

## ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ДИНАМИКУ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

© Н. Н. Зинькова,<sup>1</sup> Е. Г. Гилерович,<sup>2</sup> И. Б. Соколова,<sup>2</sup> Е. В. Шведова,<sup>1</sup>  
А. А. Билибина,<sup>1</sup> П. В. Кругляков,<sup>1</sup> Д. Г. Польшцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ООО «Транс-Технологии» и

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

<sup>1</sup> электронный адрес: natalia\_z@alkorbio.ru

Исследование динамики морфологических изменений в головном мозге после ишемического инсульта — необходимый этап доклинических испытаний (если применение возможно) клеточной терапии с помощью мезенхимных стволовых клеток (МСК) при лечении этого распространенного заболевания. Эксперименты проведены на крысах инбредной линии Вистар-Киото. Ишемический инсульт был смоделирован посредством окклюзии средней мозговой артерии (СМАо). В день операции была проведена внутривенная трансплантация МСК. Предварительно МСК были выделены из костного мозга животных, культивированы и окрашены флуоресцентным красителем PKH26 *in vitro*. Животных декапитировали через 1, 2, 3 и 5 сут и через 1, 2, 4 или 6 нед после СМАо. МСК были выявлены в головном мозге на 3-и сут после введения. При этом они располагались вблизи внешней стенки мозговых сосудов как в ипсилатеральном, так и в контралатеральном полушариях. Такое распределение МСК по ткани мозга не менялось в течение 6 нед. Показано, что трансплантация МСК ускорила течение процесса воспаления в поврежденной области головного мозга и формирование глиального рубца вокруг этой зоны на 25—30 % относительно контрольной группы. Введение МСК стимулировало пролиферацию эндогенных стволовых клеток в субependимной зоне боковых желудочков. Кроме того, был выявлен нейропротекторный эффект от трансплантации МСК: в группе клеточной терапии практически все нейроны пенумбры сохраняли нормальную структуру, тогда как у контрольных животных нейроны в пограничной с повреждением зоне погибли или имели признаки повреждения.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, ишемический инсульт, глиальный рубец, пролиферация, нейроны, пенумбра.

Принятые сокращения: ГФКБ — глиальный фибриллярный кислый белок, МСК — мезенхимные стволовые клетки, СМАо — окклюзия средней мозговой артерии.

Ишемический инсульт — одно из наиболее распространенных заболеваний в экономически развитых странах. В связи с этим огромное количество экспериментальных исследований на животных посвящено всестороннему изучению этой патологии головного мозга на физиологическом, морфологическом, биохимическом и других уровнях. Одной из общепринятых экспериментальных моделей ишемического инсульта является окклюзия средней мозговой артерии (СМАо) у крыс. Она позволяет получить достаточно стандартное повреждение, которое распространяется на неокортекс и каудатопутамен (Tyson et al., 1984; Bolander et al., 1989; Magasawa, Kogure, 1989; Memezawa et al., 1992). Но в литературе практически не встречается исследований динамики морфологических изменений в головном мозге крыс после СМАо. Однако оценивать эффективность применяемых лечебных препаратов, в том числе и клеточной терапии, можно именно по их влиянию на течение воспалительных, некротических и репаративных процессов в ткани мозга после ишемического инсульта.

Клеточная терапия с применением мезенхимных стволовых клеток (МСК) — современный перспективный подход к лечению ишемического инсульта. МСК — мультипотентные стволовые клетки. Экспериментально доказано, что они ускоряют течение процессов воспаления в ишемизированных тканях (Кругляков и др., 2004), активируют ангиогенез (Zhang et al., 2002; Chen et al., 2003b, 2004) и повышают жизнеспособность клеток (Chen et al., 2003a, 2003b, 2004) в пограничных с повреждением зонах. Кроме того, МСК способны дифференцироваться в нейрональном направлении (Woodbury et al., 2000, 2002). Эти свойства МСК могут быть положены в основу репаративной и заместительной терапии при повреждениях головного мозга. К настоящему времени разработаны и апробированы методики выделения МСК из стромы костного мозга и их наращивания *in vitro* до необходимого количества. Это дает возможность трансплантировать пациентам аутологичный материал с определенным фенотипом, избегая тем самым проблем с иммунной совместимостью.

Цель данной работы в рамках доклинического исследования — проследить динамику морфологических изменений в ткани головного мозга крыс в течение 1—42 сут после СМАо и выяснить, влияет ли внутривенная трансплантация МСК на эти процессы.

### Материал и методика

Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Вистар-Киото массой 180—200 г в возрасте 4—5 мес.

Моделирование экспериментального ишемического инсульта головного мозга. Ишемический инсульт у подопытных животных был смоделирован посредством СМАо в левом полушарии. Крыс наркотизировали кетамин (125 мг/кг) интраперитонеально. Во время операции и до выхода из наркоза температуру тела животных поддерживали на уровне 37 °С. Голову животного фиксировали с помощью ушных кернов и зубного зажима в стереотаксическом аппарате. С левой стороны от латерального края глазницы до ушной раковины разрезали кожу, расширяли поверхность раны. При этом обнажали овальное отверстие (*foramen ovale*) тройничного нерва. С помощью бормашины под контролем операционного микроскопа это отверстие расширяли до размера примерно 4×4 мм. Вскрывали твердую мозговую оболочку. Тонким стальным крючком, закрепленным в микроманипуляторе, слегка приподнимали среднюю мозговую артерию. Производили ее электрокоагуляцию на протяжении 2—3 мм. Операционную рану послойно ушивали.

Выделение и культивирование МСК. Суспензию костного мозга выделяли из бедренных костей животных сразу после декапитации. В стерильных условиях удаляли эпифизы бедренных костей, а диафизы промывали средой культивирования ( $\alpha$ MEM; Nuclone, Новая Зеландия), содержащей 20 % сыворотки крови эмбрионов коров (Nuclone, Новая Зеландия) и по 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Nuclone, Новая Зеландия). Полученный смыв высеивали на пластиковые чашки Петри (Sarstedt, Германия). Через 48 ч после эксплантации костного мозга проводили двукратную процедуру отмывки МСК от форменных элементов крови с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (PBS; 20 мМ фосфатный буфер, pH 7.2, и 0.1 М NaCl). Клетки культивировали в монослое при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в течение 6—7 сут после эксплантации в вышеназванной среде культивирования. В дальнейшем культуру пересеивали каждые 7 сут с исходной плотностью  $1.27 \cdot 10^3$  кл./см<sup>2</sup>. Для посева культуры МСК крыс использовали раствор трипсина и ЭДТА (Nuclone, Новая Зеландия). Замену питательной среды проводили каждые 3 сут.

