

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС

© *И. Б. Соколова,^{1,*} О. Р. Федотова,² Е. Г. Гилерович,² И. В. Сергеев,¹
С. В. Анисимов,^{3,4} М. В. Пузанов,³ Д. П. Дворецкий¹*

¹ *Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН,*

² *Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН,*

³ *Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова Министерства здравоохранения РФ*

и ⁴ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

** электронный адрес: sib@kolt.infran.ru*

С помощью телевизионного метода прижизненной микроскопии и иммуногистохимического анализа проведено исследование влияния интрацеребральной трансплантации сингенных мезенхимных стволовых клеток (МСК) на структуру коры головного мозга и микроциркуляцию в пиальной оболочке старых крыс. В установке «Открытое поле» исследовано влияние трансплантации МСК на ориентировочно-исследовательское поведение старых животных. Показано, что после введения МСК плотность микрососудистой сети пиальной оболочки увеличилась примерно в 1.9 раза по сравнению с интактными животными той же возрастной категории. Плотность артериолярного участка микрососудистой сети пиальной оболочки возросла в среднем в 2 раза. Реактивность вновь образованных артериол была примерно такой же, как и нативных микрососудов. Сама процедура интрацеребральной трансплантации травмировала кору головного мозга крыс, но не влияла на микроциркуляцию в контралатеральном полушарии. Интрацеребральная трансплантация МСК не способствовала улучшению локомоторного поведения и эмоционального состояния, увеличению ориентировочно-исследовательской активности старых животных.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, интрацеребральная трансплантация, микроциркуляция, артериолы, поведение.

Принятые сокращения: ГФКБ — глиальный фибриллярный кислый белок, МСК — мезенхимные стволовые клетки, ОП — установка «Открытое поле», АСh — ацетилхолин, NA — норадреналин, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

По мере старения человека изменяются его поведение и образ жизни: ухудшается память и координация, нарушается осанка, снижается двигательная активность, увеличивается время принятия решения, нарастает тревожность и т. д. В определенной мере возрастные изменения могут быть связаны с нарушениями микроциркуляции в головном мозге. К настоящему времени доказано, что при старении в ткани мозга увеличивается расстояние между микрососудами (Riddle et al., 2003; Villena et al., 2003; Shao et al., 2010; Brown, Thore, 2011). Многие авторы отмечают возрастные изменения в строении сосудистой стенки мозговых артериол — разрастание холестериновых бляшек и отложение β -амилоидного белка, в результате чего происходят сужение этих микрососудов, ухудшение эластичности их стенки и уменьшение диффузии кислорода из крови в ткань (Borrás et al., 1999; Thore et al., 2007). Из-за недостатка кровоснабжения в головном мозге формируются ишемизированные зоны, что способствует развитию таких заболеваний, как дисциркуляторная энцефалопатия.

Применение мезенхимных стволовых клеток (МСК) для коррекции микроциркуляторных нарушений — современный и перспективный метод лечения, который, однако, требует экспериментальной разработки и клинических исследований. К настоящему времени показано, что применение МСК после ишемического инсульта и травм головного мозга в эксперименте способствовало активации ангиогенеза в ткани мозга, пограничной с местом повреждения (Chen et al., 2003; Mahmood et al., 2004; Соколова и др., 2007; Wu et al., 2008). После трансплантации МСК у экспериментальных животных восстанавливались когнитивные функции и ориентировочно-исследовательское поведение (Соколова и др., 2006, 2009, 2011; Pavlichenko et al., 2008).

Целью представленного исследования являлась оценка эффективности применения интрацеребральной трансплантации МСК для коррекции возрастных изменений в микроциркуляции головного мозга и ориентировочно-исследовательском поведении крыс.

Материал и методика

Эксперименты проведены на самцах крыс линии Вистар-Киото в возрасте 2—3 и 22—24 мес ($n = 83$). Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Исследования проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1986).

МСК для трансплантации получали из костного мозга сингенных крыс. Животных умерщвляли путем инъекции летальной дозы хлоралгидрата (доза для эвтаназии — 1.14 г/кг). У крыс удаляли задние и передние лапы, на лгду из конечностей извлекали бедренные, плечевые и большие берцовые кости, которые очищали от мышц и сухожилий. В стерильных условиях с костей удаляли эпифизы, костный мозг вымывали фосфатно-солевым буферным раствором (Биолот, Россия), содержащим 5 % антибиотика (пенициллин/стрептомицин; Invitrogen, США). Цельный костный мозг отмывали от буфера, осадок ресуспендировали в культуральной среде α -MEM (ПанЭко, Россия), содержащей 1 % антибиотика, 1 % L-глутамина (Invitrogen, США) и 10 % фетальной коровьей сыворотки (HyClon, США). Полученную суспензию высевали на культуральные матрицы (пассаж P_0) и инкубировали в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO_2). Через 48 ч гетерогенную культуру клеток костного мозга дважды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором и проводили смену культуральной среды. В дальнейшем 50 % α -MEM заменяли каждые 48 ч. Пассаж проводили до достижения культуры 90—90 % конfluence, после чего клетки мобилизовали 0.05%-ным раствором трипсина и высевали на новые матрицы (P_1). Для трансплантации использовали клетки, находящиеся на 3-м пассаже. При этом часть клеток использовали для определения их физиологических характеристик.

Анализ иммунофенотипа МСК проводили на проточном цитофлуориметре Guava HT easy Cyte 8 Flow Cytometry System (Millipore, США). Клетки окрашивали антителами против CD45, CD44, CD106 и CD90, а также против изотипического контрольного иммуноглобулина (IgG) (Millipore, США). Анализ данных проводили с использованием программного комплекса GUAVASOFT 2.2.3 (Millipore, США).

Для оценки динамики пролиферативной активности МСК рассчитывали время удвоения колоний и кумулятивных делений. На 3-м пассаже определяли количество колониеобразующих единиц в культуре (КОЕ-Ф) и оценивали способность клеток к адипоцитарной и остеогенной дифференцировке.

Время удвоения колоний рассчитывали по формуле

$$T = \frac{(T_2 - T_1)}{(\lg N_2 - \lg N_1) \cdot 3.32},$$

где $(T_2 - T_1)$ — срок культивирования (дни), N_2 — количество клеток, снятых в конце пассажа, N_1 — количество клеток, посеянных в начале пассажа.

Время удвоения колоний рассчитывали по формуле

$$N = \frac{\lg N_2 - \lg N_1}{\lg 2},$$

где N_2 — количество клеток, снятых в конце пассажа, N_1 — количество клеток, посеянных в начале пассажа.

