

Черкашова Эльвира Андреевна

**ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ
ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ОСТРОЙ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО
МОЗГА У КРЫС ПО ДАННЫМ МРТ И ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ**

3.1.24 Неврология (медицинские науки)

3.3.3 Патологическая физиология (медико-биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент
член-корр. РАН, доктор биологических наук,
профессор

Губский Леонид Васильевич

Ярыгин Константин Никитич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Кипарисова Елена Сергеевна

Академия постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», кафедра нервных болезней и нейрореабилитации, профессор кафедры

чл. – корр. РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Морозов Сергей Георгиевич

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, директор

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета 21.2.058.05 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1 и на сайте: <http://www.rsmu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года

Ученый секретарь Диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Боголепова Анна Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Ишемический инсульт является второй по частоте встречаемости причиной смерти и долгосрочной инвалидизации среди взрослого населения развитых стран [WHO's Global Health Estimates]. Множество научных исследований было посвящено изучению процессов патогенеза инфаркта мозга с целью определения возможностей этио- и патогенетической терапии [Гусев Е.И. и соавт., 2018]. Несмотря на достижения в изучении терапевтических методик, направленных на причину возникновения ишемического инсульта, на данный момент не разработана тактика воздействия на другие звенья патогенеза данного заболевания, которая имела бы достаточную доказательную базу [Гусев Е.И. и соавт., 2002; Neuhaus A.A. и соавт., 2017]. Поиск новых стратегий воздействия на вещество головного мозга в условиях ишемии остается актуальным направлением изучения для научного сообщества [Гусев Е.И. и соавт., 2007]. Исследования последних десятилетий показали, что одним из эффективных направлений лечения заболеваний нервной системы, в т.ч. ишемического инсульта, является регенеративная терапия стволовыми клетками [Ярыгин К.Н. и соавт., 2015; Song C.G. и соавт., 2018]. Наиболее изученным типом стволовых клеток, применяемым как на доклинической, так и на клинической стадии исследований, являются мезенхимальные стволовые (стромальные) клетки (МСК) [Скворцова В.И. и соавт., 2008; Lee J.S. и соавт., 2010; Bhasin A. И соавт., 2013]. Во множестве научных работ, посвященных изучению влияния данного типа клеток на различных моделях экспериментального инсульта, была доказана их безопасность и клиническая эффективность, были также изучены особенности миграции и влияния клеток при различных путях их введения у лабораторных животных [Ярыгин К.Н. и соавт., 2009]. Также выявленные такие свойства мезенхимальных стволовых клеток, как возможность к трансдифференцировке в клетки нейронального типа [Phinney D.G. и соавт., 2007; Arthur A. и соавт., 2008; Park B.W. и соавт., 2012], низкая иммуногенность [Ankrum J.A. и соавт., 2014], противовоспалительное и иммуномодулирующее действие [Fu Q. и соавт., 2017], позволяют рассматривать данный тип клеток как наиболее перспективный к применению в терапии ишемического инсульта.

В последние десятилетия приобрело популярность новое направление исследования клеточной терапии с применением клеток, прошедших предварительную обработку с использованием новой технологии дедифференцировки до состояния стволовости (такие клетки носят название индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, ИПСК), а затем направленной дифференцировки до нейрональных прогениторных клеток, что повышает тропность трансплантата к нервной ткани. По данным проведенных исследований, несмотря на прошедшую стадию плюрипотентности, применение данного типа клеток не приводило к тератогенезу, как в случае с недифференцированными ИПСК [Kawai H. и соавт., 2010]. Однако, поскольку данная технология вирусной обработки трансплантата является относительно новой, имеется ограниченное количество данных об особенностях механизмов действия и клинической эффективности данного типа клеток.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных терапии ишемического инсульта вышеописанными типами стволовых и прогениторных клеток, остается неясным

вопрос о механизмах их действия, зависимости клинической эффективности их применения от дозы трансплантата, а также выявления возможных различий применения мезенхимальных стволовых клеток в сравнении с нейрональными прогениторными клетками, полученными из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в условиях острой фокальной ишемии головного мозга у лабораторных животных.

Цель и задачи

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на церебральные изменения при острой фокальной ишемии головного мозга у крыс по данным МРТ и гистологического исследования.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить и сравнить терапевтическую эффективность внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга;

2. Оценить и сравнить терапевтическую эффективность внутривенной трансплантации нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга;

3. Сравнить терапевтическую эффективность внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в дозе 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга;

4. Изучить прижизненное распределение мезенхимальных стволовых клеток в головном мозге при их внутривенной трансплантации крысам с моделью острой фокальной ишемии головного мозга по данным магнитно-резонансного исследования;

5. Изучить особенности распределения трансплантированных внутривенно мезенхимальных стволовых клеток в головном мозге крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга по данным гистологического исследования.

6. Оценить влияние внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на активность глиальной реакции в полушарии инфаркта в рамках изучения механизма действия клеточной терапии у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга по данным иммуногистохимического исследования.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведена комплексная оценка терапевтической эффективности и доказано положительное влияние на восстановление функций нервной системы внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток лабораторным крысам с моделью острой фокальной ишемии головного мозга.

Выявлена дозозависимость терапевтического эффекта мезенхимальных стволовых клеток при внутривенной трансплантации в разных дозах, проявлявшаяся в виде более выраженного влияния на регресс неврологического дефицита и скорость восстановления функций нервной

системы у крыс с моделью экспериментального инфаркта головного мозга при введении большей дозы клеток.

Доказана терапевтическая эффективность внутривенной трансплантации в разных дозах индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из нейрональных прогениторных клеток человека (ИПСК-НПК), на течение экспериментального инсульта у лабораторных крыс;

Проведено сравнение терапевтической эффективности внутривенной трансплантации разных видов стволовых и прогениторных клеток на течение экспериментального инфаркта головного мозга у крыс;

Разработана и апробирована методика прижизненной визуализации в головном мозге меченных микрочастицами суперпарамагнитного оксида железа мезенхимальных стволовых клеток при помощи проведения МРТ в реальном времени одновременно с внутривенной клеточной трансплантацией лабораторным крысам с моделью острой фокальной ишемии головного мозга.

Продемонстрирован диффузный характер распределения в головном мозге меченых МСК при внутривенной трансплантации крысам с моделью экспериментального инфаркта головного мозга при оценке по данным МР исследования головного мозга лабораторных животных с последующей визуализацией трансплантированных клеток по данным гистологического исследования;

В рамках изучения механизмов действия мезенхимальных стволовых клеток в условиях острой фокальной ишемии головного мозга изучено влияние клеточной трансплантации на активность глиальной реакции в области коры полушария инфаркта у крыс с моделью экспериментального инфаркта головного мозга по данным иммуногистохимического исследования.