Фенотипирование МСК крыс проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США). МСК метили антителами против негативного маркера CD45 (Beckton Dickinson), после мечения антителами против поверхностных маркеров клетки снимали с чашек раствором трипсина и ЭДТА (Nuclone, Новая Зеландия), промывали 2 раза раствором PBS, затем на 1 ч переносили в раствор моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами PE и FITC. Далее клетки промывали 2 раза раствором PBS и оценивали интенсивность свечения. Фенотипирование проводили после первого, второго и третьего посевов 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.

Окрашивание МСК крыс флуорохромом PKH26 проводили после второго посева культуры. Клетки наращивали до плотного монослоя, далее в среду культивирования добавляли PKH26 (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл на 48 ч. Затем клетки промывали раствором PBS и культивировали в среде без PKH26 не менее 4 ч. Окрашенные МСК снимали с чашек раствором трипсина и ЭДТА и центрифугировали при 450 g в течение 10 мин. Полученный осадок дважды промывали PBS и суспендировали в питательной среде без сыворотки ( $\alpha$ MEM, содержащей по 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина) с финальной концентрацией клеток  $5 \cdot 10^6$  в 100 мкл. Эффективность окрашивания МСК оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica (Leica, Германия).

Группы экспериментальных животных: 1) группа контроля: у этих животных моделировали инсульт, но не проводили клеточную терапию; 2) группа клеточной терапии: животным проводили трансплантацию МСК (5 млн МСК в 100 мкл среды  $\alpha$ MEM) в хвостовую вену в день СМАо.

В обеих группах животных декапитировали через 1, 2, 3 или 5 сут и через 1, 2, 4 или 6 нед после СМАо по 6 животных на каждый срок. Непосредственно после декапитации извлекали головной мозг и вырезали сегмент, включающий в себя видимую зону повреждения и интактные краевые зоны. Головной мозг у 4 животных из 6 фиксировали по стандартной методике в параформальдегиде, а у 2 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 °С.

Детекцию флуоресцентно меченных МСК в тканях головного мозга проводили с помощью флуоресцентного микроскопа (Leica, Германия) на гистологических препаратах толщиной 7 мкм (криофиксация), изготовленных на криостатном микротоме Leica (Leica, Германия).

При гистологическом анализе поврежденные структуры мозга идентифицировали по атласу (Paxinos, Watson, 1998).

Площадь  $S$  ипсилатерального ( $S_{\text{инс.}}$ ) и контралатерального ( $S_{\text{контр.}}$ ) полушарий определяли с помощью программы PhotoM на парафиновых препаратах у животных, декапитированных через 6 нед после СМАо. При этом выбирали уровень с максимальным повреждением ткани. Мы ввели коэффициент  $C$ , который представлял собой отношение  $S_{\text{контр.}}$  к  $S_{\text{инс.}}$ . Для интактного мозга коэффициент  $C$  практически равен 1. Чем больше повреждено ипсилатеральное полушарие, тем больше величина  $C$ .

Иммуногистохимическое окрашивание антителами против Ki67 и ГФКБ (глиального фибриллярного кислого белка) проводили после следующих общих процедур. Срезы головного мозга депарафинировали в трех порциях орто-ксилола, затем регидратировали в спиртах понижающей концентрации по стандартной методике, промывали в дистиллированной воде и переносили в 3%-ную перекись водорода для блокировки эндо-

генной пероксидазы. Затем срезы промывали дистиллированной водой и помещали в PBS.

Перед окрашиванием антителами против Ki67 проводили процедуру теплового демаскирования антигена. Для этого срезы помещали в раствор для демаскирования антигенов (DAKO, Дания) и инкубировали на водяной бане при 95 °С в течение 20 мин. Затем срезы промывали PBS и наносили на них первичные антитела к Ki67 (BD Phatmingen, США) в разведении 1 : 100. Инкубировали в течение 18 ч во влажных камерах при 4 °С. Препараты двукратно промывали PBS и наносили вторичные антитела из набора LSAB2/HRP-rat (DAKO, Дания). Инкубировали 20 мин во влажных камерах при комнатной температуре. Препараты двукратно промывали PBS, наносили конъюгат стрептавидина и пероксидазы из набора LSAB2/HRP-rat (DAKO, Дания) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Препараты двукратно промывали PBS, затем на срезы наносили рабочий раствор хромогена DAB (из набора DAB+; DAKO, Дания). В качестве положительного контроля реакции при выявлении Ki67 использовали срезы тонкого кишечника крысы, в качестве отрицательного контроля — срезы миокарда крысы.

Для окрашивания антителами против ГФКБ после промывки срезов проводили блокировку неспецифического окрашивания инкубированием в 12%-ной сыворотке крови свиней (DAKO, Дания) при комнатной температуре. Затем срезы промывали PBS. После промывки на срезы наносили неразведенные антитела к ГФКБ (DAKO, Дания) и инкубировали в течение 18 ч во влажных камерах при 4 °С. Препараты двукратно промывали PBS и наносили вторичные антитела из набора LSAB2/HRP-rat (DAKO, Дания), инкубировали 30 мин во влажных камерах при комнатной температуре. Препараты двукратно промывали PBS. Наносили конъюгат стрептавидина и пероксидазы из набора LSAB2/HRP-rat (DAKO, Дания) и

инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Препараты двукратно промывали PBS, затем на срезы наносили рабочий раствор хромогена DAB (из набора DAB+; DAKO, Дания). В качестве положительного контроля реакции при выявлении ГФКБ использовали срезы мозжечка крысы, в качестве отрицательного контроля — срезы миокарда крысы.

Образование окрашенного продукта иммуногистохимических реакций контролировали под микроскопом. По достижении необходимой интенсивности окраски смывали раствор хромогена и промывали препараты в 2 порциях дистиллированной воды. Докрашивали астровым синим или толуидиновым синим. Затем срезы обезвоживали в спиртах, просветляли в орто-ксилоле и заключали в парауонт по общепринятой методике.

## Результаты

Анализ культуры МСК методом проточной цитофлуориметрии показал, что она на 3 % состояла из CD45<sup>+</sup>-клеток (клеток гемопоэтического ряда) и на 97 % — из CD90<sup>+</sup>-клеток (собственно МСК) (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 % МСК (Зинькова и др., 2007).