КОЕ-Ф рассчитывали методом серийного разведения. В 96-луночном планшете высевали клетки в концентрации от 100 до 0.8 клетки на лунку. Через 14 сут подсчитывали количество лунок, в которых образовались колонии МСК. Далее в положительных лунках запускали адипоцитарную и остеогенную дифференцировки. Для адипоцитарной дифференцировки в среду добавляли 0.1 % дексаметазона, 0.1 % инсулина и 0.5 % изобутилметилксантина. Культивирование продолжалось в течение 14 сут. Для остеогенной дифференцировки в среду добавляли 0.1 % дексаметазона, 0.1 % аскорбиновой кислоты и 1 % глицерофосфата и культивировали 21 сут. По окончании клетки отмывали от среды, фиксировали этанолом и окрашивали ализариновым красным (остеогенная дифференцировка) или масляным красным (адипоцитарная дифференцировка), подсчитывая количество лунок с дифференцировавшимися клетками.

Репликативное старение культуры определяли по количеству клеток, экспрессирующих β -галактозидазу. Для этого клетки высевали на 24-луночный планшет в концентрации 10 тыс. клеток на лунку. После достижения культурой конfluence (48—60 ч) клетки фиксировали и окрашивали с использованием коммерческого набора Senescence β -Galactosidase Staining Kit, (Sigma, США) по протоколу фирмы-производителя. Далее препарат окрашивали красителем DAPI для определения общего количества клеток. Микроскопический анализ проводили на флуоресцентном микроскопе.

Были сформированы следующие группы экспериментальных животных: № 1 — интактные животные в возрасте 2—3 мес (молодые), $n = 20$; № 2 — интактные животные в возрасте 22—24 мес (старые), $n = 30$; № 3 — животные в возрасте 22—24 мес, которым за 3 нед до поведенческого тестирования и прижизненного исследования микрососудистого русла была проведена интрацеребральная трансплантация питательной среды культивирования стволовых клеток α -MEM (контроль), $n = 6$; № 4 — животные в возрасте 22—24 мес, которым за 3 нед до поведенческого тестирования и прижизненного исследования микрососудистого русла была проведена интрацеребральная трансплантация МСК, $n = 11$; № 5 — животные в возрасте 22—24 мес, которым за 1 год (в возрасте 12 мес) до поведенческого тестирования и прижизненного исследования микрососудистого русла была проведена интрацеребральная трансплантация МСК, $n = 16$.

Для проведения интрацеребральной трансплантации и крыс наркотизировали золетилом (20 мг/кг) (Virbac, Франция) интраперитонеально. В теменной области черепа поочередно над правым или левым полушарием с помощью бормашин высверливали отверстие диаметром 1 мм, не повреждая твердую мозговую оболочку. Инсулиновым шприцом производили инъекции исследуемых веществ в кору головного мозга на глубину не более 2 мм. После этого кожу на голове животного ушивали.

Поведенческое тестирование животных в возрасте 2—3 и 22—24 мес проводили в установке «Открытое поле» (ОП). Установка представляет собой круглую площадку ($d = 80$ см), ограниченную непрозрачными бортами высотой 30 см, с 16 равномерно расположенными норками ($d = 3$ см). Животное помещали в центр поля и в течение 3 мин регистрировали длительность и последовательность всех поведенческих актов. Идентифика-

цию отдельных поведенческих актов проводили на основании классификации индивидуального поведения в ОП: «локомоция» — поступательное движение тела в горизонтальной плоскости; «обнюхивание» — принюхивание; «движение на месте» — повороты головы без существенных изменений координат корпуса в горизонтальной и вертикальной плоскостях; «груминг» — облизывание тела; «стойка с упором» — стойка на задних лапах с опорой на борта установки; «вертикальная стойка» — стойка на задних лапах в отдалении от бортов; «норка» — заглядывание в норку; «сидит» — неподвижность животного, обычно в позе сидя с подогнутыми конечностями и сгорбленной спиной (Петров 1990).

У животных оценивали локомоторное поведение (количество и длительность акта «локомоция»), ориентировочно-исследовательскую активность (акты «норка», «локомоция», «вертикальная стойка», «стойка с упором», «движение на месте», «обнюхивание»), эмоциональное поведение (акты «груминг», «движение на месте», «вертикальная стойка»); неспецифическую активацию (изменение суммарного количества актов) или подавление поведения (достоверное изменение количества и длительности актов). Регистрацию количества, длительностей и последовательностей актов в тесте осуществляли с помощью оригинальной программы «open field». При статистической обработке достоверность различий двух выборок оценивали при помощи непараметрического критерия U Вилкоксона—Манна—Уитни (программа Statistica v. 8) с уровнем достоверности ($P \leq 0.05$).

Визуализацию и мониторинг микрососудистой сети осуществляли через 3 нед или через 1 год после интрацеребральной трансплантации. Во всех случаях у наркотизированных животных удаляли теменную кость и твердую мозговую оболочку, тем самым позволяя визуализировать пиальную оболочку сенсорной коры. Поверхность мозга непрерывно орошали физиологическим раствором с температурой 37 °С. Температуру тела животных в течение всего опыта поддерживали на уровне 37 °С; среднее артериальное давление животных составляло 105—120 мм рт. ст.

Животных помещали под объектив телевизионной установки, с помощью которой исследовали плотность микрососудистой сети (с общим увеличением системы 40×) и изменения диаметров пиальных артериол (с общим увеличением системы 160×) при аппликации на поверхность мозга норадреналина (NA) или ацетилхолина (ACh). Концентрация применяемых растворов составляла 10^{-6} M, температура — 37 °С.

Используя компьютерную программу «Photo M» (автор — А. Черниговский), на статических изображениях подсчитывали общее количество сосудов и отдельно артериол на единицу площади.

При статистической обработке данных достоверность различий оценивали с помощью критерия Манна—Уитни, уровень достоверности различий $P \leq 0.05$.

Морфологические исследования влияния интрацеребральной трансплантации на состояние коры головного мозга старых крыс были проведены на 10 животных. Крыс декапитировали через 2 нед после введения МСК или α -MEM. Головной мозг фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде в течение 1 сут. Затем сегменты мозга, включающие в себя сенсомоторную кору, обезвоживали и заливали в парафин по стандартным методикам. Фронтальные серийные срезы толщиной 7 мкм получали на ротационном микротоме Leica (Leica,

Германия). Срезы окрашивали тионином по методу Ниссля.

Выявление глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) проводили иммуногистохимическим методом. Для проведения реакции с антителами к ГФКБ срезы головного мозга депарафинизировали в трех порциях ортоксилола, затем регидратировали в спиртах понижающейся концентрации по стандартной методике. Промывали в дистиллированной воде и переносили в 3%-ную перекись водорода для блокировки эндогенной пероксидазы. Далее проводили блокировку неспецифического окрашивания в 12%-ной сыворотке крови свиней (Dako, Дания) в течение 20 мин при комнатной температуре. Срезы промывали PBS и наносили первичные антитела (Dako, Дания). После инкубации во влажных камерах срезы двукратно промывали фосфатно-солевым буферным раствором. В качестве вторичных реагентов при реакции на ГФКБ использовали реактивы из набора Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/DAB (BioGenex, США). Часть срезов после постановки реакции докрашивали квасцовым гематоксилином.