Научная новизна работы

Проведено комплексное изучение и сопоставление терапевтической эффективности клеточной терапии МСК в различных дозировках при внутривенной трансплантации крысам с моделью экспериментального инфаркта головного мозга. Была исследована и сопоставлена терапевтическая эффективность различных дозировок ИПСК-НПК после внутривенной трансплантации крысам с моделью острой фокальной ишемии мозга. На основании полученных результатов исследования были выявлены оптимальные дозировки клеток МСК и ИПСК-НПК и была сопоставлена эффективность их применения после внутривенной трансплантации крысам с инфарктом головного мозга. Проведено исследование влияния трансплантации МСК на активность глиальной реакции вещества головного мозга, в рамках изучения механизмов действия МСК в остром периоде ишемического инсульта у животных. Были получены новые данные о распределении МСК в головном мозге у крыс с церебральным инфарктом при внутривенной трансплантации.

Положения, выносимые на защиту

1. Было показано положительное терапевтическое влияние внутривенной трансплантации МСК на ускорение функционального восстановления лабораторных крыс, оцененное при

помощи шкалы оценки неврологического статуса у лабораторных грызунов (mNSS), после моделирования острой фокальной ишемии головного мозга. Был выявлен дозозависимый эффект внутривенной инфузии МСК: положительное влияние на регресс неврологического дефицита было показано при внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 клеток с 14 суток, и более выраженное влияние на скорость и выраженность восстановления неврологических функций - при трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток.

2. Была продемонстрирована терапевтическая эффективность внутривенной трансплантации ИПСК-НПК на течение экспериментального инсульта у лабораторных крыс по показателю выживаемости лабораторных животных –при трансплантации 5×10^5 и 2×10^6 клеток, и регресса неврологического дефицита, оцененного по шкале mNSS – при трансплантации 2×10^6 клеток.

3. Внутривенная трансплантация МСК и ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток оказывает равное по эффективности терапевтическое воздействие на течение экспериментального инсульта у крыс по показателю регресса неврологического дефицита, при этом введение ИПСК-НПК также значительно улучшало выживаемость лабораторных животных после моделирования инфаркта головного мозга.

4. При внутривенной трансплантации МСК через 24 часа после воспроизведения экспериментального инсульта распределение клеток носит диффузный характер, что было продемонстрировано при помощи МР исследования головного мозга лабораторных крыс в режиме реального времени во время клеточной инфузии. Единичные скопления меченых МСК начинают визуализироваться с 7-й минуты от начала введения клеток, накапливаются в течение 1 часа, затем отмечается постепенное исчезновение гипоинтенсивного сигнала от меченых МСК в церебральных структурах. Через 24 часа после трансплантации меченые клетки в головном мозге не визуализируются по данным МРТ.

5. По данным гистологического исследования единичные меченые МСК в образцах головного мозга лабораторных крыс с экспериментальным инфарктом головного мозга визуализируются через 2 часа после внутривенной клеточной трансплантации. При этом через 24 часа после внутривенного введения меченые клетки не детектируются по данным конфокальной микроскопии. При исследовании образцов ткани паренхиматозных органов наибольшее количество меченых МСК выявляется в ткани легких, а также клетки визуализируются в ткани печени, почек и селезенки.

6. По данным иммуногистохимического исследования на 7-е сутки после внутривенной трансплантации МСК отмечается значимое уменьшение активности глиальной реакции в области коры полушария инфаркта у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно были осуществлены: подготовка обзора литературы; воспроизведение экспериментальной модели острой фокальной ишемии головного мозга, проведение МР-исследования и поведенческих тестов, приготовление материала для гистологического исследования; анализ полученных результатов и оформление публикаций, подготовка научных докладов; написание текста диссертации.

Внедрение результатов в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на медико-биологическом факультете Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Разработанная методика внутривенной трансплантации стволовых клеток лабораторным крысам, а также способ прижизненной магнитно-резонансной визуализации стволовых клеток в режиме реального времени после их внутривенного введения, используются в научной работе в центре коллективного пользования "Медицинские и биотехнологические нанотехнологии" ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», а также в научно-исследовательской работе отдела ультразвуковой и функциональной диагностики ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства России.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на международных конференциях. Апробация работы состоялась 20 сентября 2022 года на совместной научно-практической конференции кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики и кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Публикации материалов исследования

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из которых 5 - в изданиях, рецензируемых ВАК, 3 научных статьи - в научных журналах, индексируемых в базе данных SCOPUS, а также 5 тезисов докладов на международных конференциях.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, заключения и выводов, практических рекомендаций, списка литературы и списка сокращений. Представленный материал иллюстрирован 46 рисунками и 2 таблицами. Список литературы включает 234 источника, из которых 20 отечественных и 214 зарубежных.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства Образования и Науки Российской Федерации № 2020-1902-01-349 «Нанобиотехнологии в диагностике и терапии социально значимых заболеваний».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Протокол исследования

В работе проводилось изучение терапевтической эффективности клеточной терапии различными типами стволовых/прогениторных клеток при острой фокальной ишемии головного мозга у крыс. Всем животным (n=115) проводилось моделирование экспериментального инфаркта головного мозга и спустя 24 часа – внутривенная клеточная трансплантация. Оценка состояния животных проводилась непосредственно перед воспроизведением

экспериментального инсульта для исключения из исследования крыс с врожденными аномалиями развития, затем перед клеточной инфузией, и далее в динамике - на 7-е, 14-е, 30-е и 60-е сутки после трансплантации. Состояние животных оценивали с помощью измерения массы тела животных, показателей неврологического статуса, а также измерения объема очага ишемии головного мозга по данным МР-исследования. По истечении срока наблюдения животные выводились из эксперимента. Протокол дизайна исследования представлен в Таб.1.

Таб. 1. Протокол исследования терапевтической эффективности клеточной терапии на модели инфаркта головного мозга у крыс

| Время | 14 суток | До СМАО | СМАО | Через 24ч | Введение клеток | 7 суток | 14 суток | 30 суток | 60 суток |
|-----------------------------------|----------|---------|----------|-----------|-----------------|---------|----------|----------|------------------------------|
| Процедура/ Параметры оценки | Карантин | Оценка | Операция | Оценка | Операция | Оценка | Оценка | Оценка | Выведение из эксперимента |
| Масса, г | - | + | - | + | - | + | + | + | |
| mNSS, баллы | - | + | - | + | - | + | + | + | |
| MPT | - | + | - | + | - | + | + | + | |

В ходе исследования терапевтической эффективности трансплантации стволовых/прогениторных клеток у лабораторных крыс с моделью экспериментального инфаркта головного мозга было выделено 3 этапа:

1. Оценка и сравнительный анализ терапевтической эффективности внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 (n=25) и 2×10^6 (n=30) клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга; в группе контроля крысам с моделью экспериментального инфаркта головного мозга внутривенно вводили 1мл физиологического раствора (n=21). Срок наблюдения составлял 60 суток.

В каждой группе с клеточной терапией МСК части животных проводилась внутривенная трансплантация меченных микрочастицами оксида железа и флуоресцентными метками МСК для изучения распределения в головном мозге клеток по данным МР-исследования и последующей верификации данных гистологическим методом. В группе с введением 5×10^5 МСК (n=7) животных выводили из эксперимента спустя 2 часа (n=3), 24 часа (n=2) и 7 суток (n=3) после трансплантации. В группе с введением 2×10^6 МСК (n=14) для оценки распределения меченых МСК в головном мозге животных выводили из эксперимента спустя 2 часа (n=9), 24 часа (n=3) и 7 суток (n=2) после клеточной инфузии.

