

## ТЕРАПИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС С ПОМОЩЬЮ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

© Н. Н. Зинькова,<sup>1,\*</sup> Е. Г. Гилерович,<sup>2</sup> И. Б. Соколова,<sup>1</sup> С. К. Вуйде,<sup>1</sup> Е. В. Шведова,<sup>1</sup>  
Г. В. Александров,<sup>1</sup> П. В. Кругляков,<sup>1</sup> Т. В. Кислякова,<sup>1</sup> Д. Г. Польшинцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ООО «Транс-Технологии»

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

\* электронный адрес: natalia\_z@alkorbio.ru

Терапия ишемического инсульта с помощью мезенхимных стволовых клеток (МСК) — новое, перспективное направление в лечении этого тяжелейшего и очень распространенного заболевания. Эксперименты проведены на крысах инбредной линии Вистар-Киото. Ишемический инсульт смоделирован посредством окклюзии средней мозговой артерии (СМАо). Через 3 сут была проведена внутривенная трансплантация МСК. Предварительно МСК были выделены из костного мозга животных, культивированы и окрашены флуоресцентным красителем PKH26 *in vitro*. Результаты клеточной терапии оценивали по следующим параметрам: поведенческое и неврологическое тестирование животных, площадь дефекта мозга, поврежденные мозговые структуры, состояние нейронов и количество сосудов в пограничной с некрозом области мозга. Показано, что контрольные животные (только СМАо) в течение 6 нед не восстановили исходный поведенческий и неврологический статус, тогда как животные в опытной группе (терапия МСК) достигли показателей интактных крыс через 2—3 нед после СМАо. У контрольных животных площадь дефекта тканей мозга была примерно в 1.3 раза больше, чем в опытной группе. После трансплантации МСК повреждение не выходило за пределы неокортекса, сохранялись хвостатое ядро, наружная капсула и пириформная кора. Количество сосудов в пограничной с повреждением области мозга было примерно в 2 раза больше, чем у животных контрольной группы и у интактных животных. Впервые выявлен феномен: после трансплантации МСК вдвое увеличилось количество сосудов в неокортексе и хвостатом ядре в контралатеральном полушарии. Сделан вывод о том, что трансплантация МСК оказывает несомненно положительное влияние на восстановление тканей мозга после ишемического инсульта.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, инсульт, капилляры, площадь дефекта мозга.

Принятые сокращения: ГЭБ — гематоэнцефалический барьер, МСК — мезенхимные стволовые клетки, СМАо — окклюзия средней мозговой артерии.

В настоящее время клеточная терапия становится общепризнанным методом лечения тяжелых патологий, в том числе и ишемического инсульта. Проведен ряд экспериментальных работ, в которых после окклюзии средней мозговой артерии (СМАо) лабораторным животным (мышам и крысам) трансплантировали различный клеточный материал: нейроны головного мозга плода, клетки пуповинной крови, мезенхимные стволовые клетки (МСК), дифференцированные *in vitro* в нейрональном направлении, сингенные или ксеногенные недифференцированные МСК (Borlongan et al., 1998; Park, 2000; Chen et al., 2001; Li et al., 2002; Kang et al., 2003; Vogel et al., 2003; Vendrame et al., 2004). Клетки вводили как непосредственно в место повреждения тканей головного мозга, так и в кровотоки. При этом во всех исследованиях была получена положительная динамика восстановления мозговых структур и(или) поведенческого и неврологического статуса животных.

Наиболее перспективным материалом для клеточной терапии, на наш взгляд, являются МСК. Это плюрипотентные клетки, способные дифференцироваться в

остеогенном, хондрогенном, адипоцитарном, миоцитарном, кардиомиоцитарном, а также в нейрональном и глиальном направлениях (Ferrari et al., 1998; Pittenger et al., 1999; Jaiswal et al., 2000; Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000; Deng et al., 2001; Fukuda, 2001; Woodbury et al., 2002). Разработаны и апробированы методики выделения МСК из костного мозга человека и животных, их дальнейшего культивирования и наращивания *in vitro* до необходимого количества с сохранением свойств. Это позволяет использовать для клеточной терапии аутологичный материал и тем самым избежать проблем с иммунной совместимостью трансплантата и реципиента. Еще одна предпосылка для использования МСК при лечении инсульта — влияние этих клеток на течение воспалительной реакции в зоне тканевого повреждения. МСК *in vitro* секретируют набор факторов, стимулирующих (IL-1, TNF — tumor necrosis factor), регулирующих (IL-11) и ингибирующих (bTGF — transforming growth factor) воспалительные процессы (Majumdar et al., 1998; Deans, Moseley, 2000; Mareschi et al., 2001; Chen et al., 2003b). В экспериментах на животных (крысах), у кото-

рых был смоделирован инфаркт миокарда, доказано, что после трансплантации МСК воспаление в области повреждения сердечной мышцы протекало примерно в 2 раза быстрее, чем в контрольной группе (Кругляков и др., 2004). В работах Чоппа с коллегами (Chen et al., 2003a) на животных со СМАо было показано, что после введения МСК в системную кровь в ипсилатеральном полушарии значительно повышалась секреция BDNF (brain-derived neurotrophic factor) и NGF (nerve growth factor). In vitro было продемонстрировано, что после добавления в клеточную культуру экстракта тканей поврежденного мозга МСК продуцировали такие факторы, как VEGF (vascular endothelial growth factor), BDNF, NGF и bFGF (basic fibroblast growth factor) (Chen et al., 2002; Li et al., 2002). Считают, что эти факторы предотвращают апоптоз клеток в ткани, пограничной с областью некроза (Chen et al., 2003b, 2004), и активируют ангиогенез (Zhang et al., 2002). В случае применения МСК после инсульта у экспериментальных животных было зарегистрировано значительное увеличение площади поверхности сосудистой сети в пенумбре (Chen et al., 2003a, 2004).

Задача представленной работы заключалась в том, чтобы дать комплексную — морфологическую, морфометрическую и физиологическую — оценку влияния внутривенной трансплантации МСК на организм животного после ишемического инсульта. В нашем исследовании СМАо была проведена без реперфузии, т. е. смоделировано стойкое нарушение кровообращения в области СМА левого полушария. К тому же мы увеличили срок наблюдения за животными после инсульта до 6 нед и провели трансплантацию МСК только через 3 сут после СМАо.

### Материал и методика

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар-Киото массой 180—200 г, возраст 4—5 мес.

Моделирование экспериментального ишемического инсульта головного мозга. Ишемический инсульт у подопытных животных был смоделирован посредством окклюзии средней мозговой артерии (СМАо) в левом полушарии. Крыс наркотизировали кетаминном (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.