Использованные реактивы: фосфатно-солевой буферный раствор (Биолот, Россия); антибиотик пенициллин/стрептомицин, L-глутамин (Invitrogen, США); культуральная среда α -MEM (ПанЭко, Россия); fetalная коровья сыворотка (HyClon, США); антитела против CD45, CD44, CD106 и CD90, а также против изотипического контрольного иммуноглобулина (IgG) (Millipore, США); золетил (Virbac, Франция); сыворотка крови свиней (Dako, Дания); реактивы из набора Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/DAB (BioGenex, США).

Результаты

При исследовании иммунофенотипических характеристик культуры было установлено, что выделенные нами клетки имеют фенотип, соответствующий МСК крысы (см. таблицу). Время удвоения популяции клеток оставалось примерно на одном уровне в течение всего срока ведения культуры и в конце 3-го пассажа составило 2.34 деления (рис. 1, а). Так же равномерно происходило деление клеток в культуре. Так, за 25 сут культура прошла 4.97 деления (рис. 1, б). Было оценено репликативное старение культуры — в конце пассирования в популяции было выявлено 44 % клеток, экспрессирующих β -галактозидазу (рис. 1, в). Для МСК 3-го пассажа, которые были использованы для интрацеребральной трансплантации экспериментальным животным, количество КОЕ в культуре составляло 7.91 % (рис. 1, в); в адипоцитарном направлении пролиферировало 18.9 % МСК, а в остеогенном — 26.4 %.

Возрастные изменения в ориентировочно-исследовательском поведении животных представлены на рис. 2, а. Показатели поведения в тесте ОП у интактных старых

Фенотип мезенхимных стволовых клеток крысы

| Имунофенотипический маркер | Доля клеток, экспрессирующих маркер, % |
|----------------------------|--|
| CD44 | 72.37 |
| CD45 | 1.93 |
| CD90 | 99.76 |
| CD106 | 17.12 |

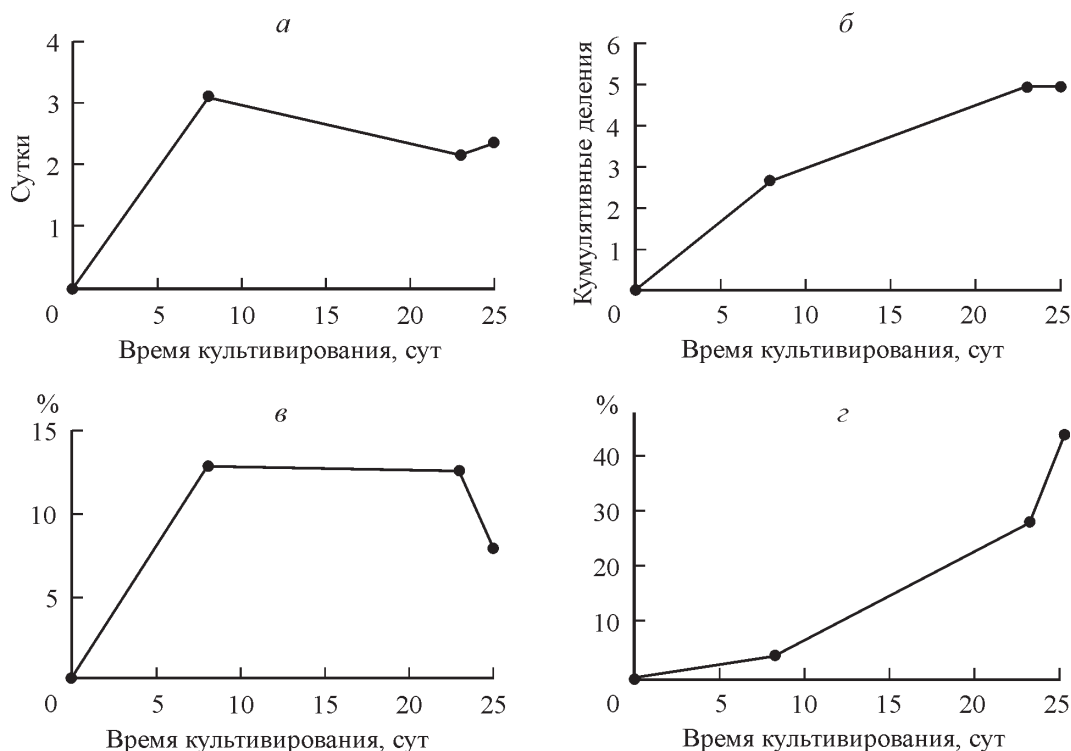


Рис. 1. Динамика пролиферативной активности (а—в) и репликативного старения (г) культуры мезенхимных стволовых клеток костного мозга крысы.

а — время удвоения популяции клеток; б — количество кумулятивных делений; в — процентное содержание колониеобразующих единиц (КОЕ) в культуре; г — процентное содержание клеток, экспрессирующих β -галактозидазу.

животных (группа № 2) по сравнению с молодыми крысами (группа № 1) достоверно снизились: количество акта «локомоции» уменьшилось в 2 раза; количество актов «обнюхивание», «норка» и «стойка с упором» у старых животных также стало меньше в среднем в 2.1, 1.5 и 1.6 раза соответственно. Длительность всех актов (кроме акта «груминг») у интактных старых крыс была достоверно выше, чем у молодых (данные не показаны).

Интрацеребральная трансплантация МСК не привела к улучшению локомоторного поведения, эмоционального состояния и увеличению ориентировочно-исследовательской активности (рис. 2, б). Количество поведенческих актов в ОП у старых животных, перенесших клеточную терапию, осталось на уровне интактных двухлетних крыс, а по двум основным показателям моторной функции — «локомоции» и «обнюхивание» — даже несколько ухудшилось.

Интрацеребральная трансплантация — достаточно травматическая процедура для таких мелких животных, как крысы. В нашем исследовании площадь повреждения после интрацеребрального введения МСК или α -МЕМ составляла в среднем 1/2 от площади поверхности сенсорной коры ипсилатерального полушария.

Введение 20 мкл α -МЕМ в кору головного мозга (группа № 3) вызывало формирование в коре ипсилатерального полушария значительной полости и выраженную глиальную реакцию вокруг нее (рис. 3, а). Через 2 нед после оперативного вмешательства вокруг полости сформировался выраженный астроцитарный рубец, что было продемонстрировано иммуногистохимической реакцией на ГФКБ (рис. 3, б). Интрацеребральная трансплантация МСК приводила к формированию в неокортексе скопления клеток, которое увеличивалось со временем за счет фибробластического роста. Через 2 нед на границах раз-

растающих конгломератов была выявлена резко положительная реакция на ГФКБ, что свидетельствовало об активации астроглии в ткани головного мозга (рис. 3, в). В дальнейшем начинался распад скопления клеток, и на этом месте формировалась полость, заполненная детритом. Распад трансплантатов сопровождался выраженной активацией астроцитов: их число увеличивалось, изменялась форма клеток, их отростки утолщались.

По мере старения экспериментальных животных от 2—3 до 22—24 мес (что является глубокой старостью для крыс линии Вистар-Киото) плотность микрососудистой сети в пиальной оболочке сенсорной коры головного мозга уменьшилась в среднем в 1.8 раза (рис. 4, 5).