С целью оценки влияния внутривенной трансплантации МСК на активность глиальной реакции инфаркта полушария головного мозга на 7-е сутки после трансплантации 5 крыс из группы с клеточной терапией МСК в дозе 2×10^6 клеток и 5 крыс из группы контроля были выведены из эксперимента для проведения иммуногистохимического исследования.

2. Оценка и сравнительный анализ терапевтической эффективности внутривенной трансплантации ИПСК-НПК в дозе 5×10^5 (n=21) и 2×10^6 (n=18) клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга; в группе контроля крысам с моделью экспериментального инфаркта головного мозга внутривенно вводили 1мл физиологического раствора (n=21). Срок наблюдения составлял 60 суток.

В каждой исследовательской группе части животных трансплантировали меченные флуоресцентным красителем ИПСК-НПК для оценки распределения в головном мозге клеток по данным гистологического исследования. В группе с введением 5×10^5 клеток ($n=6$) животных выводили из эксперимента через 2 часа ($n=2$), 24 часа ($n=2$) и 7 суток ($n=2$) после трансплантации. В группе с трансплантацией 2×10^6 меченых клеток ($n=9$) исследование проводили через 2 часа ($n=2$), 24 часа ($n=3$) и 7 суток ($n=4$) после трансплантации.

3. Сравнительный анализ терапевтической эффективности 2×10^6 МСК ($n=30$) и ИПСК-НПК ($n=18$) при внутривенной трансплантации крысам с острой фокальной ишемией головного мозга. Срок наблюдения составлял 60 суток.

Материалы и методы исследования

Лабораторные животные

Эксперимент проводился на половозрелых самцах крыс линии Wistar весом 250-300 грамм ($n=115$), полученных из сертифицированного питомника и впоследствии содержавшихся в виварии РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Протокол экспериментального исследования был одобрен этическим комитетом (протокол №114 от 30.01.2012г.) и университетской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных (протоколы № 13/2020 от 8 октября 2020г, №24/2021 от 10.12.2021 года) ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, и выполнялись в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента от 22.09.2010г. Во время всех оперативных вмешательств, а также МР-исследования головного мозга, крысы находились под действием общей ингаляционной анестезии изофлураном (Аерран, Baxter HealthCare Corporation, США), которая проводилась с использованием аппарата для ингаляционной анестезии для лабораторных животных (E-Z-7000 Classic System, E-Z-Anesthesia® Systems, United States). Во время индукции анестезии применялась смесь 3,0-3,5% изофлурана с 97-96,5% атмосферного воздуха, а поддерживающая концентрация ингаляционного анестетика составляла 2-2,5% в газо-воздушной смеси. При оценке с помощью МРТ распределения трансплантированных меченных микрочастицами суперпарамагнитного оксида железа МСК в головном мозге крыс применялись сходные концентрации изофлурана в смеси с чистым кислородом (кислородный концентратор Jiangsu Yuyue Medical Equipment and Supply Co. Ltd. 7F-10L, 1011101). Для минимизации болевых ощущений область хирургического доступа дополнительно анестезировались раствором бупивакаина («маркаин», Recipharm Monts, Франция), а также при выявлении признаков болевого синдрома производилось дополнительное обезболивание животных раствором мелоксикама. Во избежание дегидратации в острейшем периоде инсульта проводилось дополнительное введение 1мл физиологического раствора внутривенно. По окончании срока исследования, а также для проведения гистологического исследования в динамике, крысы выводились из исследования путем ингаляционной анестезии летальной дозой изофлурана и затем дополнительной внутривенной инъекцией летальной дозы тилетамина («золетил», Virbac, Франция).

Моделирование острой фокальной ишемии головного мозга

Воспроизведение модели острой фокальной ишемии головного мозга производили путем транзиторной эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии монофиламентом по методу Koizumi в модификации Longa: в просвет внутренней сонной артерии вводился нейлоновый монофиламент с силиконовым наконечником (Docol corporation, диаметр 0.19 мм, длина 30 мм; диаметр с покрытием $0,37 \pm 0,02$ мм; длина покрытия 3-4 мм) до места отхождения средней мозговой артерии. С этого момента производился отсчет времени, необходимого для

формирования очага инфаркта головного мозга. По истечении 90 мин монофиламент извлекали, хирургическую рану ушивали.

Клеточные культуры

Мезенхимальные стволовые клетки плаценты человека

Клеточная культура была любезно предоставлена лабораторией клеточной биологии ФГБНУ Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича под руководством д.б.н., член-корреспондента РАН, профессора Ярыгина К. Н. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были выделены из плаценты здоровой женщины (участок амниона и хориона) на 38-40 неделе гестации. Биологический материал получали после подписания информированного согласия на забор клеточного материала роженицы. После выделения клеток из плаценты ферментативным способом при помощи проточной цитофлуориметрии подтверждали экспрессию типичных для МСК CD-маркеров: CD34-, CD45-, HLA-DR-, CD105+, CD29+, CD73+, CD90+. Клетки обладали мультипотентностью: были способны к дифференцировке в хондрогенном, остеогенном и адипогенном направлении. Для трансплантации использовались клеточные культуры, не старше 4-5 пассажа. Для визуализации клеток при помощи МР-исследования, а также для проведения гистологического исследования перед трансплантацией клетки нагружали двойной меткой, состоящей из микрочастиц суперпарамагнитного оксида железа (SPIO) (MC03F Bangs Laboratories, средний диаметр $0,50 \pm 0,99$ мкм) и флуоресцентного красителя Dragon Green ($\lambda_{ex} = 480$ нм, $\lambda_{em} = 520$ нм), а также красного липофильного мембранного флуоресцентного красителя PKH26 (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) по технологии фирмы производителя. Для трансплантации готовили клеточную суспензию в концентрациях 5×10^5 и 2×10^6 МСК в 1 мл физиологического раствора.

Нейрональные прогениторные клетки, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

Клеточная культура была любезно предоставлена лабораторией генетики стволовых клеток ФГБНУ «Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова» под руководством д.б.н., профессора Гольдштейна Д.В.

Нейрональные прогениторные клетки (ИПСК-НПК) были получены путем направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека согласно ранее разработанному протоколу [Nekrasov E.D. и соавт. 2016,]. Дифференцировку клеток подтверждали путем иммуноцитохимического анализа с использованием антител к нейральным маркерам. С целью исследования гистологическими методами распределения ИПСК-НПК в головном мозге при внутривенной трансплантации производилось окрашивание клеточного материала флуоресцентным липофильным мембранным красителем PKH 26 по протоколу фирмы производителя. Для трансплантации использовали суспензии клеток в дозах 5×10^5 и 2×10^6 ИПСК-НПК в 1 мл физиологического раствора.

Внутривенное введение

Через 24 ч после моделирования инфаркта головного мозга производилась катетеризация правой бедренной вены сосудистым катетером ("Docol corporation") и введение клеточного материала или физиологического раствора в исследуемых группах или группе контроля соответственно. Внутривенную клеточную трансплантацию проводили при помощи микроинжектора со скоростью 250 мкл/мин во избежание эмболии сосудов мелкого диаметра.