Исследования криосрезов мозга животных из группы клеточной терапии с помощью флуоресцентного микроскопа показали, что меченые МСК, трансплантированные внутривенно в день СМАо, появлялись в мозге на 3-и сут. Они распределялись вокруг сосудов в обоих полушариях. В контралатеральном полушарии были выявлены единичные меченые клетки, в ипсилатеральном — практически

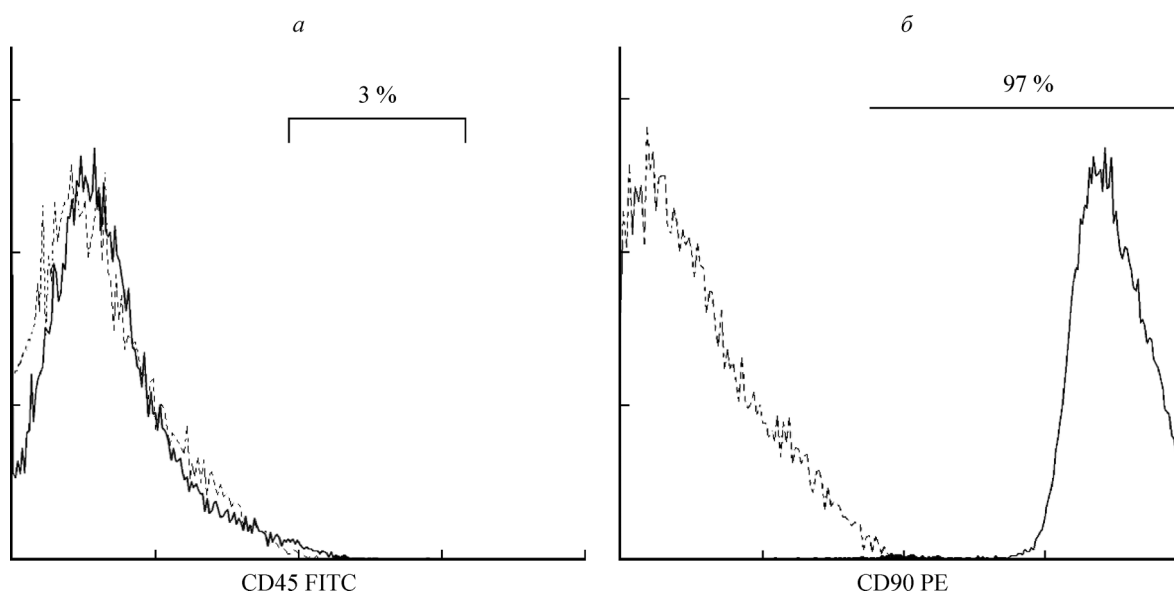


Рис. 1. Распределение интенсивности свечения клеток, выделенных из костного мозга крысы, меченных антителами против негативного (CD45, *a*) и позитивного (CD90, *b*) маркеров мезенхимных стволовых клеток (МСК). Второй пассаж после выделения, данные проточной цитометрии.

По горизонтали — интенсивность свечения клеток, экспрессирующих CD90 (*a*) или CD45 (*b*), меченных антителами, конъюгированными с флуорохромами PE и FITC соответственно; по вертикали — число клеток. Первый пик — неокрашенные клетки (контроль), второй пик — окрашенные клетки; *a* — 3 % клеток экспрессируют CD45 и относятся к гемопоэтическому ряду; *b* — 97 % клеток популяции экспрессируют CD90 и являются МСК; штриховая линия — неокрашенные клетки.

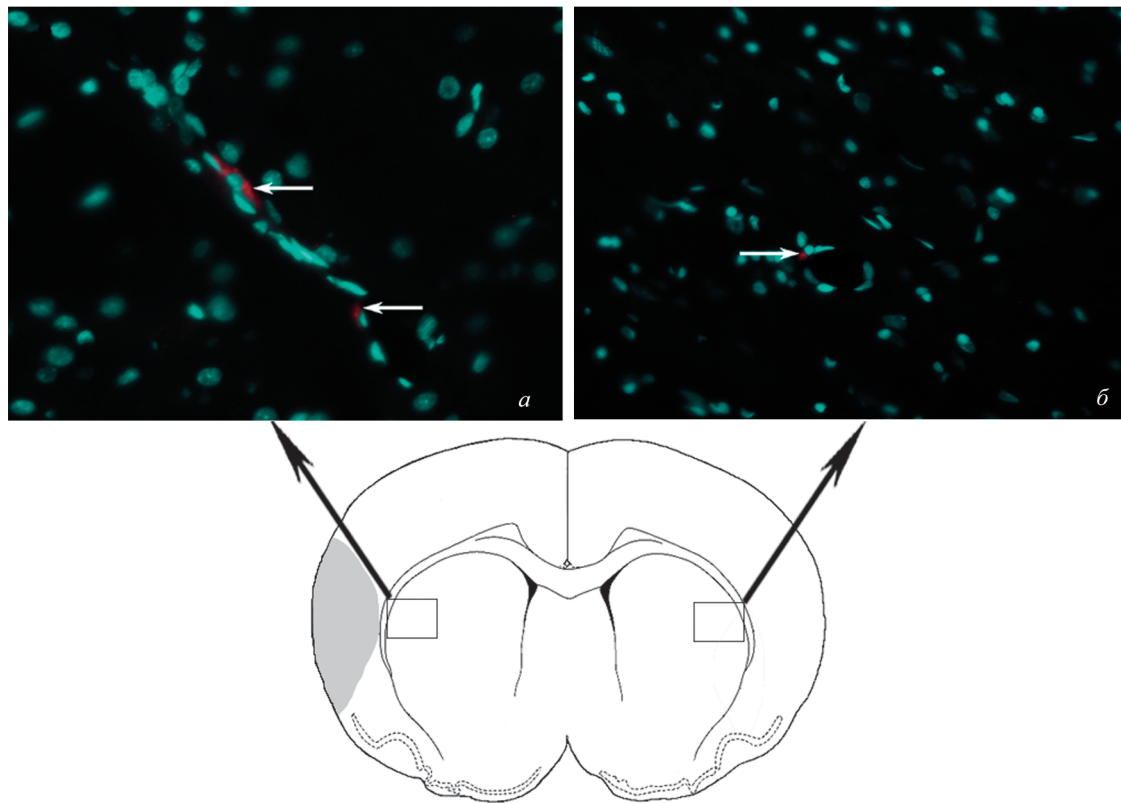


Рис. 2. Распределение флуоресцентно меченных МСК (стрелки) в поврежденном головном мозге животных через 3 сут после окклюзии средней мозговой артерии (СМАо).

Криосрезы, окраска ДНК DAPI. *a* — флуоресцентно меченные МСК вблизи сосуда в хвостатом ядре ипсилатерального полушария через 3 сут после СМАо; *б* — флуоресцентно меченные МСК вблизи сосуда в хвостатом ядре контралатерального полушария через 6 нед после СМАо. Об. 20×.

вокруг всех сосудов. Такое распределение МСК сохранялось в течение 6 нед (рис. 2).