Интрацеребральная трансплантация сингенных МСК привела к повышению плотности микрососудистой сети в пиальной оболочке в среднем в 1.6—1.8 раза по сравнению со старыми интактными животными независимо от сроков введения клеточного материала (группы № 4 и 5) (рис. 5).

Исследовав отдельно артериолярный участок микрососудистой сети пиальной оболочки, мы выявили, что интрацеребральная трансплантация МСК как за 1 год, так и за 3 нед до исследования привела к значительному увеличению количества артериол на единицу площади — в среднем в 2.1 раза по сравнению со старыми интактными животными (рис. 5).

В то же время в данной серии экспериментов мы не выявили значимых возрастных изменений реактивности пиальных артериол: констрикторные реакции этих микрососудов у интактных молодых и старых животных на НА достоверно не различались (рис. 6). Количество дилаторных реакций на АСh у старых животных было в среднем на 14 % меньше, а степень дилатации на 30 %

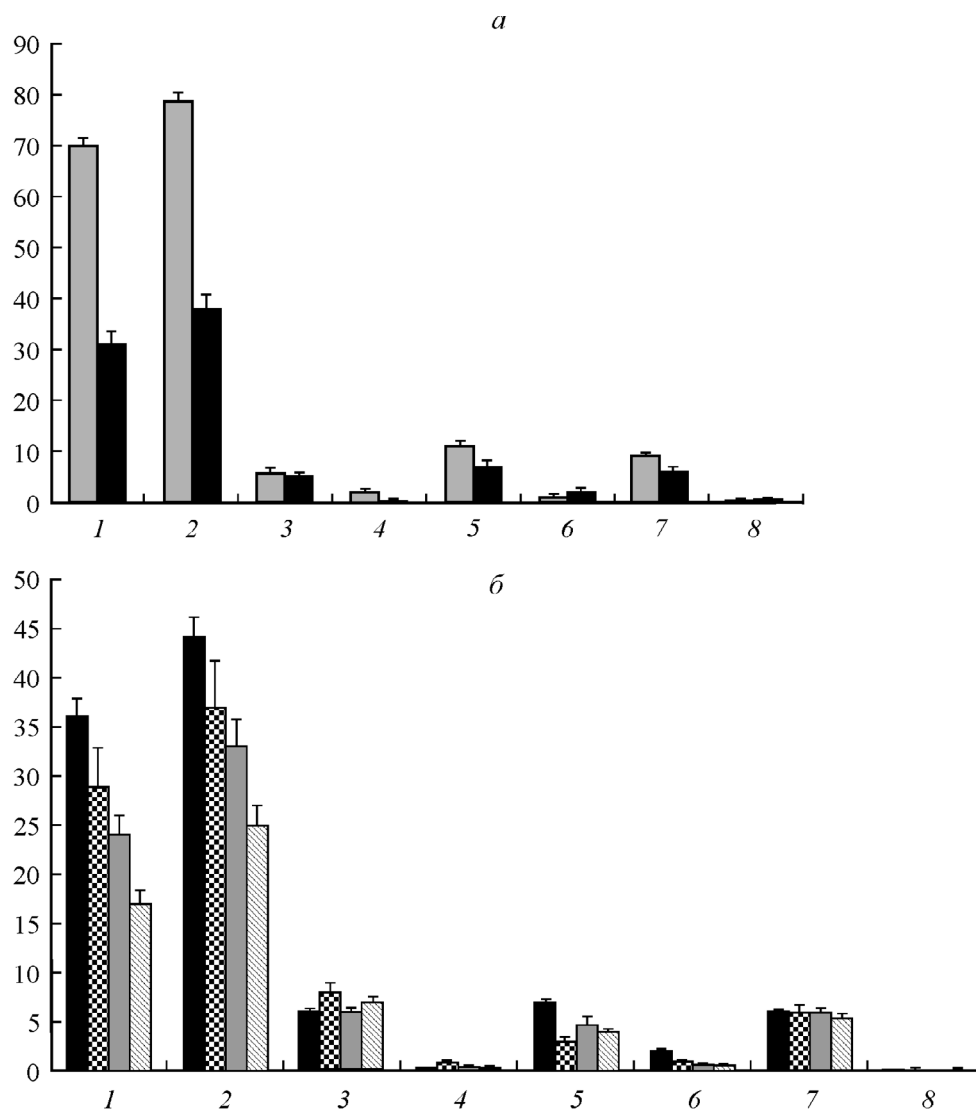


Рис. 2. Результаты поведенческого тестирования животных в установке «Открытое поле».

а — ориентировочно-исследовательское поведение intactных молодых (2—3 мес) и старых (22—24 мес) животных. *б* — ориентировочно-исследовательское поведение старых (22—24 мес) животных после интрацеребральной трансплантации МСК и контрольного вещества. Серые столбики — intactные животные в возрасте 2—3 мес; темные столбики — intactные животные в возрасте 22—24 мес; столбики в клеточку — животные в возрасте 22—24 мес, которым за 3 нед до тестирования была проведена интрацеребральная трансплантация среды культивирования α -МЕМ; заштрихованные столбики — животные в возрасте 22—24 мес, которым за 3 нед до тестирования была проведена интрацеребральная трансплантация МСК; столбики в горошек — животные в возрасте 22—24 мес, которым за 1 год (в возрасте 12 мес) до тестирования была проведена интрацеребральная трансплантация МСК. По вертикали — среднее количество актов поведения (\pm ошибка среднего, $P \leq 0.05$). По горизонтали — акты поведения: 1 — «локомоция», 2 — «обнюхивание», 3 — «движение на месте», 4 — «груминг», 5 — «стойка с упором», 6 — «вертикальная стойка», 7 — «норка», 8 — «сидит».

меньше, чем у молодых крыс ($P \leq 0.05$) (рис. 7). Интрацеребральная трансплантация МСК старым животным (за 3 нед до исследования) практически не повлияла на реактивность пиальных артериол в ответ на ACh (рис. 7), а в ответ на NA примерно на 20 % возросло количество сузившихся микрососудов и на 18 % уменьшилось количество дилатирующих сосудов (рис. 6).

Обсуждение

В течение последних 15 лет было проведено большое количество доклинических исследований, доказавших эффективность использования МСК при лечении таких заболеваний, как ишемический инсульт и травма головного мозга (Chen et al., 2003; Mahmood et al., 2004; Соко-

лова и др., 2007; Wu et al., 2008). После системной трансплантации МСК в тканевой зоне мозга, пограничной с местом повреждения, активировался ангиогенез, повышалась жизнеспособность нейронов, уменьшалась площадь глиального рубца. Применение МСК способствовало восстановлению ориентировочно-исследовательского поведения травмированных животных и их когнитивных функций (Соколова и др., 2006, 2008; Pavlichenko et al., 2008). Интрацеребральная трансплантация МСК предотвратила снижение двигательной активности крыс после удаления сенсорной коры ипсилатерального полушария (Соколова и др., 2011).