Магнитно-резонансное исследование

Оценку объема очага инфаркта головного мозга животных проводили на МР-томографе для малых лабораторных животных "ClinScan" ("Bruker BioSpin") с индукцией магнитного поля 7 Тл. Проводилось МР-исследование с получением диффузионно-взвешенных изображений с расчетом карт измеряемого коэффициента диффузии (TR/TE=9000/33 мс, b-факторы=0 и 1000 с/мм², размер воксела 0,35*0,35*1,0 мм) для выявления зон инфаркта мозга на ранних сроках, T2-взвешенных изображений (TurboSpinEcho, Turbo Factor=10, TR/TE=5230/46 мс, размер воксела 0,117*0,13*0,7 мм) для оценки объема очага инфаркта мозга и изображений, взвешенных по магнитной восприимчивости (SWI) (3D Gradient Echo, TR/TE=33/17 мс, угол возбуждения 15°, размер воксела 0,117*0,117*0,5 мм) для выявления геморрагических осложнений и детекции в головном мозге трансплантированных МСК, меченных микрочастицами оксида железа.

Оценку объема очага ишемии головного мозга в динамике проводили с использованием программного пакета ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) по T2-взвешенным изображениям на 1-е, 7-е, 14-е, 30-е, 60-е сутки после трансплантации (в группах клеточной терапии) или введения физиологического раствора (в группах контроля). Объем зоны инфаркта рассчитывался по формуле $V = (S_1 + \dots + S_n) * (h + d)$, где S_1 — площадь первого среза (мм²), S_n — площадь среза n (мм²), h — толщина среза (мм); d — межсрезовой промежуток (мм).

Оценка терапевтической эффективности клеточной терапии

Оценка терапевтической эффективности клеточной терапии проводилась с использованием стандартной шкалы для оценки тяжести неврологического дефицита у лабораторных грызунов Modified Neurological Severity Scores (mNSS), которая включает оценку моторных нарушений, чувствительности, координаторной функции, а также учитывает наличие экстрапирамидных расстройств и утраты безусловных рефлексов. Согласно шкале, 1-6 баллов оценивается как легкий неврологический дефицит; 7-12 – средний; 13-18 – тяжелый. Максимальное количество баллов – 18 характеризуется тяжелым состоянием животного и сопровождается утратой всех вышеперечисленных функций.

Гистологическое исследование

При исследовании распределения введенных внутривенно меченых МСК и ИПСК-НПК в головном мозге лабораторных животных с моделью острой фокальной церебральной ишемии проводили гистологическое исследование. После ингаляции летальной дозы изофлурана и внутрибрюшинной инъекции тилетамина, проводили транскардиальную перфузию 4% раствором параформальдегида на 1-кратном фосфатном буфере (PBS) с pH 7.4, и затем проводили декапитацию. При помощи вибротома (Thermo scientific, micron HM 650v) изготавливали фронтальные срезы мозга толщиной 50 мкм. Визуализацию тканей и оценку степени флуоресценции проводили с помощью цифрового флуоресцентного микроскопа Keyence BZ-9000E и лазерного сканирующего конфокального микроскопа Nikon A1R MP+.

Для оценки глиальной реакции головного мозга после внутривенной клеточной трансплантации проводили иммуногистохимическое исследование через 7 суток после введения МСК. Животных выводили из эксперимента и готовили препарат мозга, затем получали фиксированные фронтальные срезы толщиной 40 мкм, которые окрашивали антителами, специфичными к глиальным белкам (GFAP) по стандартной методике.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы "SPSS Statistics 23.0". Уровень значимости для всех экспериментов составлял $p < 0,05$.

Выживаемость животных оценивали методом Каплана—Мейера с использованием log-rank теста (с FDR поправкой на множественные сравнения) для попарного сравнения групп. Оценку терапевтической эффективности трансплантации МСК и ИПСК-НПК по динамике изменения массы тела животных и неврологического дефицита, а также изменения объема очага ишемии головного мозга в динамике проводили с помощью общей линейной модели с повторными измерениями, с учетом поправки на множественное сравнение. Оценка экспрессии GFAP производилась методом факторного дисперсионного анализа с группировкой (Nested Factorial ANOVA), с учётом данных каждого измерения у каждого экспериментального животного в исследуемых группах.

Основные результаты исследования

Результаты оценки и сравнения терапевтической эффективности внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга

За время наблюдения гибель животных во всех группах отмечалась в течение первых двух недель после моделирования инсульта. Наибольшее количество летальных исходов происходило в первые трое суток, что обусловлено процессом формирования очага инфаркта головного мозга, а также присоединением и развитием сопутствующего вазогенного отека вещества мозга и появлением геморрагической трансформации, отягощавшей состояние животных.

Сравнение групп с помощью log-rank теста с FDR-поправкой на множественные сравнения показало, что достоверных различий между группами не выявлено (Рис.1А). Таким образом, можно заключить, что внутривенная трансплантация МСК в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток не оказывает влияния на выживаемость лабораторных крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга.

При сравнении трех групп в течение срока наблюдения (60 суток) отмечалось постепенное нарастание массы животных после клеточной трансплантации (Рис.1Б). При сравнении нормированной к первым суткам массы крыс в трех группах методом общей линейной модели с повторными измерениями достоверных отличий в динамике изменения массы животных выявлено не было.

При анализе методом общей линейной модели с повторными измерениями динамики изменения функции нервной системы по шкале mNSS (Рис. 1В) выявлялись достоверные отличия при сравнении всех трех групп ($p < 0,05$). При этом имелись достоверные отличия в динамике при сравнении групп с различными концентрациями между собой, а также в сравнении каждой из них с группой контроля. При попарной оценке с использованием доверительных интервалов на 7-е сутки после трансплантации достоверно значимое различие отмечалось в группе с введением 2×10^6 МСК по сравнению с двумя другими группами ($p < 0,05$). В то время как на 14-е сутки значимые отличия отмечались при сравнении групп с клеточной терапией разными дозами с группой контроля, а также между собой ($p < 0,05$). Полученные результаты демонстрируют отсроченное начало терапевтического действия МСК в дозе 5×10^5 клеток: эффект от введения этой дозы МСК наступал на 14-е сутки. В то же время терапевтический эффект клеточной терапии 2×10^6 клеток отмечался, начиная с 7-х суток. На 30-е сутки достоверные отличия от контроля отмечались в обеих группах с клеточной терапией. А к 60-м суткам терапевтический эффект 5×10^5 МСК нивелировался, и значимые отличия отмечались при сравнении группы с 2×10^6 МСК и двух других групп ($p < 0,05$). Таким образом, полученные результаты демонстрируют терапевтическую эффективность внутривенного применения клеточной терапии МСК в обеих концентрациях. Однако, при введении в минимальной концентрации (5×10^5 клеток)

терапевтический эффект наблюдался, начиная с 14-х суток и длился менее 2-х месяцев. В то время как введение 2×10^6 МСК приводило к более быстрому, выраженному и пролонгированному воздействию на неврологический статус животных. Соответственно внутривенное применение МСК способствует более быстрому и эффективному восстановлению функции нервной системы у исследуемых крыс с моделью экспериментального инсульта. При этом терапевтическая эффективность трансплантации МСК у животных в условиях острой фокальной ишемии головного мозга носит дозозависимый характер.