Гистологический анализ ткани мозга у животных контрольной группы показал, что в течение 1-х сут после СМАо повреждение затрагивало большую часть неокортекса, наружную капсулу и головку хвостатого ядра. Поврежденные участки практически не окрашивались по Нисслю и были инфильтрированы небольшим количеством окрашенных клеток (нейтрофилов). Выявлена четкая граница между ишемизированной и неповрежденной тканями мозга. В пенумбре обнаружены многочисленные нейроны, имеющие признаки повреждения: вакуолизация ядра, эктопия ядрышек, распыление вещества Ниссля, вакуолизация цитоплазмы и погибшие сморщенные нервные клетки веретенообразной формы. На 2-е сут после СМАо в субэндоцелиальной зоне боковых желудочков наблюдали утолщение отростков крупных клеток со светлым ядром, расположенных рядом с эпендимными клетками, выстилавшими полость желудочков. На 3-и сут в зоне повреждения увеличивалась инфильтрация различными клеточными элементами. В области повреждения развивался некроз, но распада ткани еще не было. Повышалась проницаемость сосудов в пограничной области, вокруг них появлялись скопления клеточных элементов — периваскулярные муфты, состоящие из лимфоцитов, плазматических клеток и иногда эозинофилов (рис. 3, *a*). Через 5 сут после СМАо продолжался процесс распада некротических участков мозга. В пограничной области наблюдали сильный отек, редкие измененные нейроны, микроглиальные клетки и большое количество

лейкоцитов. На границе повреждения выявлены сосуды достаточно большого диаметра, окруженные лимфоцитами. По всей поврежденной ткани отмечены вновь образованные капилляры.

Через 1 нед между поврежденными и неповрежденными участками мозга начиналось формирование структурированного рубца, в котором отмечено большое количество сосудов разного диаметра (рис. 3, *б*). Часть эпендимных клеток, выстилающих полости желудочков, резко уплощалась. В субэпендимной зоне наблюдали мелкие удлиненные клетки различной формы, иногда митотически делящиеся. С помощью иммуногистохимической реакции с антителами против белка Ki67 в субэпендимной зоне желудочков были выявлены редкие иммунопозитивные клетки (рис. 4, *a*). Через 2 нед выявлен четкий демаркационный рубец между тканевым дефектом и неповрежденной тканью (рис. 3, *в*). В пенумбре наблюдали клеточную инфильтрацию и гибнущие нейроны. Очищение ткани мозга от поврежденных фрагментов началось лишь в отдельных участках. У ряда животных еще наблюдали активное воспаление. Началось формирование ликворных кист. Через 4 нед наблюдали расширение желудочка в левом (поврежденном) полушарии (рис. 5, *a*). Большая часть неокортекса отсутствовала. Глиальный рубец между поврежденной и неповрежденной тканями истончался, но в пределах неокортекса граница между поврежденной и неповрежденной тканями выражена четко и структурирована (рис. 3, *г*). К данному сроку развились постинсультные осложнения, в том числе и гидроцефлия. У большинства животных наблюдали расширение желудочка

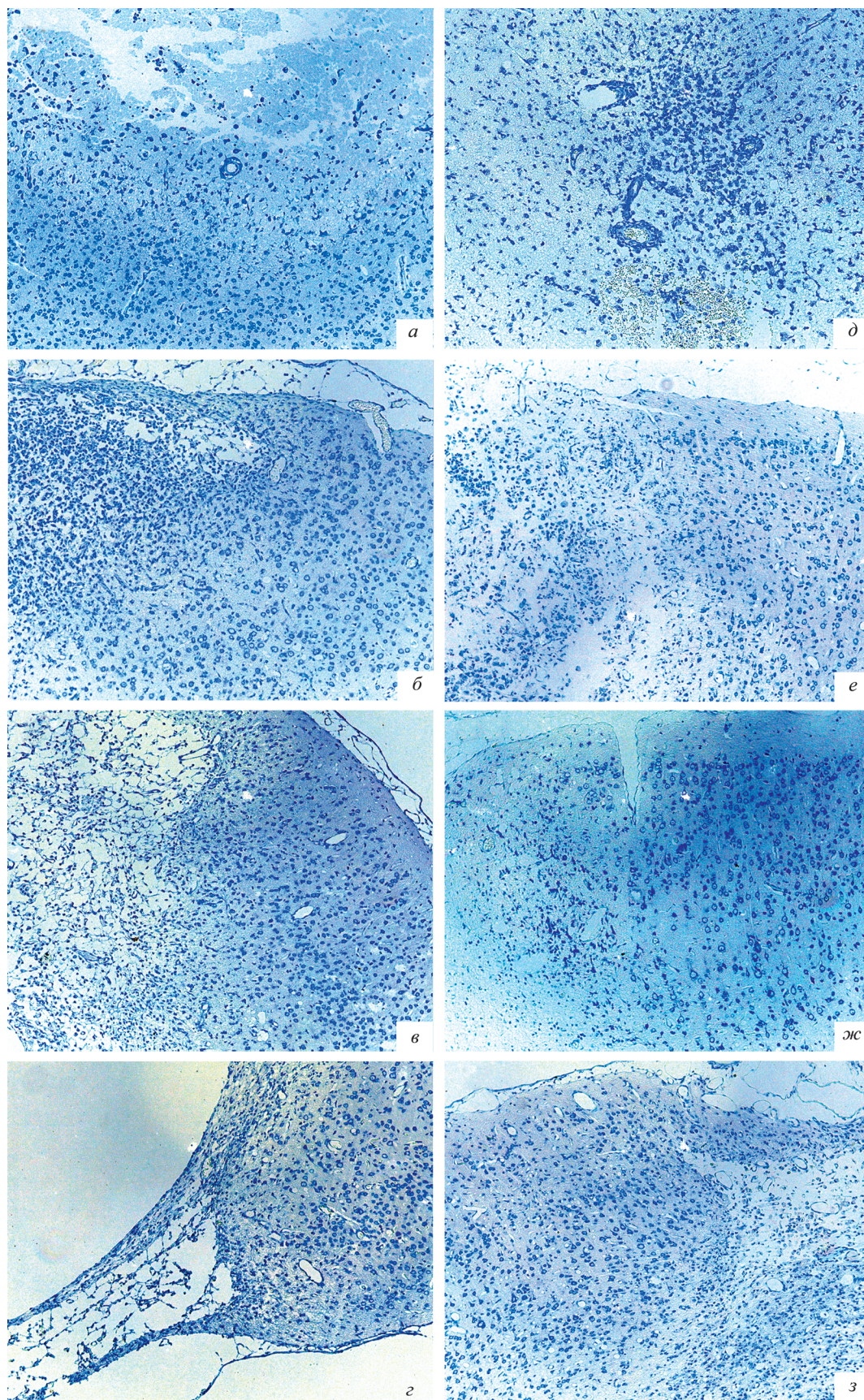


Рис. 3. Динамика морфологических изменений в головном мозге крысы после СМАо: через 3 (а, д) и 5 (е) сут и 1 (б), 2 (в, ж) или 4 (г, з) нед.

а—г — группа контроля; д—з — группа клеточной терапии; окраска по Нислю; об. 10×.