Окклюзия СМА — общепринятый способ моделирования ишемического инсульта у крыс. Она позволяет получить достаточно стандартное повреждение, которое распространяется на неокортекс и каудатопутамен (Tyson et al., 1984; Bolander et al., 1989; Nagasawa, Kogure, Memezawa et al., 1992).

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 (Hyclone, Новая Зеландия), 20%-ной сывороткой крови эмбрионов коров (Hyclone, Новая Зеландия) и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Hyclone, 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 раствора PBS (20 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7.4 и 0.1 М NaCl). Клетки культивировали в монослое при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> в течение 6—7 сут после эксплантации. В дальнейшем культуру пересеивали каждые 7 сут с исходной плотностью 1.27 · 10<sup>3</sup> клеток/см<sup>2</sup>. Для посева культуры МСК крыс использовали раствор трипсина и ЭДТА (Hyclone, Новая Зеландия). Питательную среду меняли каждые 3 сут.

Фенотипирование МСК крыс проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре Coulter Epics XL (Beckman, Coulter, США). МСК окрашивали антителами против негативного маркера CD45 (Beckton Dickinson, США) и антителами против позитивного маркера CD90 (Beckton Dickinson, США). Для окрашивания антителами против поверхностных маркеров клетки снимали с чашек раствором трипсина и ЭДТА (Hyclone, Новая Зеландия), промывали 2 раза раствором PBS, затем на 1 ч переносили в раствор моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромом, в разведении 1 : 20. Далее клетки промывали 2 раза раствором PBS и оценивали интенсивность свечения. Фенотипирование проводили после первого, второго и третьего пересевов культуры.

Для более полной характеристики полученных клеток их подвергали направленной дифференцировке в так называемых ортодоксальных (остеогенном, хондрогенном и адипоцитарном) и в нейрональном направлении. Для индукции дифференцировки в нейрональном направлении использовали ростовой фактор нейтрофин-3. МСК наращивали до плотного монослоя. Затем в стандартную среду культивирования добавляли нейтрофин-3, так чтобы его финальная концентрация составила 2.5 · 10<sup>-6</sup> г/мл. Обработку индуктором дифференцировки продолжали 2 нед. При этом половину среды культивирования меняли каждые 3 сут.

Фенотипирование полученных производных было проведено путем окрашивания клеток антителами против белковых маркеров клеток нейронального ряда: специфического ядерного белка нейронов (NeuN; Chemicon, США); белка, ассоциированного с нейрофиламентом (Tau; Chemicon, США); миелин-олигодендроцит-специфического белка (MOSP; Chemicon, США); глиального фибриллярного кислого белка (GFAP; Chemicon, США). Для этого клетки на чашках фиксировали 4%-ным раствором ПФА 8 мин при комнатной температуре, промывали 2 раза раствором PBS, обрабатывали 0.1%-ным раствором сапонина в течение 1 ч, затем добавляли раствор моноклональных антител (разведение 1 : 100). Далее клетки промывали 2 раза PBS и на 30 мин переносили в раствор биотинилированных вторичных антител. После очередной промывки PBS клетки обрабатывали раствором стрептавидин-пероксидазы в течение 15 мин, еще 1 раз промывали PBS и наносили раст-

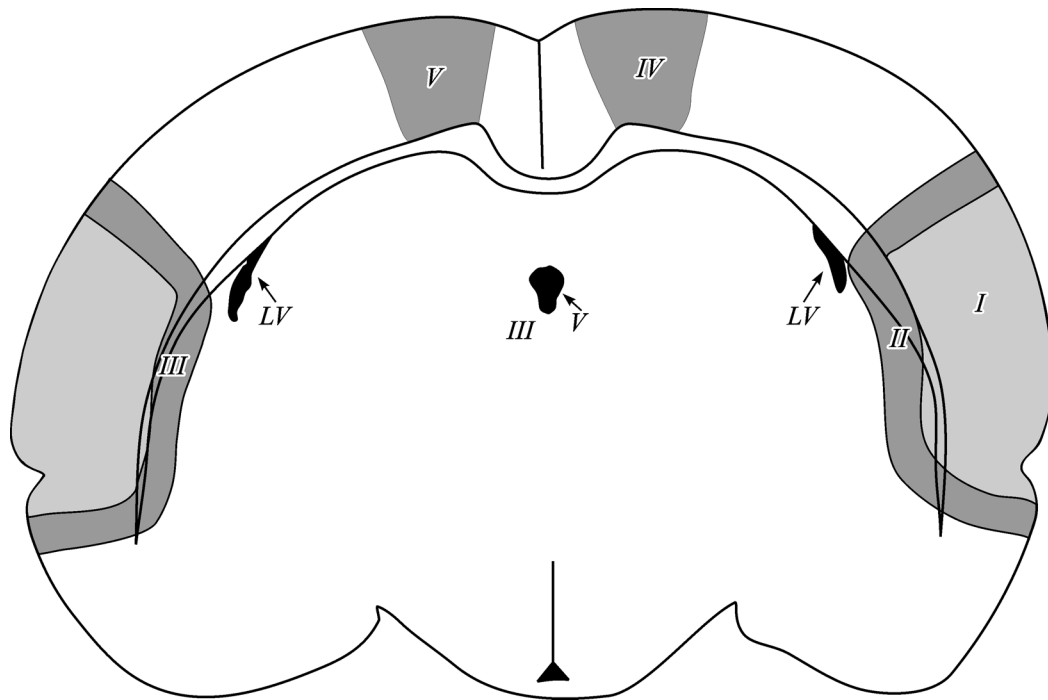


Рис. 1. Схема областей подсчета количества сосудов.

*I* — поврежденная зона (количество сосудов не определяли), *II* — пограничная с поврежденной зоной, *III* — область подсчета сосудов в неповрежденном (контралатеральном) полушарии, *IV* — удаленная от повреждения зона (двигательная кора) поврежденного (ипсилатерального) полушария, *V* — удаленная от повреждения зона (двигательная кора) неповрежденного (контралатерального) полушария; *LV* — боковой желудочек мозга, *IIIV* — третий желудочек мозга.

вор 3,3-диаминобензидина (DAB; Sigma, США). Течение реакции контролировали визуально с помощью микроскопа (Leica, Германия). Окрашенные препараты заключали в пропилгаллат по стандартной методике. Морфологические изменения после дифференцировок оценивали визуально с помощью микроскопа.