При оценке динамики изменения нормированного к первым суткам объема очага ишемии головного мозга по данным МРТ у животных всех исследуемых групп методом общей линейной модели с повторными измерениями статистически значимых различий между группами выявлено не было (Рис.1Г).

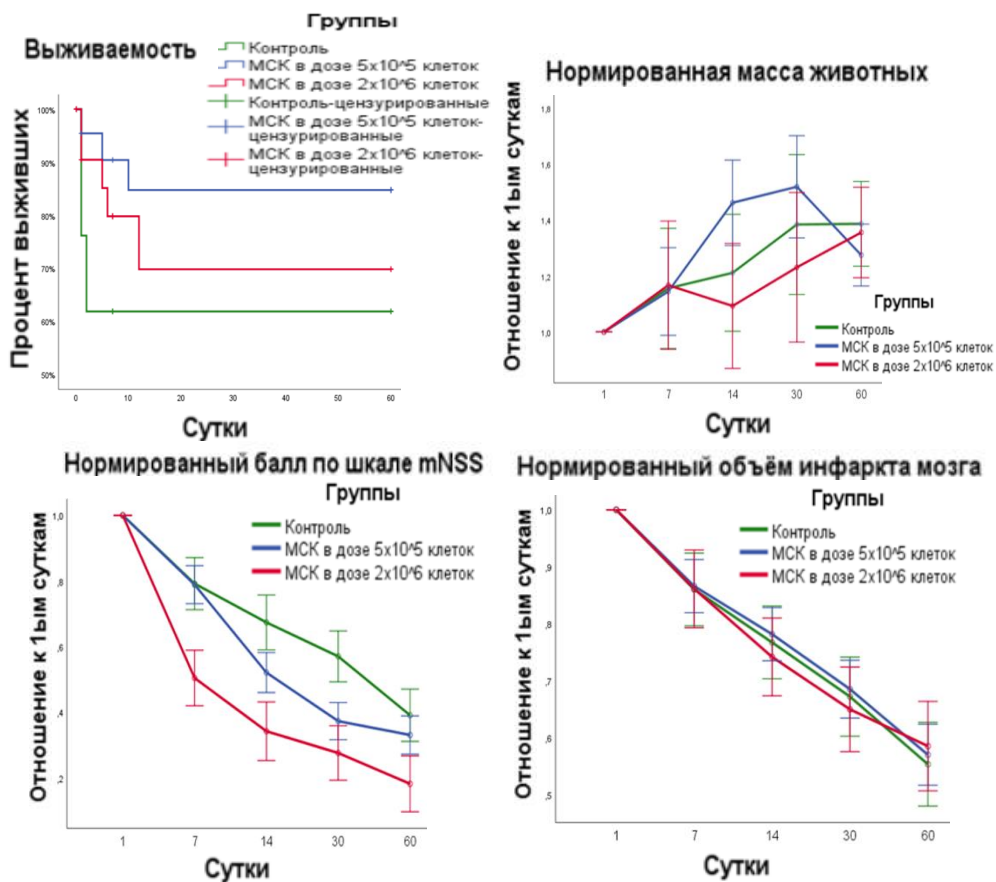


Рис.1. Оценка терапевтической эффективности МСК в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга. А– Кривые выживаемости Каплана-Мейера для исследуемых групп животных. Б-График динамики изменения массы животных. В-График динамики изменения неврологического дефицита, оцененного по шкале mNSS. Г - График динамики изменения объема очага ишемии головного мозга по данным МРТ. На графиках Б-Г представлены средние значения и стандартные отклонения.

Результаты настоящего исследования демонстрируют терапевтическую эффективность внутривенной трансплантации МСК крысам с моделью острой фокальной ишемии головного мозга. При этом, согласно полученным данным, инфузия МСК в дозах 5×10^5 и 2×10^6 клеток достоверно уменьшает степень выраженности неврологического дефицита у лабораторных животных по сравнению с группой контроля, но не оказывает значимого влияния на выживаемость, изменение массы тела животных и динамику изменения объема очага ишемии головного мозга, что согласуется с данными других исследователей [Steiner В. и соавт., 2012]. Результаты исследования продемонстрировали, что внутривенная трансплантация МСК имеет дозозависимый эффект: с увеличением дозы вводимых клеток до 2×10^6 возросла скорость и степень восстановления неврологических функций у крыс с моделью экспериментального инфаркта головного мозга. Но следует отметить, что увеличение дозировки не оказало значимого влияния на выживаемость лабораторных животных, а также на динамику изменения объема инфаркта мозга.

Результаты оценки и сравнения терапевтической эффективности внутривенной трансплантации нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга

При оценке показателя выживаемости лабораторных животных с помощью log-rank теста с FDR-поправкой на множественные сравнения наблюдались достоверные отличия обеих групп с введением ИПСК-НПК по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). При этом не было выявлено значимых различий по данному показателю при сравнении групп с клеточной терапией ИПСК-НПК между собой (Рис. 2А).

Сравнение нормированной к первым суткам массы крыс в трех группах производилось методом общей линейной модели с повторными измерениями. При оценке по данному показателю достоверных отличий в динамике изменения массы животных выявлено не было (Рис. 2Б).

Анализ динамики изменения неврологического дефицита по показателям шкалы mNSS, нормированным к первым суткам, производился методом общей линейной модели с повторными измерениями. При сравнении полученных данных по тренду регресса неврологического дефицита были выявлены достоверные отличия в группе с введением 2×10^6 клеток по сравнению с группой клеточной терапии 5×10^5 ИПСК-НПК и контролем ($p < 0,05$) (Рис. 2В).

При анализе динамики изменения нормированного к первым суткам объема очага ишемии головного мозга по данным МРТ для всех исследуемых групп методом общей линейной модели с повторными измерениями, во всех группах исследования отмечалось постепенное уменьшение объема зоны инфаркта мозга, при этом статистически значимых различий выявлено не было (Рис. 2Г).