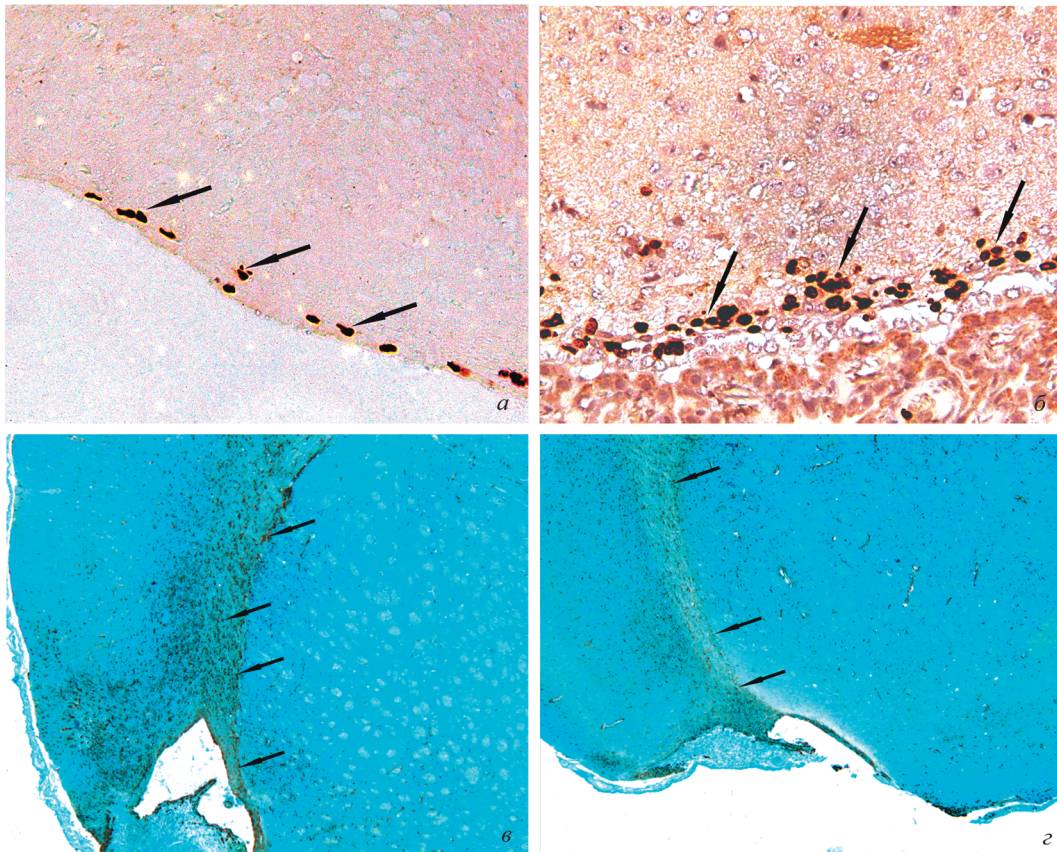
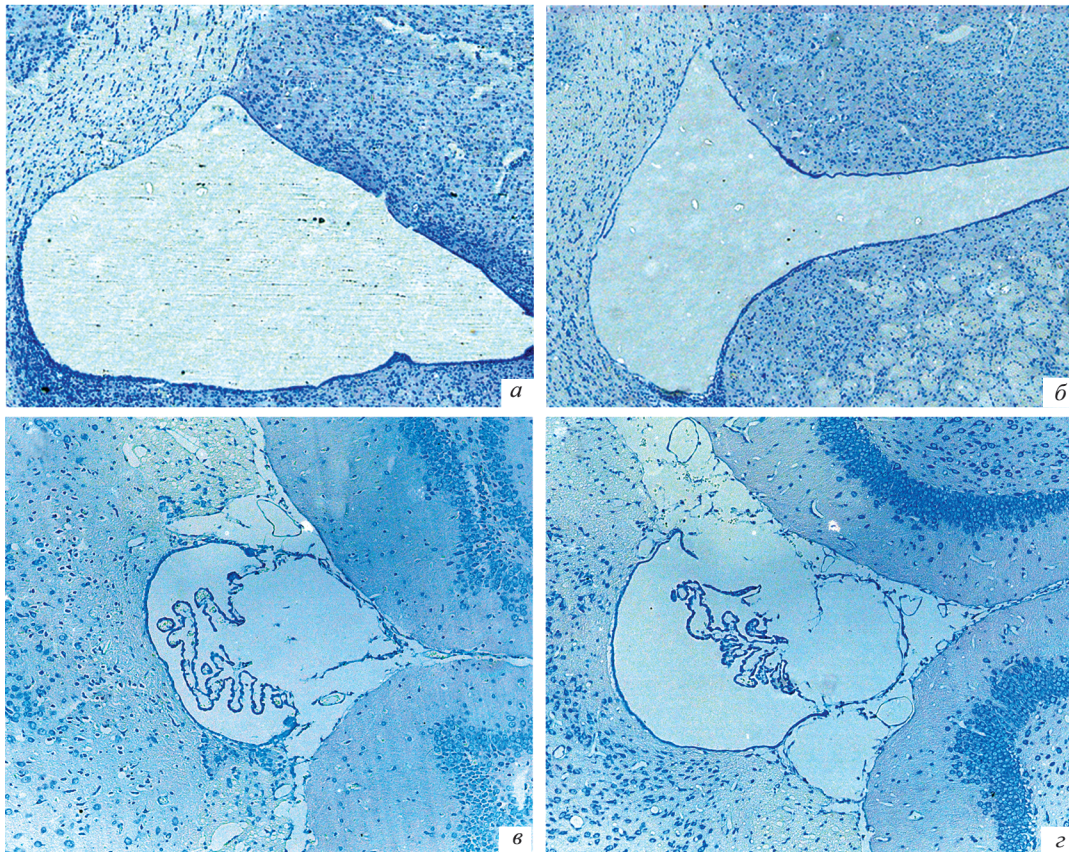


Рис. 4. Иммуногистохимическое мечение срезов головного мозга крысы через 1 (а, б) и 4 (в, з) нед после СМАо антителами против маркерного белка делящихся клеток Кi67 и против маркерного белка реактивной астроглии ГФКБ. а, в — группа контроля; б, з — группа клеточной терапии; продукт реакции (коричневый цвет) показан стрелками. Об. 10×.