Окрашивание МСК крыс флуорохромом РКН26 проводили после второго пересева культуры. Клетки наращивали до плотного монослоя, далее в среду культивирования добавляли РКН26 (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл на 48 ч. Затем клетки промывали раствором PBS и культивировали в среде без РКН26 не менее 4 ч. Окрашенные МСК снимали с чашек раствором трипсина и ЭДТА, центрифугировали при 450 *g* в течение 10 мин. Полученный осадок дважды промывали PBS и суспендировали в питательной среде без сыворотки ( $\alpha$ MEM +100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина) с финальной концентрацией  $5 \cdot 10^6$  клеток в 100 мкл. Эффективность окрашивания МСК оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica (Leica, Германия).

Введение МСК животным. 5 млн МСК в 100 мкл среды  $\alpha$ MEM вводили животным в хвостовую вену. Инъекцию клеток проводили через 3 сут после СМАо.

Группы экспериментальных животных. 1. Группа ложнооперированных животных: проводили всю вышеизложенную процедуру по моделированию инсульта, за исключением электрокоагуляции средней мозговой артерии ( $n = 15$ ). 2. Группа контроля: моделировали инсульт без каких-либо дополнительных воздействий ( $n = 15$ ). 3. Группа клеточной терапии: животным проводили трансплантацию МСК в хвостовую вену через 3 сут после СМАо ( $n = 15$ ). Всех животных декапитировали на 42-е сут после СМАо.

Поведенческое и неврологическое тестирование проводили за 1—2 сут до и в течение 6 нед после операции. В данных экспериментах приняло участие по 15 животных из каждой группы.

Водный лабиринт 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 и проводили в течение 6 нед.

Открытое поле. Установка имела площадь пола 1 м<sup>2</sup>, высоту стенок 50 см (материал — пластиковые панели синего цвета). Пол расчерчен квадратами со стороной 20 см. Наблюдения за активностью животного продолжали в течение 10 мин. Для каждой минуты подсчитывали количество пересечений линий разметки и количество стоек, фиксировали время, затраченное животным на груминг, и продолжительность отсутствия выраженной активности.

Блок тестов для оценки неврологического статуса состоял из 6 тестов (спонтанная активность; симметричность использования конечностей при движении; симметричность использования передних конечностей, когда животное имело опору только на них; симметричность использования конечностей для схватывания сетчатой поверхности; реакция на раздражение проприорецепторов туловища; реакция на прикосновение к вибротактильному датчику) и оценивался по 18-балльной шкале. Итоговая оценка формировалась как сумма баллов (от 0 до 3) для каждого из 6 тестов.

Статистическая обработка данных была проведена с помощью программы Statistica (Stat Soft Inc.).

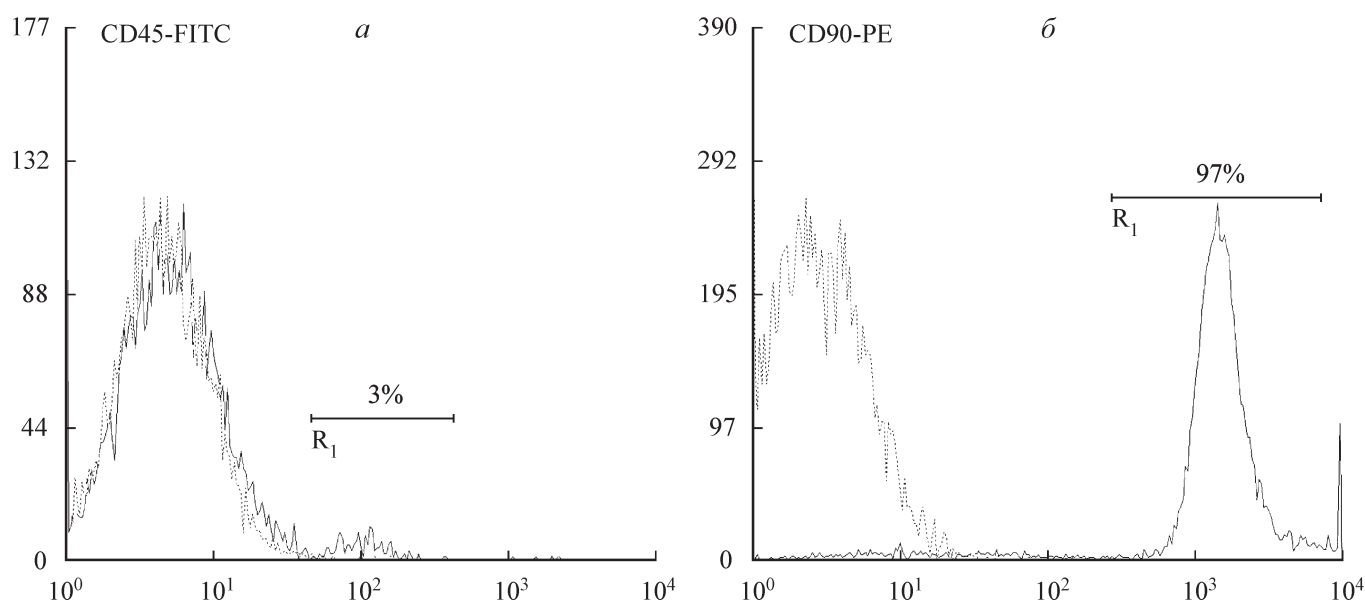


Рис. 2. Распределение интенсивности свечения клеток, выделенных из костного мозга крыс, меченных антителами против негативного (CD45, *a*) и позитивного (CD90, *б*) маркеров мезенхимных стволовых клеток (МСК).

Проточная цитометрия на 2-м пассаже после выделения. По горизонтали — интенсивность свечения клеток, экспрессирующих CD90 (*a*) или CD45 (*б*), окрашенных антителами, конъюгированными с PE или FITC соответственно; по вертикали — число клеток. Пик 1 — неокрашенные клетки (контроль), пик 2 — окрашенные клетки. *a* — 3% клеток экспрессируют CD45 и относятся к гематопоэтическому ряду; *б* — 97% клеток популяции экспрессируют CD90 и являются МСК; штриховая линия — неокрашенные клетки.

Фиксация тканей головного мозга. Животных подвергали прижизненной фиксации — перфузии через левый желудочек сердца 4%-ным раствором параформальдегида в PBS. Затем у них непосредственно после декапитации извлекали головной мозг и вырезали сегмент, включающий в себя 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  $-70^{\circ}\text{C}$ .

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 микроскопе Leica (Leica, Германия).