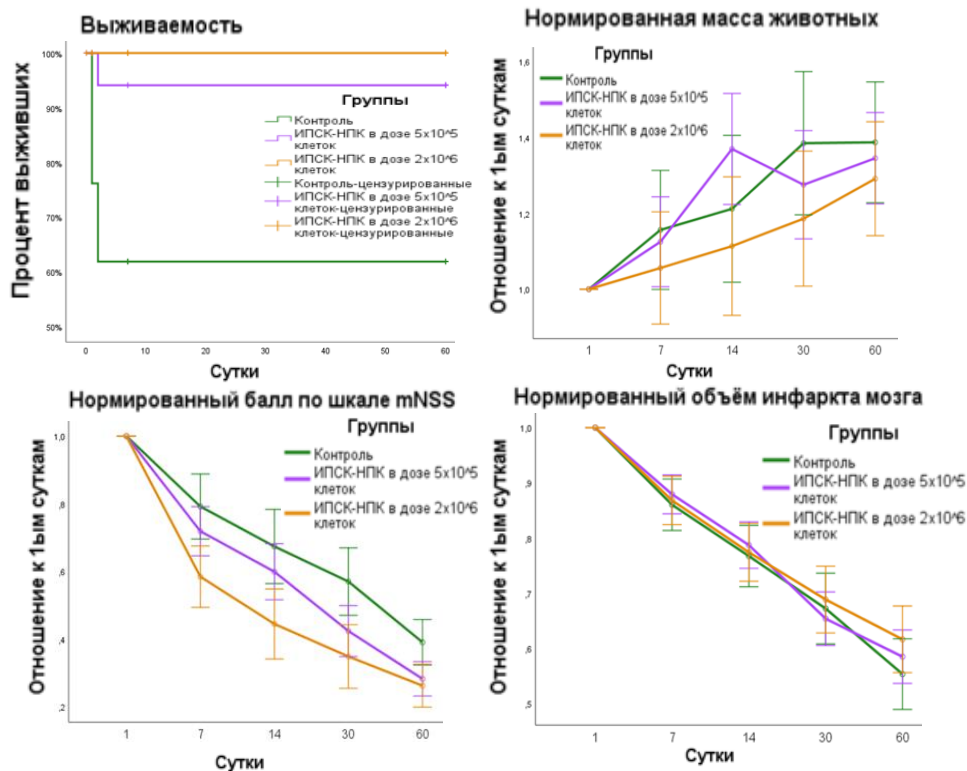


Рис.2. Оценка терапевтической эффективности ИПСК-НПК в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга. А– Кривые выживаемости Каплана-Мейера для исследуемых групп животных. Б-График динамики изменения массы животных. В-График динамики изменения неврологического дефицита, оцененного по шкале mNSS. Г - График динамики изменения объема очага ишемии головного мозга по данным МРТ. На графиках Б-Г представлены средние значения и стандартные отклонения

Таким образом при оценке терапевтической эффективности внутривенной трансплантации ИПСК-НПК было выявлено достоверное значимое влияние клеточной терапии на показатель выживаемости, независимо от дозы клеточного материала. Также наблюдался достоверно более выраженный регресс неврологического дефицита при внутривенной трансплантации ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток. При этом трансплантация ИПСК-НПК в обеих дозах не оказывала влияния на динамику изменения массы исследуемых животных и уменьшения объема очага ишемии по данным МР-исследования на протяжении 60 суток.

Результаты сравнения терапевтической эффективности внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в дозе 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга

При сравнении групп с клеточной терапией МСК и ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток по показателю смертности выявлялись следующие отличия: в группе с введением 2×10^6 ИПСК-НПК не было зарегистрировано ни одного смертельного случая, в то время как в группе с введением такой же дозы МСК гибель животных происходила в течение первых 12 суток. При оценке выживаемости лабораторных животных методом Каплана Мейера наблюдалось значимое влияние трансплантации 2×10^6 ИПСК-НПК по сравнению с группой с введением 2×10^6 МСК ($p < 0,05$) (Рис. 3А).

При оценке динамики изменения неврологического дефицита, согласно показателям шкалы mNSS, нормированным к первым суткам, методом общей линейной модели с повторными измерениями, не отмечалось достоверных отличий между группами с внутривенной трансплантацией МСК и ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток (Рис. 3Б).

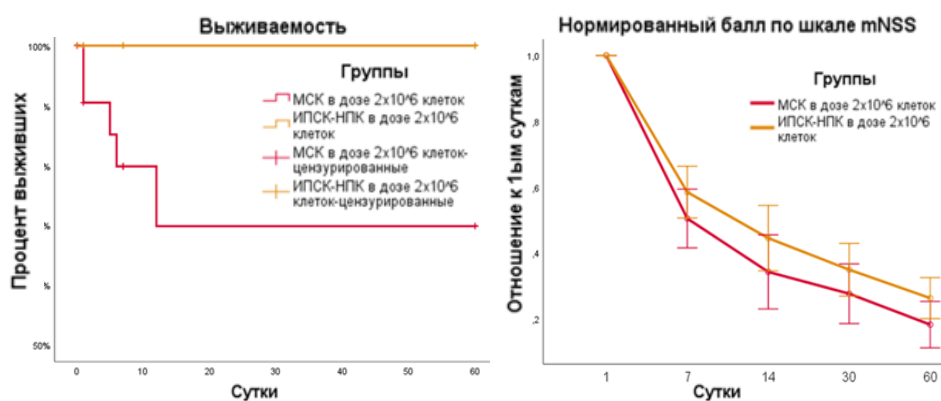


Рис. 3. Сравнение терапевтической эффективности внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в дозе 2×10^6 клеток у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга. А – Кривые выживаемости Каплана-Мейера для исследуемых групп животных. Б - График динамики изменения нормированного (к первым суткам) неврологического дефицита, оцененного по шкале mNSS. представлены средние значения и стандартные отклонения.

Таким образом, на основании полученных данных исследования, можно заключить, что внутривенная трансплантация двух различных типов клеток, МСК и ИПСК-НПК, в одинаковой дозе 2×10^6 клеток оказывает равный по выраженности эффект на восстановление неврологического статуса у лабораторных крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга. Однако, только применение ИПСК-НПК в этой дозировке значительно улучшает выживаемость лабораторных животных, в то время как инфузия МСК не оказывает на данный показатель значимого влияния.

Результаты исследования распределения клеток после внутривенной трансплантации

Изучение распределения меченных микрочастицами оксида железа МСК в головном мозге при одновременной внутривенной трансплантации оценивали при помощи динамического МР-сканирования в режиме реального времени с получением изображений, взвешенных по магнитной восприимчивости (на основе импульсной последовательности SWI TR/TE/FA=50/19,1/15 толщиной 0,5 мм) и временем одной фазы 7 минут. При проведении внутривенной трансплантации МСК в дозировке 5×10^5 клеток у 1 крысы из 7 выявлялись

единичные зоны гипоинтенсивного сигнала при исследовании головного мозга с помощью МРТ в режиме SWI, соответствующие единичным скоплениям меченых МСК через 1 час после введения. При этом у других животных не было зафиксировано присутствие меченых МСК в головном мозге по данным МРТ в режиме реального времени в течение 1 часа после трансплантации. Через 24 часа (а также через 7 суток) после внутривенной трансплантации меченые клетки, по данным МРТ, в головном мозге не визуализировались. При проведении последующего гистологического исследования образцов головного мозга животных данной экспериментальной группы меченные двойной меткой МСК визуализировались в единичном количестве через 2 часа после трансплантации.

Единичное количество трансплантированных МСК в головном мозге или их отсутствие может быть связано с фильтрацией основной массы клеток паренхиматозными органами при их прохождении по малому и большому кругам кровообращения. Дополнительно для подтверждения данной гипотезы было проведено гистологическое исследование образцов ткани паренхиматозных органов. По данным конфокальной микроскопии при внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 клеток были визуализированы меченые клетки в тканях паренхиматозных органов через 2 часа (в образцах легких) и 24 часа (в ткани легких и печени) после клеточной инфузии (Рис. 4).