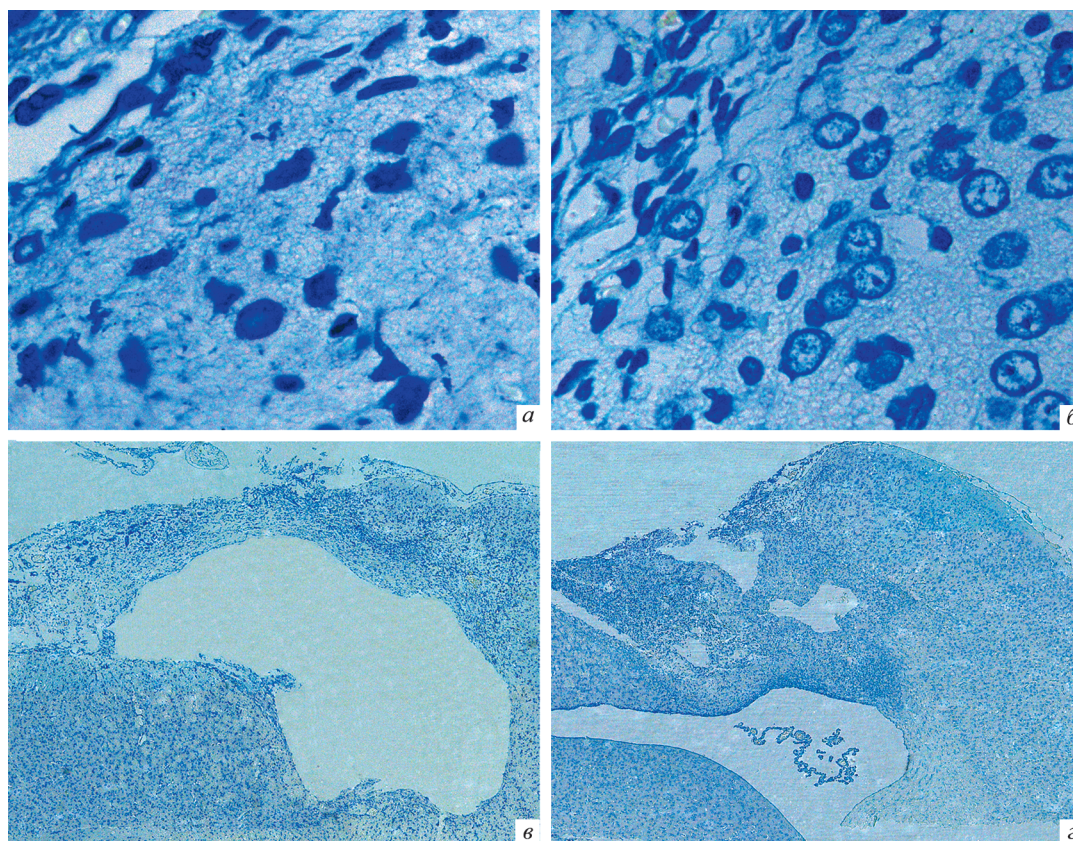


Рис. 6. Структура области ишемического повреждения головного мозга крысы через 6 нед после СМАо: пенумбра в группах контроля (а) и клеточной терапии (б), а также ликворные кисты в группах контроля (в) и клеточной терапии (г).

Окраска по Нисслю; об. 100× (а, б) или 10× (в, г).

поврежденного полушария (рис. 5, а) и практически полное разрушение сосудистого сплетения в третьем желудочке (рис. 5, в). В частях мозга, в которых наблюдали сдавливание тканей, вновь была выявлена гибель нейронов. В этих участках присутствовали макрофаги, фибробласты и многочисленные эндотелиальные клетки. Наблюдали большое количество зернистых шаров — такой вид приобрели клетки, которые фагоцитировали массы от распада миелина. Большая часть нейронов в сохранившейся коре мозга обнаруживала признаки повреждения. В субэпендимной зоне боковых желудочков наблюдали значительных размеров образование, состоящее из олигодендроглии, микроглиальных клеток и сосудов. Пролиферации клеток в этих участках не наблюдали. Через 6 нед у животных с первоначально обширным инсультом выявлены значительные повреждения ткани мозга — отсутствовали первичная и вторичная соматосенсорная, пириформная и инсулярная кора. На месте дефекта сформировалась ликворная киста, полость которой очень обширна (рис. 6, в). Большинство нейронов в пенумбре повреждено (рис. 6, а). Иммуногистохимическая реакция против ГФКБ выявила мощный глиоз в пенумбре, неокортексе и частично в хвостом ядре (рис. 4, в).

У животных из группы клеточной терапии в течение 1-х и 2-х сут после СМАо гистологическая картина повреждения ткани мозга такая же, как у крыс из группы контроля. Единственное различие — нет четкой границы повреждения. Все клетки пенумбры находились в реактивном состоянии, но погибла только небольшая их часть. На 3-и сут в области повреждения развился некроз и начался распад ткани. В пенумбре были более выражены по сравнению с контролем периваскулярные муфты, в которых клетки были расположены в несколько рядов (рис. 3, д). Отмечена значительная инфильтрация поврежденной пограничной зоны. В субэпендимной зоне боковых желудочков выявлена группа клеток, часть которых вытянута по направлению к неокортексу. На 5-е сут после СМАо отмечено, что процесс распада и очищения ткани мозга от поврежденных фрагментов проходил заметно быстрее, чем в контроле. Между поврежденной и неповрежденной областями мозга началось формирование глиального рубца (рис. 3, е). В поврежденной зоне наблюдали большое количество микроглиальных клеток, а в неповрежденной — плотно расположенных нервных клеток. Из них только небольшая часть, прилегающая к границе повреждения, проявляла реактивные изменения ядер

Рис. 5. Постинсультные осложнения в головном мозге крысы через 4 нед после СМАо: гидроцефалия мозга в группе контроля (а) и в группе клеточной терапии (б), а также повреждение сосудистого сплетения в третьем желудочке групп контроля (в) и клеточной терапии (г).

Окраска по Нисслю; об. 10×.

и цитоплазмы. В центральной части инсультной зоны наблюдали значительную пролиферацию эндотелиальных клеток. Через 1 нед в субэпендимной зоне наблюдали митотически делящиеся клетки. Иммуногистохимическое окрашивание тканей мозга антителами против Ki67 показало, что при инсультах в данной области появлялась группа пролиферирующих клеток (рис. 4, б). Через 2 нед между поврежденной и неповрежденной тканями (между тканевым дефектом и пограничной зоной) наблюдали рубец, состоящий из 1—3 рядов глиальных клеток (рис. 3, ж). Процесс очищения тканей мозга от погибших клеток уже полностью завершен.

Через 4 нед в пределах неокортекса граница между поврежденной и неповрежденной тканями выражена четко и структурирована (рис. 3, з). Большая часть нейронов в сохранившейся коре мозга не повреждена. При обширных дефектах ткани мозга (большей части коры полушария, хвостатого ядра и наружной капсулы) у животных развивались постинсультные осложнения, в том числе и гидроцефалия (рис. 5, б). В некоторых случаях мы наблюдали значительное расширение желудочков и частичное разрушение сосудистого сплетения (рис. 5, з). В случаях ограниченных мозговых дефектов (например, только коры большого мозга) сосудистое сплетение сохраняло свою структуру. В субэпендимной зоне наблюдали скопление клеток неправильной формы, которые окрашивались по Нисслю.