Гистологический анализ был проведен у 7 животных из каждой группы. Определяли площадь некроза в левом полушарии головного мозга, поврежденные структуры мозга и количество сосудов в зоне, пограничной с областью повреждения. Структуры мозга идентифицировали по атласу (Paxinos, Watson, 1998).

Количественная оценка васкуляризации зоны повреждения. Подсчет сосудов диаметром до 15 мкм проводили 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 (рис. 1). Кроме того, были проанализированы зоны первичной и вторичной двига-

тельной коры в обоих полушариях на площади 100 мкм<sup>2</sup>. Полученные количественные данные были обработаны с помощью программы Statistica (Stat Soft Inc.).

## Результаты

Фенотипирование и дифференцировка МСК *in vitro*. Анализ культуры МСК после второго пассажа методом проточной цитофлуориметрии показал, что она состояла из CD45<sup>+</sup>-клеток (клеток гематопоэтического ряда; 3%) и CD90<sup>+</sup>-клеток (собственно МСК; 97%) (рис. 2). Полученные клетки были способны дифференцироваться в остеогенном, адипоцитарном и хондрогенном направлениях и в направлении нейронального ряда. В наших экспериментах в нейрональном направлении дифференцировалось около 70% МСК. Результаты фенотипирования полученных производных направленной дифференцировки МСК представлены на рис. 3. Видно, что дифференцированные клетки окрашивались антителами против MOBP, NeuN и Tau, но не окрашивались антителами против GFAP.

Через 6 нед после введения недифференцированных флуоресцентно меченных МСК в хвостовую вену детекция на криопрепаратах мозга животных группы 3 показала, что единичные окрашенные клетки локализовались вблизи эпендимного слоя третьего и боковых желудочков (рис. 4, *a*). У одного животного меченые клетки в небольшом количестве были обнаружены в хвостовом ядре. Они располагались вокруг нескольких сосудов, в непосредственной близости от стенки (рис. 4, *б*).

Повреждения мозговой ткани после СМАО. При гистологическом анализе через 6 нед после СМАО у ложнопериоперированных животных из группы 1 были выявлены спайки мозговой оболочки и незначительные повреждения поверхности неокортекса, связан-

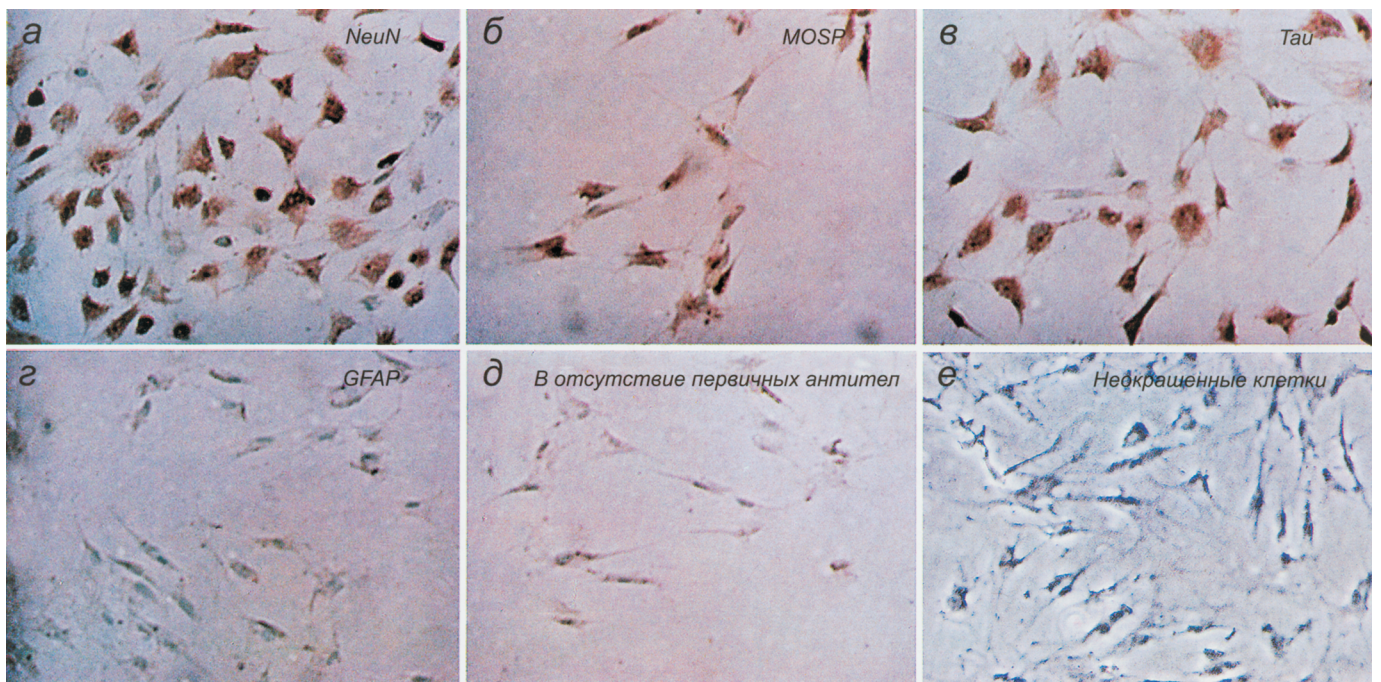


Рис. 3. Дифференцированные *in vitro* в нейрональном направлении МСК крысы.

Иммуноцитохимическая реакция на специфический ядерный белок нейронов (NeuN, *a*), миелин-олигодендроцит-специфический белок (MOSP, *б*), нейрофибрилярный белок отростков нервных клеток (Tau, *в*) и глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP, *г*), *д* — контроль в отсутствие первичных антител, *е* — неокрашенные клетки. Об. 40×.

ные со сдавливанием тканей во время оперативного вмешательства (рис. 5, *a*, *г*).

У животных группы 2 (контроль) были отмечены значительные дефекты неокортекса и наружной капсулы мозга. Отсутствовала примерно третья часть первичной и вторичной соматосенсорной и более половины инсулярной и пириформной коры. Гибнущие нервные клетки в мозге были выявлены вплоть до стенки бокового желу-

дочка. В этих участках мозга развивался глиоз. Была повреждена часть хвостового ядра. Морфологически неизменные нейроны наблюдали лишь на значительном расстоянии от границы повреждения (рис. 5, *б*, *д*).