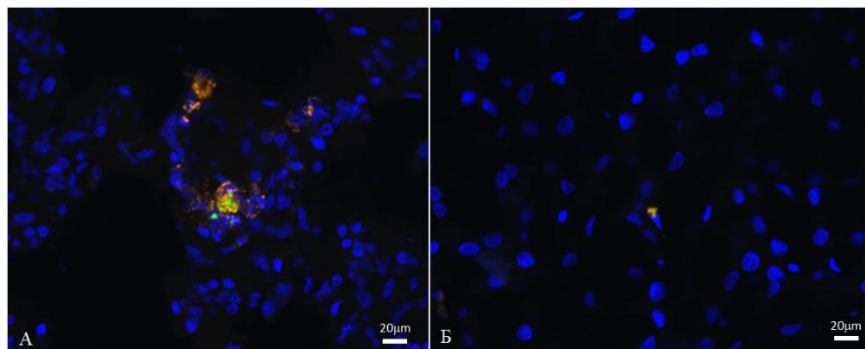


Рис. 4. Визуализация МСК в ткани легкого (А) и печени (Б) крысы через 24 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 5×10^5 клеток. Данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: зеленая флюоресценция соответствует SPIO (GFP) меченым МСК, красно-оранжевая флюоресценция - липофильному мембранному красителю РКН 26. Ядра докрашены DAPI. Масштабный отрезок равен 20 мкм.

На следующем этапе нашей работы были изучены особенности распределения МСК в головном мозге крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга после внутривенной трансплантации 2×10^6 клеток. На протяжении времени трансплантации МСК, а также в течение 1 часа после введения непрерывно проводили МР-сканирование в режиме SWI с получением изображений взвешенных по магнитной восприимчивости. Согласно полученным данным, распределение трансплантированных клеток в головном мозге во время и после внутривенной инфузии имело диффузный характер: клетки детектировались в стволе мозга, мозжечке, в области подкорковых структур (таламуса, стриатума, белого шара и др.), а также в области гиппокампа и неокортекса как в ипсилатеральном очагу инфаркта, так и в контралатеральном полушарии. В области очага ишемии отмечалось относительно меньшее по количеству накопление МСК, что вероятно связано с локальным отеком вещества головного мозга. Повторное МР-сканирование головного мозга через 24 часа и 7 суток после введения клеток

также проводили в режиме SWI высокого разрешения, при этом меченых МСК на данных сроках не было обнаружено (Рис.5).

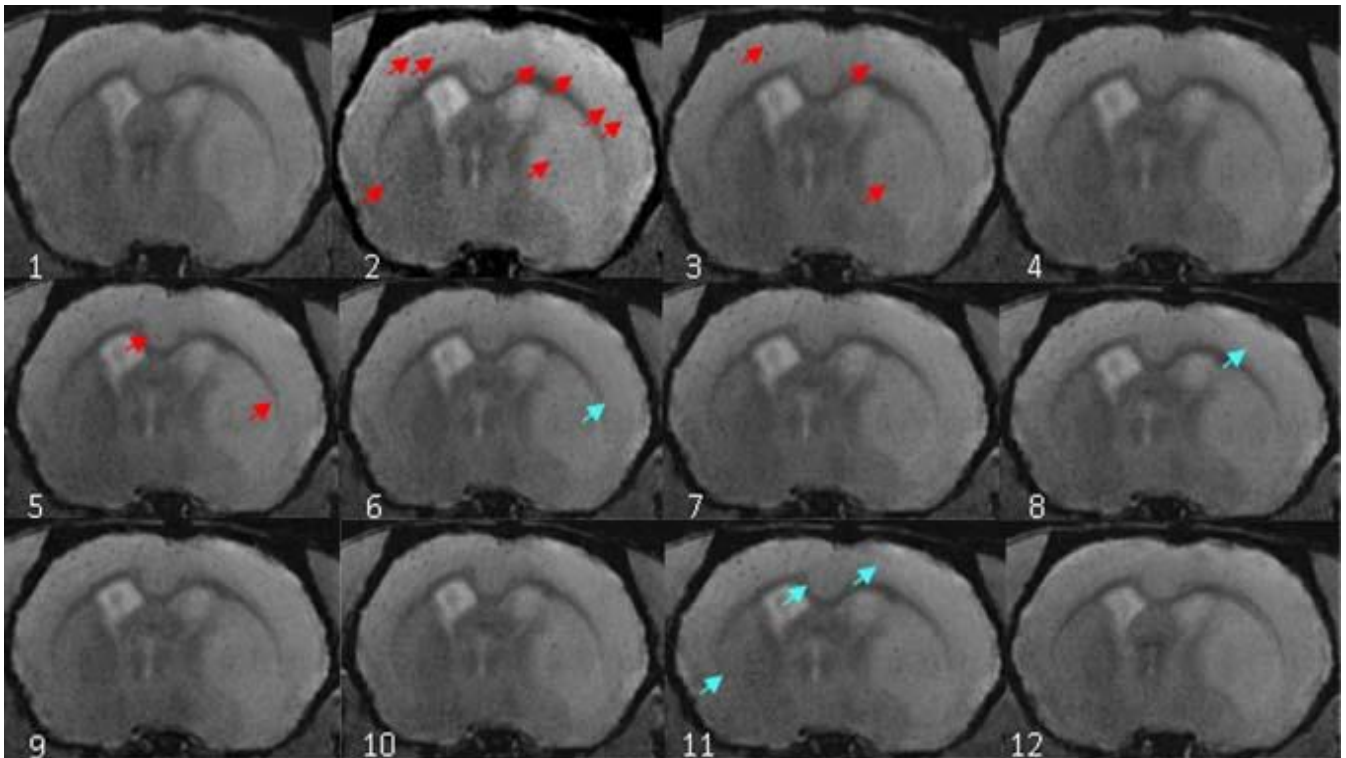


Рис. 5. На рисунке изображены примеры МР изображений одного среза головного мозга в режиме SWI, полученные в течение 1 часа с начала введения МСК в дозе 2×10^6 клеток. 1 - начало трансплантации, МСК в веществе головного мозга не определяются. На изображениях 2-11 определяются зоны гипоинтенсивного сигнала, соответствующие скоплению МСК, меченых микрочастицами оксида железа (красные стрелки). В течение срока сканирования отмечается появление «новых» МСК в различных церебральных структурах и «исчезновение» ранее детектируемых клеток (голубые стрелки). 12-МР-изображение в режиме SWI через 24 часа после клеточной трансплантации, меченые МСК не визуализируются.

При анализе МР-изображений, полученных в режиме реального времени при внутривенном введении МСК было выявлено, что трансплантированные клетки начинают визуализироваться в мозге, начиная с 7-й минуты после начала трансплантации. С течением времени появлялось больше зон гипоинтенсивного сигнала на SWI (накопление клеток) в одних областях, в то время как в других областях сигнал «пропадал», что может свидетельствовать о том, что клетки не задерживались в церебральных структурах, а направлялись с током крови далее по сосудистому руслу. По данным МРТ, максимальное количество МСК в головном мозге детектировалось в течение первого часа после начала трансплантации, а к исходу часа отмечалось уменьшение количества гипоинтенсивных областей, соответствующих сигналу от меченых МСК (Рис. 6).