Процедура интрацеребрального введения клеточного материала практически не используется в экспериментальных работах, поскольку достаточно травматична для мелких лабораторных животных. Нарушение целостно-

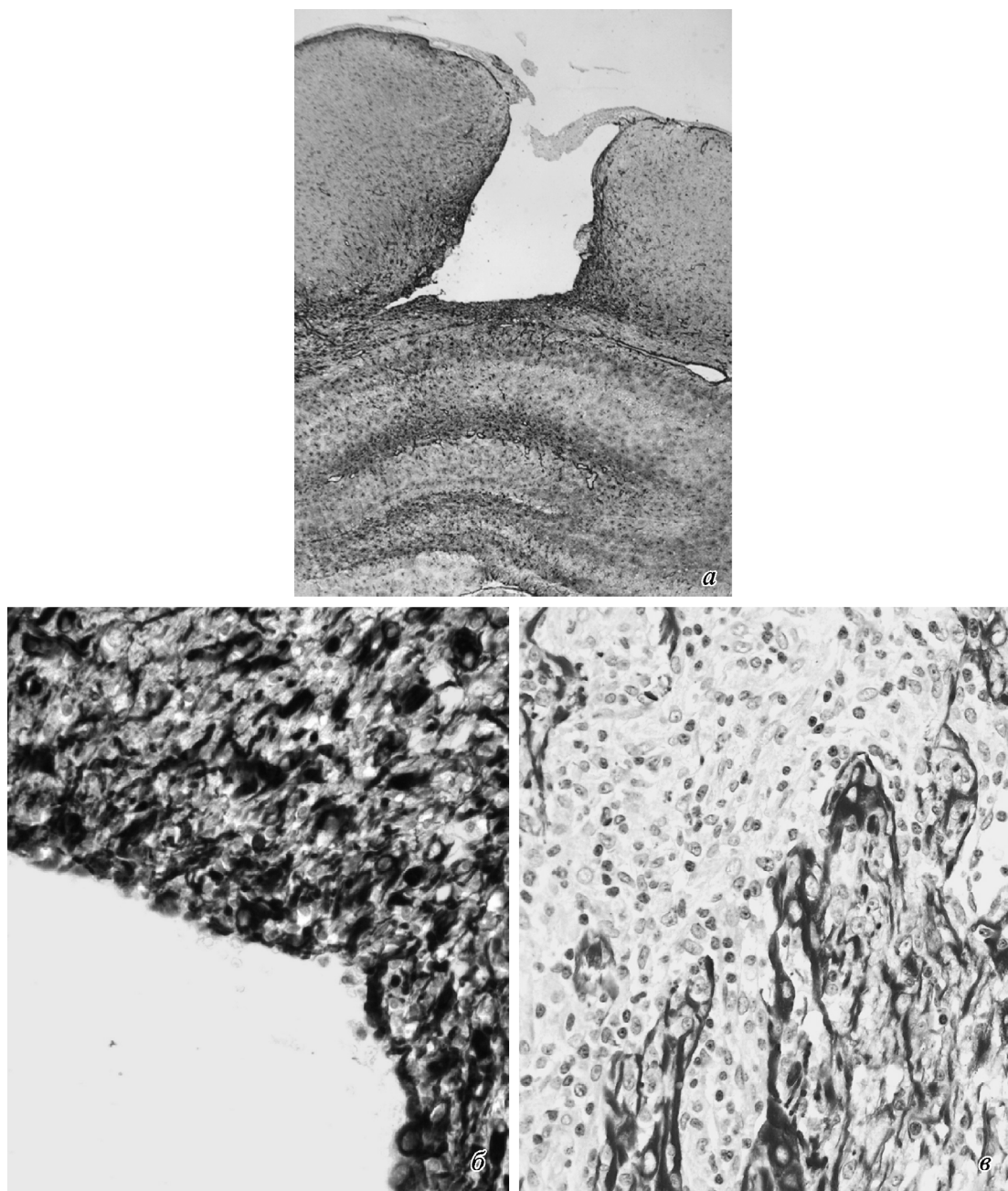


Рис. 3. Микрофотографии коры головного мозга крысы в возрасте 24 мес через 2 нед после интрацеребрального введения среды культивирования стволовых клеток α -МЕМ (*а*, *б*) и мезенхимных стволовых клеток (*в*).

а — повреждение коры головного мозга крысы, иммуногистохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок; *б* — активированные астроциты на границе сформировавшейся полости; *в* — иммунореактивные астроциты вокруг трансплантата, иммуногистохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок. Общее увеличение оптической системы 400 \times .

сти гематоэнцефалического барьера после инсульта или травмы головного мозга позволяет МСК, введенным внутривенно, мигрировать к месту тканевого повреждения (Соколова и др., 2007). Но при возрастных изменениях микрососудистой сети головного мозга или при таких заболеваниях, как гипертоническая и диабетическая ангиопатии, интрацеребральное введение — единственный способ доставить МСК в ишемизированную мозговую ткань.

В наших экспериментах интрацеребральная трансплантация МСК или питательной среды культивирования стволовых клеток α -МЕМ приводила к тканевому по-

вреждению и стимуляции ответной реакции на повреждение — активации астроцитов (рис. 3). При этом росту клеточных конгломератов в неокортексе препятствовало плотное расположение нервных и глиальных клеток и их отростков — мы установили, что размер травматических полостей в коре ипсилатерального полушария был ограничен.

Несмотря на повреждение ткани мозга, интрацеребральная трансплантация α -МЕМ не привела к уменьшению плотности микрососудистой сети пиальной оболочки ни в контралатеральном (рис. 5), ни в ипсилатеральном полушариях (данные не приводятся). Ориентировоч-