У животных из группы 3 (трансплантация МСК) дефект неокортекса был значительно меньше и ограничивался небольшой частью сенсомоторной и инсулярной коры, причем повреждения не выходили за пределы нео-

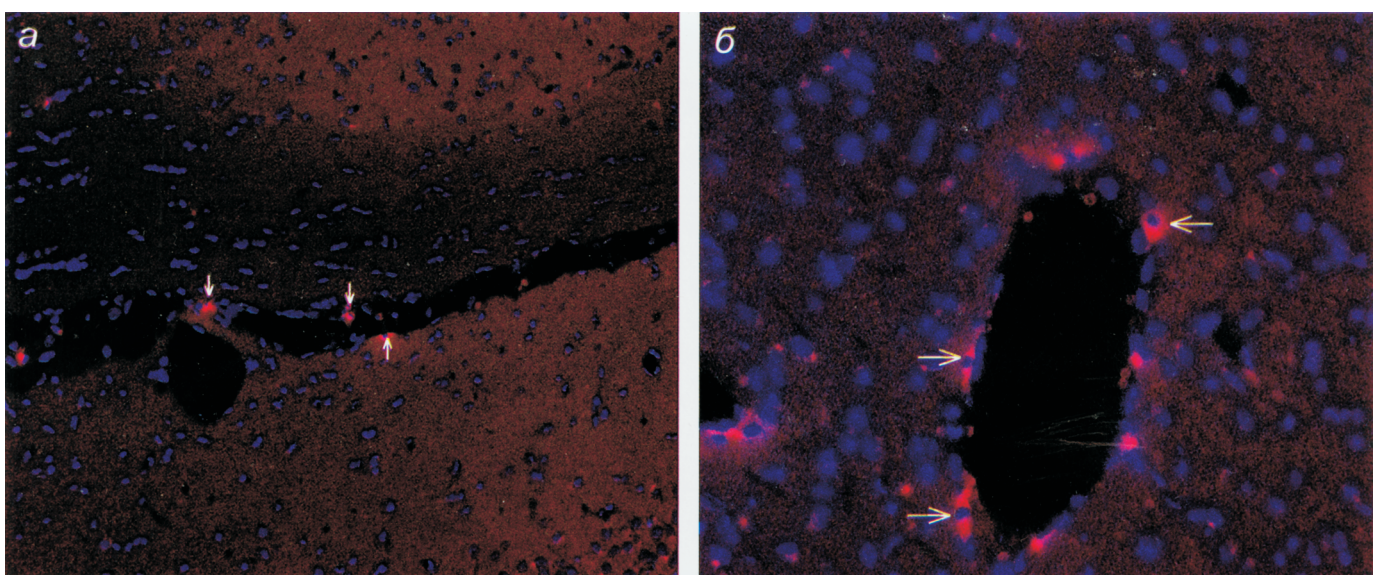


Рис. 4. Распределение флуоресцентно меченных МСК (стрелки) в поврежденном головном мозге животных через 6 нед после окклюзии средней мозговой артерии (СМАо).

*a* — флуоресцентно меченные МСК в боковом желудочке поврежденного полушария, об. 20×; *б* — флуоресцентно меченные МСК вблизи сосуда в хвостатом ядре поврежденного полушария, об. 40×; криосрезы, окраска ДНК DAPI.



Рис. 5. Дефект тканей головного мозга через 6 нед после СМАО.

*a—в* — гистологические препараты, окраска по Нислю; *з—е* — схематическое изображение тех же срезов мозга. *a, з* — группа 1 (ложнооперированные животные); *б, д* — группа 2 (контроль); *в, е* — группа 3 (трансплантация МСК).

кортекса. У части животных была сохранена наружная капсула. В неокортексе на границе с дефектом ткани были выявлены зоны с сохранными или мало измененными нейронами, чего не было у животных из группы 2. Нервные клетки, хотя и измененные морфологически (гиперхромные), наблюдали на самой границе с повреждением ткани мозга. Была выявлена хорошо сформированная капсула на границе краевого дефекта, состоящая из 3—6 рядов клеток, среди которых были астроциты, менингоциты и фибробласты. Сохранены нейроны хвостатого ядра. Во всех структурах вблизи границы повреждения зарегистрировано большое количество сосудов (рис. 5, *в, е*).

Результаты измерения морфометрических параметров — площади дефекта мозга и количества сосудов в пограничной с повреждением зоны — представлены на рис. 6 и 7 соответственно. Площадь дефекта мозга после СМАО у животных группы 3 была примерно в 1.3 раза меньше, чем у животных группы 2. Количество сосудов в левом полушарии по границе повреждения (рис. 1) в неокортексе и хвостатом ядре в группе 2 было примерно таким же, как и у животных группы 1, а в группе 3 — примерно в 2 раза больше. Получен еще один весьма интересный результат — примерно вдвое относительно уровня интактных животных увеличилось количество сосудов в неокортексе и хвостатом

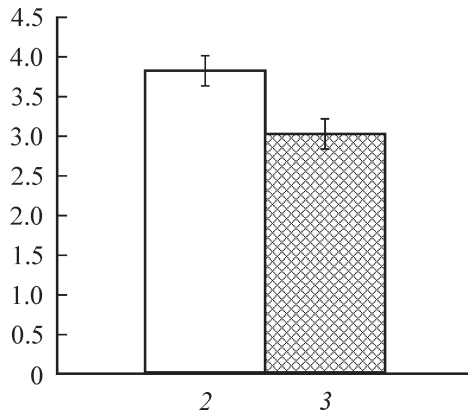


Рис. 6. Относительная площадь дефекта ткани головного мозга животных из контрольной группы (2) и группы клеточной терапии (3).

ядре правого полушария. На двух других участках интактной ткани мозга, удаленных от зоны некроза (первичная и вторичная двигательная кора в обоих полушариях), количество сосудов было таким же, как у животных группы 1.

Предварительно проведенное у тех же животных поведенческое и неврологическое тестирование продемонстрировало положительное влияние трансплантации МСК на весь организм инсультных животных в целом. Результаты тестирования в водном лабиринте Морриса представлены на рис. 8, а; в «открытом поле» — на рис. 8, в, г. Видно, что когнитивная функция и ориентировочно-исследовательское поведение восстанавливались практически до исходного уровня через 2 нед после СМАО, при условии что была проведена трансплантация МСК (группа 3). При этом у контрольных животных (группа 2) в течение всего периода наблюдения (5 нед) поведенческий статус не восстановил-

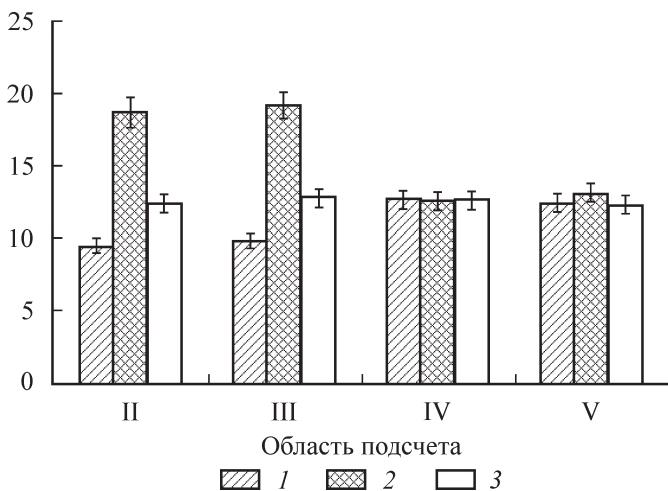


Рис. 7. Гистограмма распределения количества сосудов в разных зонах головного мозга у животных 1, 2 и 3-й групп (согласно рис. 1).