Через 6 нед в мозге подопытных животных не наблюдали единой большой полости на месте дефекта ткани. Вместо нее были выявлены мелкие полости разной величины, перемежавшиеся с клеточными островками (рис. 6, з). При большом увеличении видно, что это многочисленные эндотелиальные клетки и капилляры. При умеренных повреждениях отчетливо выявлялось замещение нейронов в тканях, подвергшихся сдавливанию вследствие излишней продукции ликвора, глиальными и соединительнотканными клеточными элементами и мелкими сосудами. Однако большинство нейронов в пенумбре было не повреждено (рис. 6, б). Иммуногистохимическое окрашивание тканей мозга антителами против ГФКБ показало, что астроциты в наружной капсуле активизировались и формировали «капсулу-оболочку», которая препятствовала расширению желудочков и распространению гибели нервной ткани, но не деформировала мозг (рис. 4, з).

Коэффициент  $C$  для животных, декапитированных через 6 нед, в контрольной группе составил 1.7 ( $n = 8$ ), в группе клеточной терапии — 1.3 ( $n = 8$ ).

## Обсуждение

Исследование динамики морфологических изменений в ткани головного мозга крыс после ишемического инсульта в широком промежутке времени — от 1 сут до 6 нед — позволило нам проследить течение воспалительной реакции, формирование и ремоделинг глиального рубца, развитие постинсультных осложнений и выяснить, влияет ли трансплантация МСК на эти процессы.

Через 1 сут после СМАо в ипсилатеральном полушарии уже сформировался очаг ишемического повреждения. Большое количество нейронов в пенумбре погибло или имеет признаки повреждения. Внутривенное введение МСК в день СМАо практически не повлияло на течение патологических процессов и ишемизированной обла-

сти в течение 1 сут. На этом сроке исследования флуоресцентно меченных МСК в ткани мозга не выявлено. Единичные меченые клетки были зафиксированы в мозге через 2 сут после введения. Через 3 сут их количество увеличилось в несколько раз. МСК локализовались вдоль наружных стенок внутренних мозговых сосудов в обоих полушариях. Возникает вопрос: почему МСК были выявлены в мозге только на 3 сут? Ведь СМАо приводила к нарушению гематоэнцефалического барьера уже примерно через 1 ч (Belayev et al., 1996; Jiang et al., 2005; Lenzser et al., 2005).

При работе на модели инфаркта миокарда мы также выявляли первые единичные МСК в тканях сердца на 2-е сут, а значимое количество — только на 3-и сут. К настоящему времени показано, что МСК не просто пассивно разносятся по организму током крови, а осуществляют направленную миграцию (Ji et al., 2004; Wynn et al., 2004; Bhakta et al., 2006; Son et al., 2006). Выяснение механизма и причин миграции МСК в нервной ткани — задача нашей дальнейшей работы. Именно на 3-и сут выявили первые морфологические различия в ткани головного мозга контрольных животных и крыс из группы клеточной терапии. Эти различия носили количественный характер. Выявленные нами в пенумбре периваскулярные клеточные муфты по объему были значительно больше в группе подопытных животных. Наличие клеток на наружной стенке мозговых сосудов является морфологическим проявлением нарушения гематоэнцефалического барьера на 3-и сут после СМАо (Гилерович, Отеллин, 2001). Через 1 нед у животных из контрольной и подопытной групп была выявлена пролиферация клеток в субэпендимной зоне желудочков головного мозга. Однако после трансплантации МСК мы обнаружили значительное количество делящихся клеток, а у животных контрольной группы — единичные пролиферирующие клетки. Ранее было показано, что СМАо вызывает деление клеток субэпендимной зоны желудочков мозга у крыс (Arvidsson et al., 2002; Darsalia et al., 2005; Thored et al., 2006). 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 МСК животным после СМАо привела к более раннему формированию глиального рубца между поврежденной и неповрежденной тканями мозга.

Так, наличие рубца у крыс подопытной группы отмечено на 5-е сут, а в контрольной — через 1 нед. Известно, что глиальный рубец препятствует регенерации. Но кроме того, его формирование способствует стабилизации ткани мозга после инсульта: митотически делящиеся астроциты окружают поврежденную зону и вновь образованные сосуды, способствуя восстановлению гематоэнцефалического барьера, предупреждая сильную воспалительную реакцию и ограничивая клеточную дегенерацию (Silver, Miller, 2004).

Трансплантация МСК положительно повлияла на динамику воспалительного процесса в ишемизированной мозговой ткани. У подопытных животных воспаление полностью завершилось через 2 нед, а у контрольных — через 3. Через 4 нед у большинства животных как контрольной, так и подопытной групп развились постинсультные осложнения — расширение желудочков и гидроцефа-



лия. Гидроцефалия в наших исследованиях относится к категории сопутствующей (реактивной). С одной стороны, эпителиальные клетки сосудистого сплетения, ответственные за выработку ликвора, очень чувствительны к ишемии мозга. К данному сроку после СМАо мы наблюдали атрофию эпителиальных клеток сосудистого сплетения (рис. 5, в, г), что приводило к нарушению гематоликворного барьера и увеличению объема ликвора в головном мозге. С другой стороны, если неокортекс и внешняя капсула, удерживающие форму мозга в норме, повреждены и истончаются, то желудочек расширяется (рис. 5, а, б). Это приводит к сдавливанию оставшегося неокортекса избыточным количеством ликвора и дополнительной гибели нейронов. Постинсультные осложнения в определенной мере уменьшают терапевтический эффект от трансплантации МСК.

Иммуногистохимический анализ показал, что патологическому расширению желудочков препятствует образование в наружной капсуле глиально-соединительной капсулы-оболочки между полостью желудочка и дефектом ткани мозга. Через 6 нед после СМАо такая капсула-оболочка была выявлена у животных как контрольной, так и подопытной групп. Однако в контрольной группе мощный глиоз затрагивал пенумбру, неокортекс и хвостатое ядро. В группе клеточной терапии глиоз был существенно меньше, не деформировал ткань и локализовался в основном в пограничной с повреждением зоне.

Несмотря на наличие серьезных постинсультных осложнений, приводящих к дополнительной гибели нейронов, у животных из группы клеточной терапии мы наблюдали сохранение нормальной структуры нейронов, находившихся в непосредственной близости от границы повреждения. У контрольных животных в этой зоне были только поврежденные нейроны. Еще один положительный результат трансплантации МСК после СМАо — уменьшение площади повреждения ткани головного мозга примерно в 1.3 раза по сравнению с контролем.