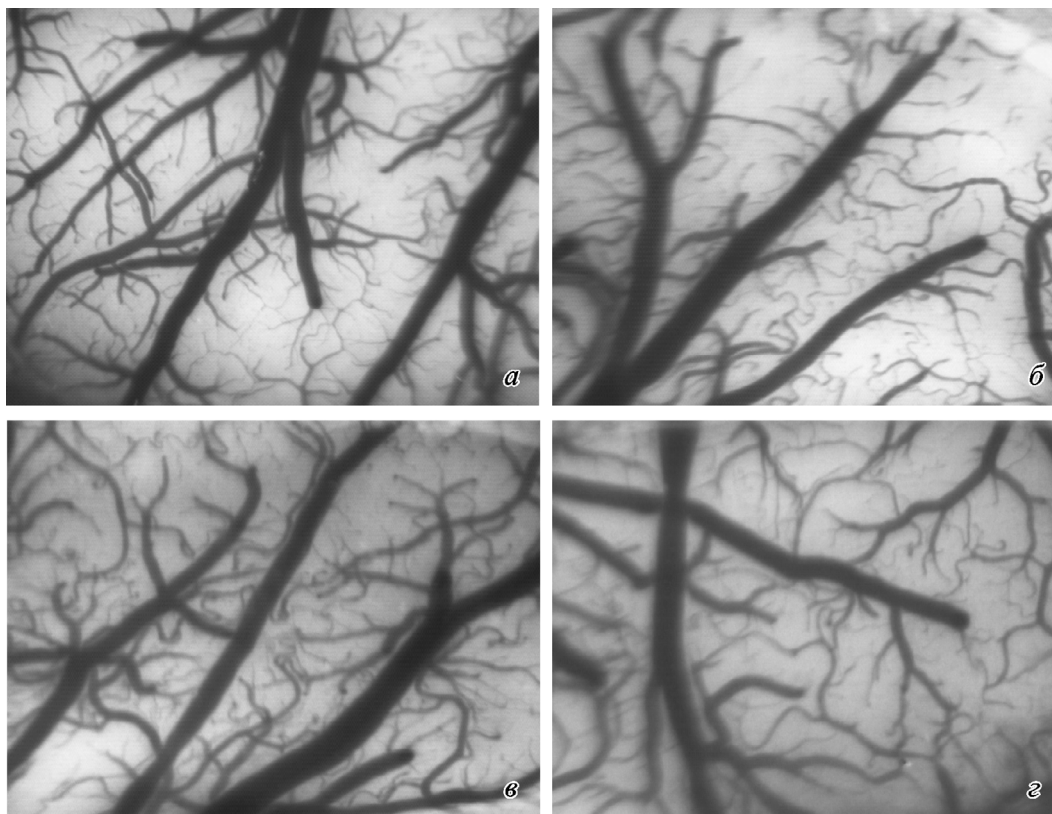


Рис. 4. Оригинальные изображения микрососудистой сети пиальной оболочки коры головного мозга крыс, полученные с помощью телевизионной установки для изучения микроциркуляции.

а — пиальная оболочка полушария головного мозга интактного животного в возрасте 2–3 мес; *б* — пиальная оболочка полушария головного мозга интактного животного в возрасте 2 лет; *в* — пиальная оболочка контралатерального полушария через 3 нед после интрацеребральной трансплантации МСК у животного в возрасте 2 лет; *г* — пиальная оболочка контралатерального полушария через 1 год после интрацеребральной трансплантации МСК у животного в возрасте 2 лет. Общее увеличение оптической системы 40×.

но-исследовательское поведение старых животных через 3 нед после введения α -МЕМ не ухудшилось по сравнению с интактными животными той же возрастной категории (рис. 2, б). Следовательно, мы можем предположить, что, несмотря на травматичность, метод интрацеребрального введения может быть применен в экспериментальной практике.

Интересные результаты были получены в экспериментах по интрацеребральной трансплантации МСК старым животным. По мере старения крыс от 2–3 до 22–24 мес плотность микрососудистого русла пиальной оболочки сенсомоторной коры головного мозга уменьшилась в среднем в 1.8 раза. После введения МСК в пиальную оболочку значительно активировался ангио- и артериогенез, что способствовало увеличению плотности микрососудистой сети старых животных в среднем в 1.9 раза по сравнению с интактными крысами того же возраста (рис. 5). Независимо от времени введения МСК (за 1 год или за 3 нед до исследования) плотность микрососудистого русла в пиальной оболочке у животных из групп клеточной терапии (№ 4 и 5) в возрасте 22–24 мес была примерно такой же, как у 2–3-месячных крыс. Наиболее значимое увеличение плотности наблюдали на артериолярном участке микрососудистого русла. После интрацеребральной трансплантации МСК количество артериол на единицу площади пиальной оболочки сенсомоторной коры возросло примерно в 2.1 раза по сравнению с интактными животными той же возрастной категории и в 2 раза по сравнению с молодыми крысами (рис. 5).

Одна из основных характеристик сосудистой стенки мозговых артериол — это ее реактивность, т. е. способность изменять диаметр сосудов под воздействием эндогенных и экзогенных факторов. По мере старения крыс линии Вистар-Киото мы не наблюдали значимых изменений в реактивности пиальных артериол при местном воздействии (апликации) вазоконстриктора (NA) и вазодилататора (ACh). Исследование реактивности пиальных артериол разного диаметра у старых крыс, перенесших интрацеребральную трансплантацию МСК, показало, что в данной группе животных реактивность пиальных артериол при воздействии NA и ACh аналогична таковой у молодых и у старых интактных животных (рис. 6, 7).

Снабжение ткани головного мозга кислородом определяется большим числом параметров: напряжением кислорода в артериальной крови, скоростью кровотока в мозговых сосудах, уровнем тканевого потребления кислорода, плотностью микрососудистого русла и т. д. Основной газообмен происходит на уровне артериол и капилляров. Примерно 70 % объема ткани коры головного мозга имеет достаточно высокое напряжение кислорода (pO_2) 15–45 мм рт. ст. и только менее 10 % — от 0 до 10 мм рт. ст. (Вовенко, Чуйкин, 2009). Увеличение расстояния между артериолами и капиллярами сдвигает это соотношение в сторону меньшего pO_2 . Повышение плотности артериолярного и капиллярного участков микрососудистой сети, при прочих равных условиях, предотвращает формирование ишемических зон в ткани головного мозга. Исходя из полученных данных по реактивности

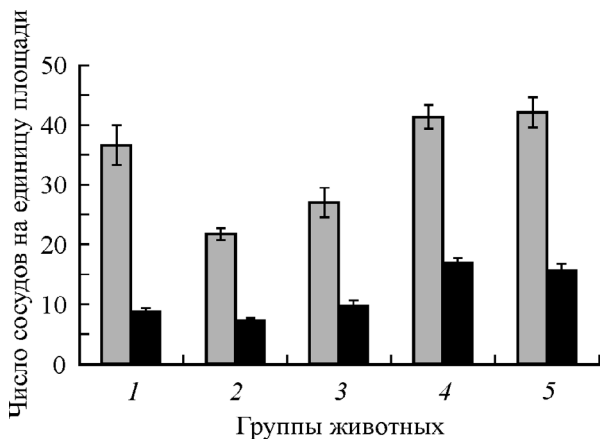


Рис. 5. Плотность микрососудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры у интактных животных разного возраста и после интрацеребральной трансплантации МСК.

По вертикали — плотность микрососудов (число сосудов на $1 \text{ мкм}^2 \pm$ ошибка среднего, $P < 0.05$). По горизонтали — группы экспериментальных животных: 1 — интактные животные в возрасте 2—3 мес; 2 — интактные животные в возрасте 22—24 мес; 3 — животные в возрасте 22—24 мес, которым среда культивирования α -МЕМ была введена за 3 нед до исследования; 3 — животные в возрасте 22—24 мес, которым МСК были введены за 3 нед до исследования; 4 — животные в возрасте 22—24 мес, которым МСК были введены за 1 год до исследования. Светлые столбики — плотность всей микрососудистой сети; темные столбики — плотность артериолярного участка микрососудистой сети.