II — пограничная с поврежденной зона, III — область подсчета сосудов в неповрежденном (контралатеральном) полушарии, IV — удаленная от повреждения зона (двигательная кора) поврежденного (ипсилатерального) полушария, V — удаленная от повреждения зона (двигательная кора) неповрежденного (контралатерального) полушария; 1 — контроль, 2 — опыт, 3 — ложная операция.

ся. Результаты блока неврологических испытаний представлены на рис. 8, б. В группе 3 восстановление неврологического статуса до уровня ложнопериоперированных животных было зарегистрировано через 3 нед после СМАО. Через 6 нед общая оценка по 6 тестам в контрольной группе была примерно в 1.2 раза ниже, чем в группах 1 и 3.

## Обсуждение

Клеточный материал, применяемый в качестве терапевтического средства при лечении ишемического инсульта, должен иметь точную характеристику: фенотип и дифференцировочный потенциал. При выборе трансплантата следует учитывать, что для лечения человека предпочтительнее использовать аутологичный клеточный материал. Этим требованиям полностью удовлетворяют МСК. В представленном исследовании методом проточной цитофлуориметрии было установлено, что клеточная культура, подготовленная для трансплантации, состояла на 3 % из CD45<sup>+</sup>-клеток (клеток гемопоэтического ряда) и на 97 % из CD90<sup>+</sup>-клеток (собственно МСК). Ранее было показано, что МСК, выделенные из костного мозга крыс, были способны дифференцироваться в остеогенном, адипоцитарном, хондрогенном и кардиомиоцитарном направлениях (Кругляков и др., 2004). В данной работе была показана возможность дифференцировки МСК в нейрональном направлении *in vitro* (рис. 3). При добавлении к культуре МСК нейротрофина-3 мы получили 70 % клеток, которые окрашивались антителами против маркеров нейрональной дифференцировки, но не окрашивались антителами против маркеров глиальной дифференцировки. Следует отметить, что 30 % клеток не окрашивались антителами ни к NeuN, Tau и MOSP, ни к GFAP. Можно предположить, что использование в качестве индуктора дифференцировки нейротрофина-3 в высокой концентрации инициировало дифференцировку МСК только в нейрональном направлении. Таким образом, мы подтвердили чистоту популяции используемых клеток и сохранение ими в процессе культивирования нейронального дифференцировочного потенциала. В качестве агентов клеточной терапии ишемического инсульта мы предлагаем использовать недифференцированные МСК.

Преимущество применения недифференцированных МСК связано с возможностью трансплантировать такие клетки в венозную кровь. Это позволяет избежать тяжелой операции под общим наркозом, которая необходима для введения клеток непосредственно в мозг. Экспериментально доказано, что введенные в кровотоки МСК через несколько дней приходили в место тканевого повреждения. Этот феномен был зарегистрирован на модели инфаркта миокарда (Кругляков и др., 2004, 2005). Было установлено, что через 2 сут после введения в хвостовую вену меченые клетки диффузно распределялись по зоне инфаркта и пограничной области в сердцах опытных животных. В работах Чоппа с коллегами МСК, помеченные бромдезоксиуридином, были введены интраартериально крысам на следующие сутки после СМАО (Li et al., 2001). Через 14 сут МСК были детектированы в зоне ишемии головного мозга. В представленной работе мы получили совершенно иную картину распределения меченых клеток по тканям мозга при введении МСК в хвостовую вену через 3 сут после СМАО (рис. 4, а). В основном единичные флуоресцентно окра-

