стимулирующих (IL-1, TNF – tumor necrosis factor), регулирующих (IL-11) и ингибирующих (bTGF – transforming growth factor) воспалительные процессы [16, 17]. Мы предполагаем, что и *in vivo* ММСК принимают участие в регуляции процессов воспаления посредством выделения вышеназванных агентов (паракринная функция).

В обеих группах клеточной терапии зафиксирована активация ангиогенеза в пенумбре. Количество сосудов в анализируемой области головного мозга в группе № 3 было больше в 1,4 раза, а в группе № 4 в 1,8 раза по сравнению с контролем. Активация ангиогенеза способствует восстановлению микроциркуляции, а следовательно, и метаболизма в ишемизированной ткани мозга до физиологического уровня. Вероятно, это одна из причин сохранения жизнеспособности нейронов в пограничной с повреждением зоне.

Кроме того, мы предполагаем, что трансплантированные ММСК (независимо от времени трансплантации) оказывали нейропротекторное действие на нервную ткань. Мы полагаем, что и в этом случае реализуется паракринная функция ММСК. Показано, что после добавления в клеточную культуру экстракта тканей поврежденного мозга ММСК продуцировали такие факторы, как VEGF (vascular endothelial growth factor), BDNF (brain – derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor) и bFGF (basic fibroblast growth factor) [18, 19], которые предотвращают апоптоз клеток в ткани, пограничной с областью некроза и активируют ангиогенез [7, 20]. Действительно, в группах клеточной терапии практически

все нейроны в пограничной с повреждением зоне не имели морфологических изменений, тогда как в контрольной группе мы выявляли только поврежденные или погибшие нервные клетки. Окраска ядер этих клеток антителами NeuN показала, что в группах клеточной терапии жизнеспособные нейроны находились непосредственно рядом с границей повреждения.

Мы предполагаем, что вследствие активации ангиогенеза и сохранения жизнеспособности нейронов в пограничной с повреждением зоне внутривенная трансплантация ММСК независимо от сроков введения способствовала уменьшению объема повреждения мозга: в группе № 3 в 1,6 раза, а в группе № 4 в 1,3 раза по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Положительный эффект клеточной терапии был выявлен не только на морфологическом уровне в мозге, но и при проведении поведенческого тестирования животных в водном лабиринте Морриса. Животные контрольной группы затрачивали в несколько раз больше времени на поиск платформы как во время первого испытания, начатого через 2 нед после СМАО, так и во время второго испытания, начатого через 5 нед после СМАО по сравнению с ложнооперированными животными и крысами из группы клеточной терапии № 4. Животные из группы клеточной терапии уже к 5-му дню первой сессии обучения вырабатывали оптимальную стратегию поиска платформы – время выходит на плато – и успешно использовали ее после двухнедельного перерыва. Эти животные затрачивали столько же времени на поиск платформы, сколько и ложнооперированные. Животные же контрольной группы практически не достигали критерия обученности за 6 нед. Тест в водном лабиринте Морриса свидетельствует о том, что ишемический инсульт у крыс приводит к существенному нарушению когнитивных функций у животных: они не утрачивают способность к обучению, но за 6 нед. не могут выработать оптимальную тактику поведения во

время тестирования. Применение клеточной терапии позволило восстановить обучаемость, краткосрочную и долговременную память животных до уровня ложнооперированных крыс уже к концу 3 нед. после СМАО.

Все изложенные данные свидетельствуют, что в наших экспериментах клеточная терапия ишемического инсульта у крыс с помощью ММСК дает положительные результаты.

1. На 17% повышается постоперационная выживаемость животных.

2. Трансплантация ММСК значительно стимулировала ангиогенез в ткани, пограничной с повреждением, тем самым, способствуя восстановлению метаболизма в ишемизированной области мозга.

3. Введение ММСК имело ярко выраженное нейропротекторное воздействие – сохранение жизнеспособности нейронов по всему объему пограничной зоны. На достижение подобного терапевтического эффекта направлены все нейропротекторные лекарственные препараты, применяющиеся в настоящее время при лечении инсульта.

4. Уменьшается объем тканевого дефекта мозговой ткани и целые мозговые структуры, например хвостатое ядро, сохраняют свое морфологическое строение.

5. Внутривенная трансплантация ММСК привела к сохранению когнитивных функций животных на нормальном физиологическом уровне.

6. На наш взгляд, очень важный момент, имеющий отношение к практической медицине: внутривенная трансплантация ММСК инсультным животным может быть отсрочена на несколько дней. При этом полученный результат бывает не хуже, чем при трансплантации ММСК во время «терапевтического окна». Мы полагаем, что представленную работу можно расценивать как доклиническое исследование. На ее основе можно разработать рекомендации для проведения ограниченного клинического исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528–30.
2. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143–7.
3. Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif. Organs* 2001; 25: 187–93.
4. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J. et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 2000; 61: 364–70.
5. Кругляков П. В., Соколова И. Б., Аминева Х.К. и др. Терапия экспериментального инфаркта миокарда у крыс с помощью трансплантации сингенных мезенхимных стволовых клеток. *Цитология* 2004; 46: 1043–54.
6. Зинькова Н. Н., Гилерович Е. Г., Соколова И.Б. и др. Терапия ишемического инсульта головного мозга у крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток. *Цитология* 2007; 7: 566–75.
7. Chen J., Zhang G. Z., Li Y. et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ. Res.* 2003; 92: 692–9.
8. Brint S., Jacewicz M., Kiessling M. et al. Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1988; 8: 474–85.
9. Paxinos G., Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press; 1998.
10. Bhakta S., Hong P., Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor – 1 in

vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovasc. Resusc. Med.* 2006; 7: 19–24.

11. Гилерович Е.Г., Отеллин В.А. Трансплантация эмбриональной нервной ткани как модель изучения ранних этапов становления центральной нервной системы. *Успехи физиологич. наук* 2001; 1: 38–47.

12. Silver J., Miller J. Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews neuroscience* 2004; 5: 146–56.

13. Arvidsson A., Collin T., Kirik D. et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature medicine* 2002; 8: 963–70.

14. Darsalia V., Heldmann U., Lindvall O. et al. Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke* 2005; 36: 1790–5.

15. Thored P., Arvidsson A., Cacci E. et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem cells* 2006; 24: 739–47.

16. Majumdar M., Thiede M., Mosca J. et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell Physiol.* 1998; 176: 57–66.

17. Deans R., Moseley A. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* 2000; 28: 875–84.

18. Chen X., Li Yi, Wang L., et al. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology* 2002; 22: 275–9.

19. Li Yi., Chen J., Chen X.J. et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat. *Neurology* 2002; 59: 514–23.

20. Chen J., Li Yi, Wang L., et al. Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis. *Brain Res.* 2004; 1005: 21–28.

Поступила 06.10.2007