пиальных артериол мы можем предположить, что структура сосудистой стенки нативных и вновь образованных после трансплантации МСК микрососудов примерно одинакова и не влияет негативно на транспорт кислорода.

Возрастные патологические изменения в ЦНС — одна из основных причин ухудшения моторного поведения у пожилых (Пальцев и др., 2012; Rosso et al., 2013). Организация, регуляция и координация произвольных и непроизвольных движений осуществляются через пирамидный и экстрапирамидный тракты. Морфологические изменения в одном из его звеньев могут стать причиной дисбаланса всей системы. С помощью интрацеребрального введения МСК мы увеличили плотность микрососудистого русла в пиальной оболочке сенсомоторной коры головного мозга старых крыс. Сенсомоторная кора (зоны передней теменной и собственно теменной областей) является зоной представительства афферентации кожно-кинестетического анализатора, играющего ведущую роль в формировании приспособительных реакций грызунов. В связи с этим мы предполагали, что улучшение микроциркуляции в данной зоне головного мозга, возможно, будет способствовать активации ориентировочно-исследовательского поведения старых животных и стабилизации их психоэмоционального статуса.

По данным теста ОП (рис. 2, а), при старении животных значительно понизилась их двигательная активность, угасали исследовательская мотивация и ориентировочное

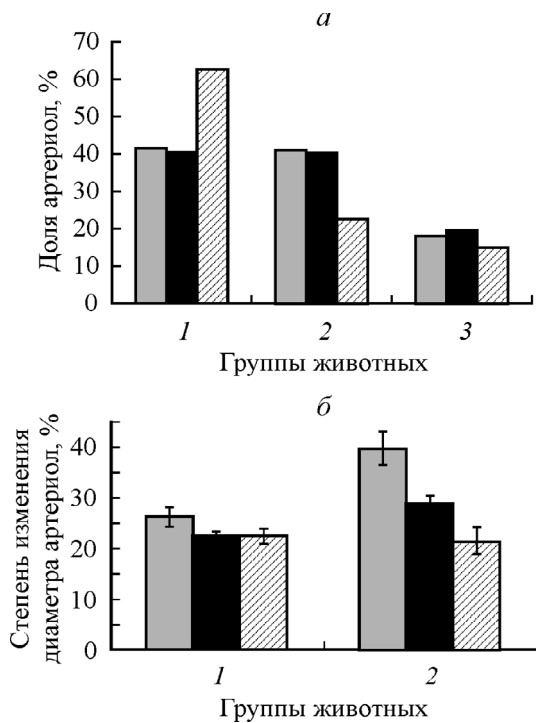


Рис. 6. Изменение реактивности пиальных артериол сенсомоторной коры головного мозга крыс под воздействием норадреналина (NA).

а — процентное соотношение пиальных артериол, прореагировавших различным образом на воздействие NA; б — степень изменения диаметра пиальных артериол (%), прореагировавших различным образом на воздействие NA ($P \leq 0.05$). 1 — артериолы, ответившие на воздействие NA констрикцией; 2 — артериолы, ответившие на воздействие NA дилатацией; 3 — артериолы, не прореагировавшие при воздействии NA. Серые столбики — интактные животные в возрасте 2—3 мес; черные столбики — животные в возрасте 22—24 мес, которым за 3 нед до исследования была проведена интрацеребральная трансплантация МСК.

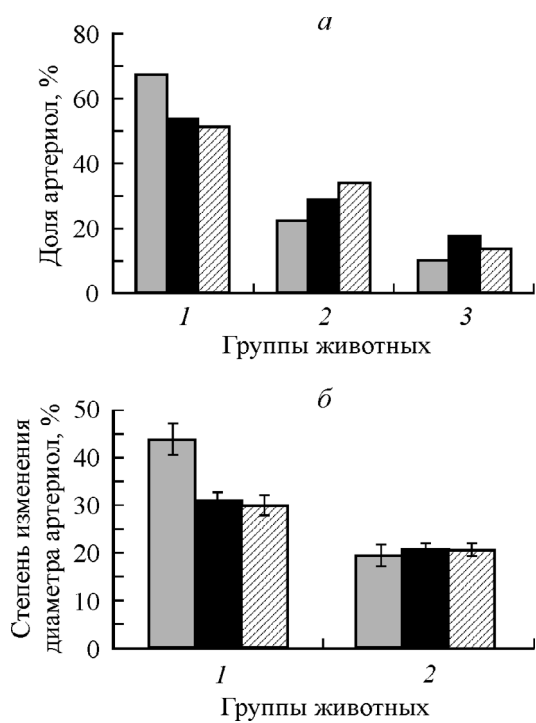


Рис. 7. Изменение реактивности пиальных артериол сенсомоторной коры головного мозга крыс под воздействием ацетилхолина (ACh).

а — процентное соотношение пиальных артериол, прореагировавших различным образом на воздействие ACh; б — степень изменения диаметра пиальных артериол (%), прореагировавших различным образом на воздействие ACh ($P \leq 0.05$). 1 — артериолы, ответившие на воздействие ACh дилатацией; 2 — артериолы, ответившие на воздействие ACh констрикцией; 3 — артериолы, не прореагировавшие при воздействии ACh. Серые столбики — интактные животные в возрасте 2—3 мес; черные столбики — интактные животные в возрасте 22—24 мес; заштрихованные столбики — животные в возрасте 22—24 мес, которым за 3 нед до исследования была проведена интрацеребральная трансплантация МСК.

поведение. Старые крысы по сравнению с молодыми, совершая меньше паттернов поведения за опыт, затрачивали больше времени на их реализацию. Подобное поведение свидетельствует о замедлении реакций, быстрой утомляемости и эмоциональной подавленности.

Интрацеребральная трансплантация МСК не способствовала улучшению локомоторного поведения и эмоционального состояния, увеличению ориентировочно-исследовательской активности старых животных (рис. 2, б). Количество поведенческих актов в ОП у крыс в возрасте 22—24 мес, перенесших клеточную терапию, осталось на уровне интактных двухлетних крыс, а по двум основным показателям моторной функции — «локомоции» и «обнюхивание» — даже несколько ухудшились.

В заключение следует подчеркнуть, что интрацеребральная трансплантация МСК оказалась достаточно эффективным методом активации ангиогенеза и артериогенеза в пиальной оболочке коры головного мозга крыс, но недостаточным для улучшения двигательной активности старых животных и их эмоционального статуса. Данные результаты еще раз подтверждают высокий потенциал МСК как субстрата клеточной терапии ишемических нарушений и требуют проведения дополнительных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00286).