Итак, в представленном исследовании мы впервые показали, что МСК, трансплантированные внутривенно в день СМАо, на 3-и сут оказывались в мозге и локализовались в непосредственной близости от внешней стенки мозговых сосудов. Такое распределение МСК по тканям мозга сохранялось в течение всего периода исследования (6 нед). Введение МСК ускорило течение постинсультных процессов на ранних стадиях (до 3 нед) на 25—30%. С помощью гистохимического окрашивания мы впервые показали, что введение МСК усиливало пролиферацию (активированную инсультом) эндогенных стволовых клеток в субпендимной зоне желудочков. Мы продемонстрировали, что МСК оказывали нейротекторное воздействие на клетки мозга. Следовательно, клеточная терапия с помощью МСК оказывает положительное влияние на состояние тканей головного мозга после ишемического инсульта.

Авторы выражают глубокую благодарность Е. Р. Гагинской за предоставленную возможность использования технической базы для проведения экспериментов.

#### Список литературы

Гилерович Е. Г., Отеллин В. А. 2001. Трансплантация эмбриональной нервной ткани как модель изучения ранних этапов становления центральной нервной системы. Успехи физиол. наук. 32 (1): 38—47.

Зинькова Н. Н., Гилерович Е. Г., Соколова И. Б., Вуйде С. К., Шведова Е. В., Александров Г. В., Кругляков П. В., Кислякова Т. В., Польшцев Д. Г. 2007. Терапия ишемического инсульта головного мозга у крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток. Цитология. 49 (7): 566—575.

Кругляков П. В., Соколова И. Б., Аминова Х. К., Некрасова Н. Н., Вуйде С. В., Чередниченко Н. Н., Зарицкий А. Ю., Семернин Е. Н., Кислякова Т. В., Польшцев Д. Г. 2004. Терапия экспериментального инфаркта миокарда у крыс с помощью трансплантации сингенных мезенхимных стволовых клеток. Цитология. 46 (12): 1043—1054.

Arvidsson A., Collin T., Kitik D., Kokaia Z., Lindvall O. 2002. Neutonal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature Med.* 8: 963—970.

Belavev L., Busto R., Zhao W., Ginsberg M. 1996. Quantitative evaluation of blood — brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 739: 88—96.

Bhakta S., Hong P., Koc O. 2006. 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. Revasc. Med.* 7: 19—24.

Bolander H., Persson L., Hillered L., d'Argy R., Ponten U., Olsson Y. 1989. Regional cerebral blood flow and histopathologic changes after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 20: 930—937.

Chen J., Li Yi, Katakowski M., Chen X., Wang L., Lu D., Lu M., Gautam S. C., Chopp M. 2003a. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke on femal rat. *J. Neurosci. Res.* 73: 778—786.

Chen J., Li Yi, Wang L., Katakowski M., Gautam S. C., Xu Y., Lu M., Zhang L., Chopp M. 2004. Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis. *Brain Res.* 1005: 21—28.

Chen J., Zhang G. Z., Li Yi, Wang L., Xu Y., Lu D., Gautam S. C., Lu M., Zhu Z., Chopp M. 2003b. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ. Res.* 92: 692—699.

Darsalia V., Heldmann U., Lindvall O., Kokaia Z. 2005. Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke.* 36: 1790—1795.

Ji J., He B., Dheen S., Tay S. 2004. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells.* 22: 415—427.

Jiang Q., Ewing J., Ding G., Zhang Z., Li L., Whitton P., Lu M., Hu J., Li Q., Knight R., Chopp M. 2005. Quantitative evaluation of BBB permeability after embolic stroke in rat using MRI. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25: 583—592.

Lenzser G., Kis B., Bari F., Busija D. 2005. Diazoxide preconditioning attenuates global cerebral ischemia-induced blood — brain barrier permeability. *Brain Res.* 1051: 72—80.

Memezawa H., Smith M., Siesjo B. 1992. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 23: 552—559.

Nagasawa H., Kogure K. 1989. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 20: 1037—1043.

Paxinos G., Watson Ch. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York. Acad. Press. 474 p.

Silver J., Miller J. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nature Rev. Neurosci.* 5: 146—156.

Son B., Marguez-Curtis L., Kucia M., Wysoczynski M., Turner A., Ratajczak J., Ratajczak M., Janowska-Wieczorek A. 2006. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells *in vitro* is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells.* 24: 1254—1264.

Thored P., Arvidsson A., Cacci E., Ahlenius H., Kallur T., Darsalia V., Ekdahl C., Kokaia Z., Lindvall O. 2006. Persistent

production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells*. 24: 739—747.

Tyson G., Teasdale G., Graham D., McCulloch J. 1984. Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological change. *Ann. Neurol.* 15: 559—567.

Woodbury D., Reynolds K., Black I. 2002. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* 96: 908—917.

Woodbury D., Schwarz E., Prockop D., Black I. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61: 364—371.

Wynn R., Hart C., Corradi-Perini C., O'Neill L., Evans C. A., Wraith J. E., Fairbairn L. J., Bellantuono I. 2004. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 104: 2643—2645.

Zhang Z., Zhang L., Tsang W., Soltanian-Zadeh H., Morris D., Zhang G., Goussev A., Powers C., Yeich T., Chopp M. 2002. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood — brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22: 379—392.

Поступила 26 III 2007

#### MESENCHYMAL STEM CELLS TRANSPLANTATION INFLUENCES UPON DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN RAT BRAIN AFTER STROKE

N. N. Zinkova,<sup>1</sup> \* E. G. Gilerovich,<sup>2</sup> I. B. Sokolova,<sup>2</sup> E. V. Shvedova,<sup>1</sup> A. A. Bilibina,<sup>1</sup> P. V. Kruglyakov,<sup>1</sup> D. G. Polyntsev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> «Trans-Technologies», Ltd., and <sup>2</sup> State Research Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg;  
\*e-mail: natalia\_z@alkorbio.ru

Study of dynamic morphological changes of the brain after ischemic stroke is an important phase of pre-clinical trial of mesenchymal stem cell (MSC) therapy for this widespread disease. Experiments were carried out in inbred Wistar-Kyoto rats. MSCs were isolated, expanded in culture and labeled with vital fluorescent dye PKH26. Animals were subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by injection of  $5 \cdot 10^6$  rat MSCs into the tail vein on the day of MCAO. Control group of animals received PBS injection (negative control). Animals were sacrificed in 1, 2, 3 and 5 days and in 1, 2, 4 and 6 weeks after operation. MSCs were revealed in the brain on the third day transplantation. They distributed around brain vessels in both the ipsilateral and contralateral hemispheres. This pattern of distribution remained unchanged during 6 weeks of observation. It was demonstrated that inflammation process and scar formation in the experimental group progressed 25—30 % faster than in the control group. MSC transplantation stimulated endogenous stem cell proliferation on the subependymal zone of lateral ventricles (subventricular zone). What is more, MSC injection showed neuroprotective effect: almost all penumbra neurons in animals treated with cell therapy retained their normal structure, whereas in animals of control group penumbra neurons died or had signs of serious damage.

**Key words:** mesenchymal stem cells, ischemic stroke, glial scar, proliferation, neurons, penumbra.