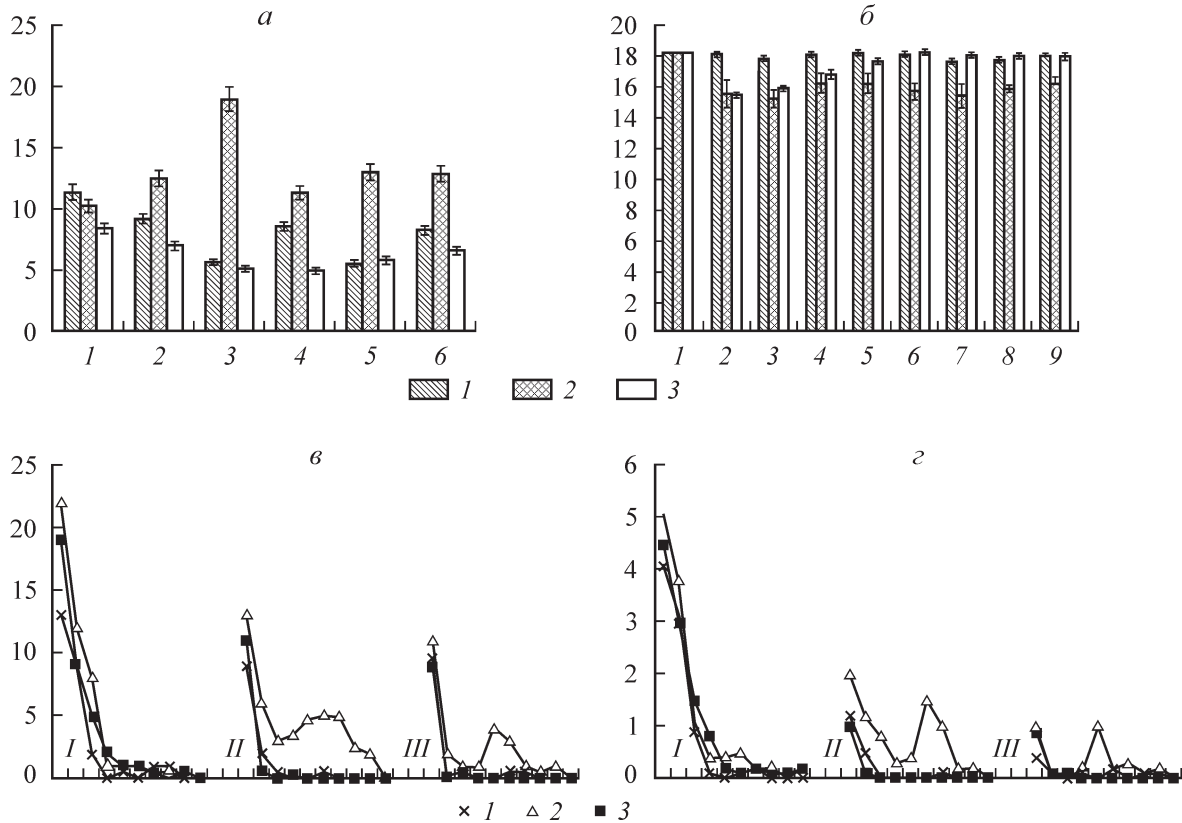


Рис. 8. Результаты поведенческого и неврологического тестирования крыс после СМАо.

*a* — тестирование в водном лабиринте Морриса в течение 6-й нед после СМАо; *по горизонтали* — время тестирования, сут; *по вертикали* — время поиска скрытой платформы, с. *б* — среднее значение суммарного количества баллов блока тестов (*по вертикали*) для оценки неврологических нарушений; *по горизонтали* — временные точки тестирования: *I* — 1 сут до СМАо; *2, 3* — соответственно через 1 и 3 сут после СМАо; *4–9* — соответственно через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 нед после СМАо. *в, з* — соответственно средние значения параметра «количество пересеченных квадратов» и параметра «количество стоек» в тесте «открытое поле» в каждую из 10 мин наблюдения в трех сессиях (*I* — 1 сут до СМАо; *II, III* — соответственно через 2 и 5 нед после СМАо); *по горизонтали* — время тестирования (три сессии по 10 мин); *по вертикали* — количество пересеченных квадратов (*в*) или стоек (*з*) за 1 мин.

шенные клетки были обнаружены вблизи эпендимного слоя желудочков. Мы полагаем, что такое распределение МСК в головном мозге связано со сроком введения этих клеток и особенностями использованной модели инсульта. Мы проводили трансплантацию МСК через 3 сут, так как именно в это время погибало наибольшее число оперированных животных. Как известно из литературы, СМАо приводит к нарушению целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) (Jiang et al., 2005; Lenzser et al., 2005). Максимальная проницаемость ГЭБ была зарегистрирована через 2–4 ч после окклюзии. Через 5 ч количество красящего вещества синего Эванса, с помощью которого была исследована проницаемость ГЭБ, в тканях мозга уменьшалось. В течение последующих 2 сут диффузия синего Эванса из крови в ткани мозга постепенно понижалась (Belayev et al., 1996). Во всех указанных выше работах СМАо была проведена с последующей реперфузией. Имеются данные о том, что реперфузия усиливает проницаемость ГЭБ (Yang, Betz, 1994). Учитывая отсутствие реперфузии в нашей работе, мы можем предположить, что через 3 сут целостность ГЭБ была полностью восстановлена. У нас нет каких-либо определенных предположений о том, каким образом МСК могли попасть в желудочки головного мозга. К настоящему моменту практически ничего не известно о перемещении МСК по организму, в том числе и о возможности этих клеток преодолевать ГЭБ и(или) гематоливорный барьер.

Несмотря на минорное количество трансплантированных МСК в тканях мозга после инсульта и их специфическое распределение в желудочках, в нашей работе были получены статистически значимые положительные изменения в динамике восстановления поведенческого и неврологического статусов животных и морфологии тканей мозга.

Животные из группы 3 достаточно быстро (через 2–3 нед после СМАо) проходили проверочные тесты на уровне животных из группы 1. У них значительно снижался уровень тревожности, восстанавливался обычный тип поведения в «открытом поле», улучшалось запоминание места нахождения и расположения окружающих предметов, восстанавливались симметричность реакций на раздражение левой и правой сторон туловища и использование конечностей. Мы полагаем, что это связано с уменьшением площади дефекта мозга (рис. 5) и сохранением определенных мозговых структур (рис. 5, в, е). Морфологический анализ показал, что у животных группы 3 по сравнению с контролем была практически полностью сохранена пириформная кора, которая принимает участие в формировании эмоционального статуса животного (агрессивность поведения, ярость и страх) (Вартанян, 1999). В группе 3 также сохранялись нейроны хвостатого ядра — структуры, играющей важную роль в регуляции движений и сенсорной координации. Тест «водный лабиринт Морриса» показал, что у этих животных улучшалась кратковременная и долгосрочная



память. Мы не можем связать это наблюдение с полученными морфологическими данными. Как известно, за формирование и временное хранение следов памяти отвечают гиппокамп, гипоталамус, миндалина и медиальная височная кора (Костюк, 1997). В наших экспериментах СМАо не приводила к морфологическим изменениям в этих структурах у животных всех экспериментальных групп. Однако разница в сохранении когнитивной функции у животных групп 2 и 3 была статистически достоверна.

Мы можем предположить, что существует несколько причин сохранения тканей мозга после СМАо при трансплантации МСК. Находящиеся в мозге МСК могли секретировать такие факторы, как BDNF, NGF и bFGF (Chen et al., 2002), которые предотвращали апоптоз и повышали выживаемость нейронов в пенумбре. И действительно, в зоне 30 мкм от границы дефекта у животных группы 3 мы практически не обнаружили клеток с пикнотическими ядрами. В то же время в этой тканевой области были выявлены морфологически неизмененные нейроны, чего не наблюдали в аналогичных участках мозга у контрольных животных. Сохранению и поддержанию функционального состояния тканей мозга способствовала активация ангиогенеза в пограничной с повреждением зоне. Количество сосудов у животных группы 3 было примерно в 2 раза больше, чем в контроле (рис. 7). Эти данные соответствуют результатам, опубликованным ранее (Кругляков и др., 2004, 2005; Chen et al., 2002, 2003b). Помимо этого, мы зарегистрировали значительное увеличение количества сосудов в симметричных участках мозга контралатерального полушария. Этот феномен не описан в научной литературе. Он выявлялся только в животных, которым были введены МСК. Мы пока не можем дать исчерпывающее объяснение полученным результатам. Этому будет посвящено отдельное экспериментальное исследование.

Кроме того, можно предположить, что МСК, трансплантированные в венозную кровь, вне мозга активировали процессы, в том числе и выброс эндогенных стволовых клеток, направленные на репарацию полученного повреждения. Исследование механизмов воздействия МСК на организм после СМАо требует дальнейшей огромной экспериментальной работы.