Список литературы

- Вовенко Е. П., Чулкин А. Е. 2009.* Профили тканевого напряжения кислорода вблизи артериол и венул коры головного мозга крысы при развитии острой анемии. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* 95 (7) : 673—687. (*Vovenko E., Chuikin A. 2009.* Tissue oxygen tension profiles near the arterioles and venules of rat brain cortex in the development of acute anemia. *Russ. J. of Physiol.* 95 (7) : 673—687.)
- Пальцев М. А., Кветной И. М., Полякова В. О., Гурко Г. И., Мурсалов С. У. 2012.* Нейроиммуноэндокринные механизмы старения и возрастной патологии. СПб.: Наука. 463 с. (*Paltsev M., Kvetnoy I., Polyakova V., Gurko G., Mursalov S. 2012.* Neuroimmunoenocrine mechanisms of aging and age-related pathology. *St. Petersburg: Science.* 463 p.)
- Петров Е. С. 1990.* Изучение нейробиологических основ сложных безусловных рефлексов в Физиологическом отделе им. И. П. Павлова: итоги последних лет. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* 76 (12) : 1669—1681. (*Petrov E. 1990.* A study of the neurobiological bases of complicated unconditional reflexes in the Physiological Department of them. *I. P. Pavlov: results of the last years.* *Russ. J. Physiol.* 76 (12) : 1669—1681.)
- Соколова И. Б., Зинькова Н. Н., Билибина А. А., Кругляков П. В., Гилерович Е. Г., Польшцев Д. Г., Отеллин В. А. 2007.* Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2 (4) : 54—62. (*Sokolova I., Zinkova N., Bilibina A., Kruglyakov P., Gilerovich E., Polintsev D., Otellin V. 2007.* Possibilities of application of cell therapy in the treatment of ischemic stroke in the experiment. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering.* 2 (4) : 54—62.)
- Соколова И. Б., Федотова О. Р., Гилерович Е. Г., Билибина А. А., Павличенко Н. Н., Кругляков П. В., Польшцев Д. Г. 2009.* Коррекция ориентировочно-исследовательского дефици-
- та у крыс с помощью мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 4 (4) : 1—8. (*Sokolova I., Fedotova O., Gilerovich E., Bilibina A., Pavlichenko N., Kruglyakov P., Polintsev D. 2009.* Correction of orientativ- research in rats using multipotent mesenchymal stromal cells. *Cell Technologies in Biology and Medicine.* 4 (4) : 1—8.)
- Соколова И. Б., Федотова О. Р., Зинькова Н. Н., Кругляков П. В., Польшцев Д. Г. 2006.* Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на когнитивные функции крыс после ишемического инсульта. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 4 : 202—205. (*Sokolova I., Fedotov O., Zinkova N., Kruglyakov P., Polintsev D. 2006.* The effect of transplantation of mesenchymal stem cells on cognitive functions in rats after ischemic stroke. *Cell Technologies in Biology and Medicine.* 4 : 202—205.)
- Соколова И. Б., Федотова О. Р., Цикунов С. Г., Польшцев Д. Г. 2011.* Восстановление ориентировочно-исследовательского поведения крыс после травмы головного мозга с помощью мезенхимальных стволовых клеток. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 1 : 26—29. (*Sokolova I., Fedotova O., Tsikunov S., Polintsev D. 2011.* Recovery orientative exploratory behavior in rats after brain injury using mesenchymal stem cells. *Cell Technologies in Biology and Medicine.* 1 : 26—29.)
- Borras D., Ferrer I., Pumarola M. 1999.* Age-related changes in the brain of the dog. *Veterinary Pathol.* 36 : 202—211.
- Brown W., Thore C. 2011.* Review: Cerebral microvascular pathology in aging and neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37 : 56—74.
- Chen J., Zhang Z., Li Y., Li Y., Wang L., Xu Y., Gautam S., Lu M., Zhu Z., Chopp M. 2003.* Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ. Res.* 92 : 692—699.
- Mahmood A., Lu D., Choop M. 2004.* Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. *Neurosurg.* 55 : 1185—1192.
- Pavlichenko N., Sokolova I., Vijde S., Shuedova E., Alexandrov G., Krouglyakov P., Fedotova O., Gilerovich E., Polintsev D., Otellin V. 2008.* Mesenchymal stem cells transplantation could be beneficial for treatment of experimental ischemic stroke in rats. *Brain Res.* 1233 : 203—213.
- Riddle D., Sonntag W., Lichtenwalner R. 2003.* Microvascular plasticity in aging. *Ageing Res. Rev.* 2 : 149—168.
- Rosso A., Studenski S., Chen W., Aizenstein H., Alexander N., Bennett D., Black S., Camicioli R., Carlson M., Ferrucci L., Guralnik J., Hausdorff J., Raye J., Launer L., Lipsitz L., Verghese J., Rossano C. 2013.* Aging, the central nervous system, and mobility. *J. Gerontol.* 68 : 1—8.
- Shao W., Li C., Chen L., Qiu X., Zhang W., Huang C., Xia L., Kong J., Tang Y. 2010.* Stereological investigation of age-related change of the capillaries in white matter. *Anat. Rec. (Hoboken).* 293 : 1400—1407.
- Thore C., Anstrom J., Moody D., Challa V., Marion M., Brown W. 2007.* Morphometric analysis of arteriolar tortuosity in human cerebral white matter of preterm, young, and aged subjects. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66 : 337—345.
- Villena A., Vidal L., Diaz F., Perez D. 2003.* Stereological changes in the capillary network of the aging dorsal lateral geniculate nucleus. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 274 : 857—861.
- Wu J., Sun Z., Sun H., Wu J., Weisel R., Keating A., Li Z., Feng Z., Li R. 2008.* Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats. *Cell Transplantation.* 16 : 993—1005.

Поступила 24 X 2013

EFFICACY OF MESENCHYMAL STEM CELLS INTRACEREBRAL TRANSPLANTATION
FOR THE CORRECTION OF AGE-RELATED CEREBRAL MICROCIRCULATION
ALTERATIONS IN RATS

*I. B. Sokolova,¹ O. R. Fedotova,² E. G. Gilerovich,² I. V. Sergeev,¹ S. V. Anisimov,^{3,4}
M. V. Puzanov,³ D. P. Dvoretzky¹*

¹ I. P. Pavlov Institute of Physiology, RAS, ² Research Institute of Experimental Medicine RAS,

³ V. A. Almazov Federal Center for Heart, Blood and Endocrinology and

⁴ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

E-mail: sib@kolt.infran.ru

Using a television-based vital microscopy method and immunohistochemical analysis, we have assessed the effect of intracerebral transplantation of syngeneic mesenchymal stem cells (MSC) on the brain cortex structure and the microcirculation in the pia mater of old rats. Using «open field» system, we have studied the effect of MSC transplantation on position-finding and discovery behavior of older animals. We have found that density of microvascular network of the pia mater increased ca. 1.9-fold in MSC recipients, compared to age-matched intact animals. Density of the arteriolar area of microvascular network of the pia mater increased ca. 2-fold. Reactivity of the newly formed arterioles was nearly equal to that of native microvessels. Intracerebral transplantation procedure itself was traumatic for brain cortex of rats, but it had no effect on the microcirculation in the contralateral hemisphere. Intracerebral transplantation of MSC did not improve locomotor behavior and emotional stage of old rats, did not increase their position-finding and discovery activity.

Key words: mesenchymal stem cells, intracerebral transplantation, microcirculation, arterioles, behavior.