Итак, даже без объяснения механизмов воздействия мы можем констатировать, что МСК оказывали нейропротекторное действие на клетки мозга после инсульта, активировали ангиогенез, способствуя тем самым восстановлению кровоснабжения ишемизированной ткани. Возможно, что более ранняя трансплантация МСК, при которой в мозг сможет попасть гораздо большее количество клеток, позволит получить более выраженный терапевтический эффект. Влияние сроков трансплантации на состояние тканей мозга будет исследовано нами в ближайшее время.

Авторы выражают глубокую благодарность Е. Р. Галинской за предоставленную возможность использования технической базы.

#### Список литературы

- Вартанян И. А. 1999. Физиология сенсорных систем. СПб.: Лань. 224 с.  
Костюк П. Г. 1997. Физиология центральной нервной системы. М.: Изд-во МГУ. 530 с.

Кругляков П. В., Соколова И. Б., Аминова Х. К., Некрасова Н. Н., Вийде 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.

Кругляков П. В., Соколова И. Б., Аминова Х. К., Некрасова Н. Н., Вийде С. В., Чередниченко Н. Н., Зарицкий А. Ю., Семернин Е. Н., Кислякова Т. В., Польшцев Д. Г. 2005. Влияние сроков трансплантации мезенхимных стволовых клеток на репарацию сердечной мышцы крыс после инфаркта. Цитология. 47 (5): 404—416.

Belayev 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.

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.

Borlongan C., Tajima Y., Trojanowski J., Lee V., Sanberg P. 1998. Cerebral ischemia and CNS transplantation: differential effects of grafted fetal rat striatal cell and human neurons derived from a cronal cell line. Neuroreport. 9: 3703—3709.

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 in femal rat. J. Neurosci. Res. 73: 778—786.

Chen J., Li Yi, Wang L., Katakowski M., Gautman 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., Li Y., Wang L., Zhang Z., Lu D., Lu M., Chopp M. 2001. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. Stroke. 32: 1005—1011.

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.

Chen X., Li Yi, Wang L., Katakowski M., Zhang L., Chen J., Xu Y., Lu M., Gautam S. C., Chopp M. 2002. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. Neuropathology. 22: 275—279.

Deans R., Moseley A. 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp. Hematol. 28: 875—884.

Deng W., Obrocka M., Fischer I., Prockop D. J. 2001. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 282: 148—152.

Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science. 279: 1528—1530.

Fukuda K. 2001. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. Artif. Organs. 25: 187—193.

Jaiswal R., Jaiswal N., Bruder S., Mbalaviele G., Marchak D., Pittenger M. 2000. Adult human mesenchymal stem cells differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 275: 9645—9652.

Jiang Q., Ewing J., Ding G., Zhang L., Zhang Z., Li L., Whittton 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.

Kang S., Lee D., Bae Y., Kim H., Baik S., Jung J. 2003. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. Exp. Neurol. 183: 355—366.

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.

Li Y., Chen J., Chen X., Wang L., Gautman S. C., Xu Y., Katakowski M., Zhang L., Lu M., Janakiraman N., Chopp M. 2002. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat. *Neurology.* 59 : 514—523.

Li Y., Chen J., Wang L., Lu M., Chopp M. 2001. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology.* 56 : 1666—1672.

Majumdar M. K., Thiede M. A., Mosca J. D., Moorman M., Gerson S. L. 1998. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 176 : 57—66.

Mareschi K., Biasin E., Piacibello W., Aglietta M., Madon E., Faioli F. 2001. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica.* 86 : 1099—1100.

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.

Park K. I. 2000. Transplantation of neural stem cells: cellular and gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury. *Yonsei Med. J.* 41 : 825—835.

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

Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284 : 143—147.

Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Steadford T., Willing A., Freeman T., Saporta S., Janssen W., Patel N., Cooper D., Sanberg P. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp. Neurol.* 164 : 247—256.

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

Vendrame M., Cassady J., Newcomb J., Butler T., Pennypacker K. R., Zigova T., Sanberg C. D., Sanberg P. R., Willing A. E. 2004. Infusion of human umbilical cord blood cell in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke.* 35 : 2390—2395.

Vogel W., Grunebach F., Messam C. A., Kanz L., Brugger W., Buhning H.-J. 2003. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica.* 88 : 126—133.

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.

Yang G., Betz A. 1994. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 25 : 1658—1664.

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

Поступила 17 V 2006

#### MESENCHYMAL STEM CELLS-BASED THERAPY OF BRAIN ISCHEMIC STROKE IN RAT

N. N. Zinkova,<sup>1</sup> E. G. Gilerovitch,<sup>2</sup> I. B. Sokolova,<sup>1</sup> S. K. Vijde,<sup>1</sup> E. V. Shvedova,<sup>1</sup> G. V. Alexandrov,<sup>1</sup>  
P. V. Kruglyakov,<sup>1</sup> Kislyakova T. V.,<sup>1</sup> D. G. Polyntsev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> «Trans-Technologies», Ltd., <sup>2</sup> State Institute of Experimental Medicine RAS, St. Petersburg

Mesenchymal stem cells (MSCs) — based therapy is a promising modern attempt to improve the recovery after stroke. Experiments were carried out on inbred Wistar-Kyoto rats. MSCs were isolated, expanded in culture and labeled with vital fluorescent dye PKH-26. Animals were subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAO), followed by injection of  $5 \cdot 10^6$  rat MSCs into the tail vein 3 days after MCAO. Control group animals received PBS injection (negative control). Therapy results were estimated by the following parameters: behavioral and neurological testing, the brain injury area, the state of damaged region «border» zone and the vessels quantity in the «border» area. It was shown that control group animals (PBS injection) did not restore their initial behavioral and neurological state, while the experimental group animals (MSCs injection) showed the same parameters as intact rats at 2—3 weeks after MCAO. The size of the damaged region in the control group was approximately 1.5 as large as in the experimental group. The damage in the experimental group was limited to neocortex; caudate nucleus, capsula externa and piriform cortex remained uninjured. Small vessels quantity in the «border» regions was twice higher compared to control group and was approximately equal to an intact brain vessel number. Moreover, it was shown for the first time that after MSCs transplantation the vessels quantity in the neocortex and caudate putamen of contralateral hemisphere was twice as much as in control. We demonstrated that the MSCs transplantation definitely exerted a positive influence upon the brain tissue repair after stroke.

Key words: mesenchymal stem cells, stroke, capillaries, size of the brain damage region.