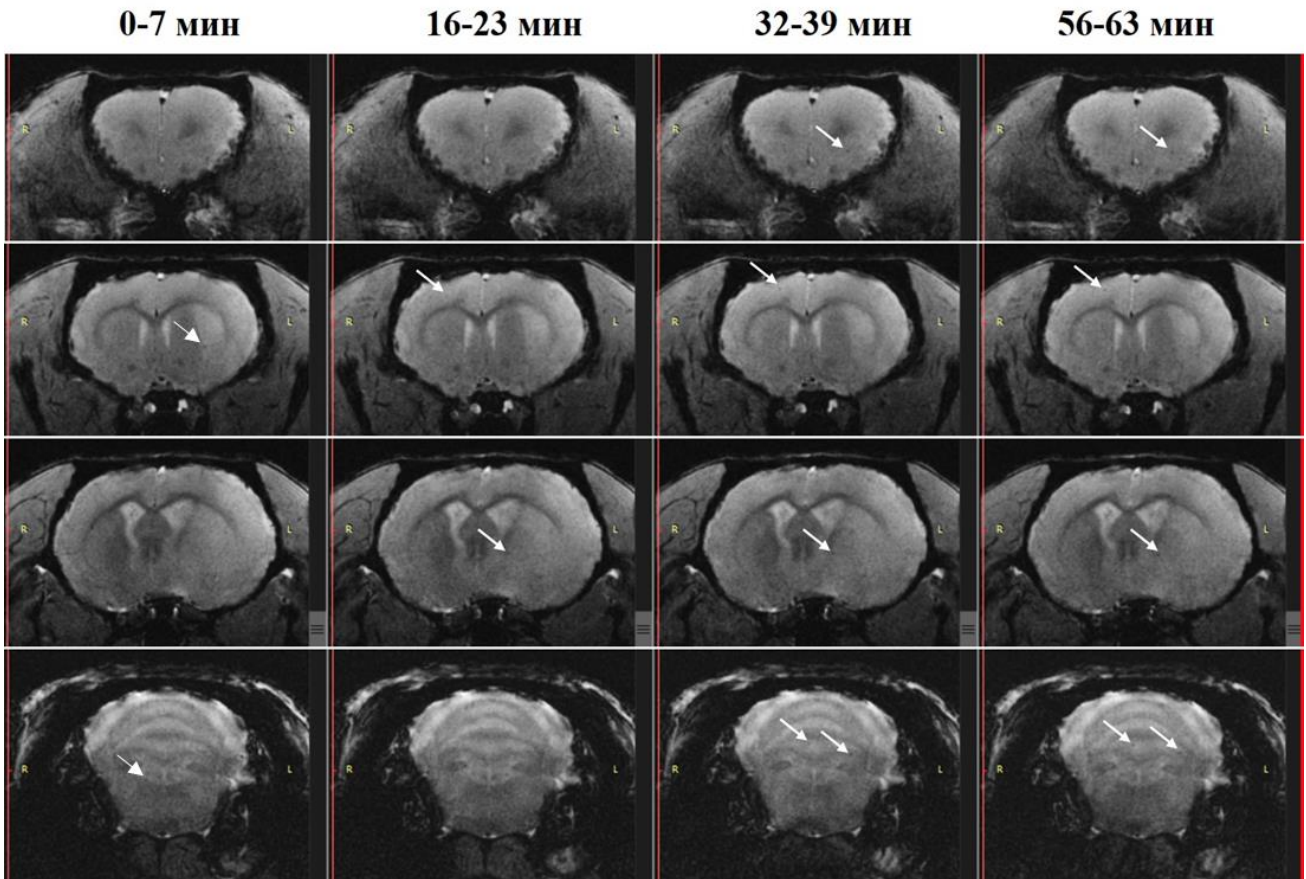


Рис. 6. Примеры данных МРТ головного мозга крысы, полученные в процессе внутривенной трансплантации меченых МСК в дозе 2×10^6 клеток. Представлены МР-изображения в SWI-режиме в аксиальной проекции в динамике в различные промежутки времени: от 0 до 63 минуты. Белые стрелки указывают на гипоинтенсивные области, которые соответствуют местам скопления SPiO-меченных МСК.

По данным гистологического исследования меченные флуоресцентными метками МСК визуализировались в препаратах головного мозга крыс с моделью инфаркта мозга в единичном количестве в обоих полушариях через 2 часа после внутривенной трансплантации (Рис. 7). Через 24 часа и 7 суток после введения трансплантированных клеток в образцах головного мозга обнаружено не было.

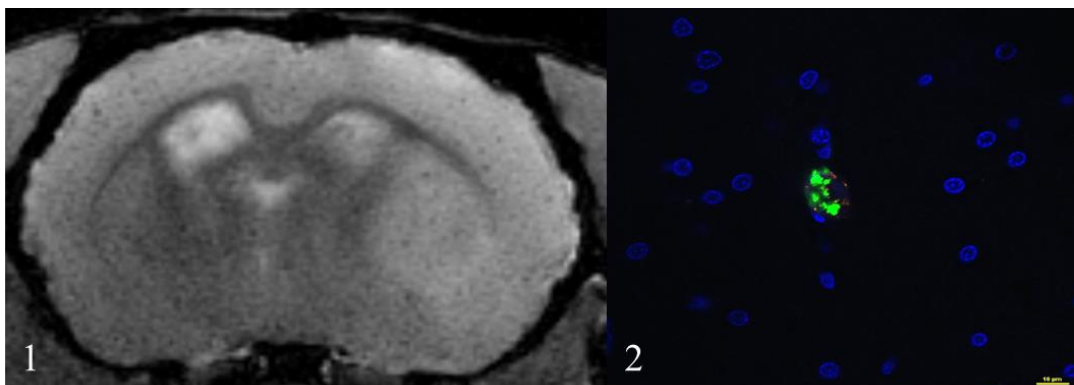


Рис. 7. Визуализация МСК в головном мозге лабораторных крыс через 2 часа после внутривенной трансплантации в дозе 2×10^6 клеток. Представлены данные МРТ головного мозга крыс (1) и данные гистологического исследования (2). 1 - на МР-изображениях в режиме SWI визуализируются участки гипоинтенсивного сигнала, соответствующие скоплениям SPiO-меченных МСК. 2 - данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: зеленая

флюоресценция соответствует SPIO-меченым клеткам (GFP), красно-оранжевая - липофильному мембранному красителю РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. На микрофотографии визуализируется единичная клетка, несущая двойную метку. Масштабный отрезок составляет 10 мкм.

Также дополнительно проводилась визуализация МСК при внутривенном введении 2×10^6 клеток при помощи гистологического исследования образцов паренхиматозных органов: легких, печени, селезенки, почек через 2 часа и 24 часа после трансплантации. При конфокальной микроскопии образцов ткани легких были выявлены в обе временные точки в большом количестве трансплантированные МСК, которым соответствовал флуоресцентный сигнал в зеленом (SPIO+GFP) и красном (РКН 26) спектре. При этом через 2 часа после трансплантации в других паренхиматозных органах определялись только частицы SPIO, конъюгированные с GFP. Спустя 24 часа после трансплантации МСК с двойной меткой были обнаружены также в ткани печени (Рис. 8).

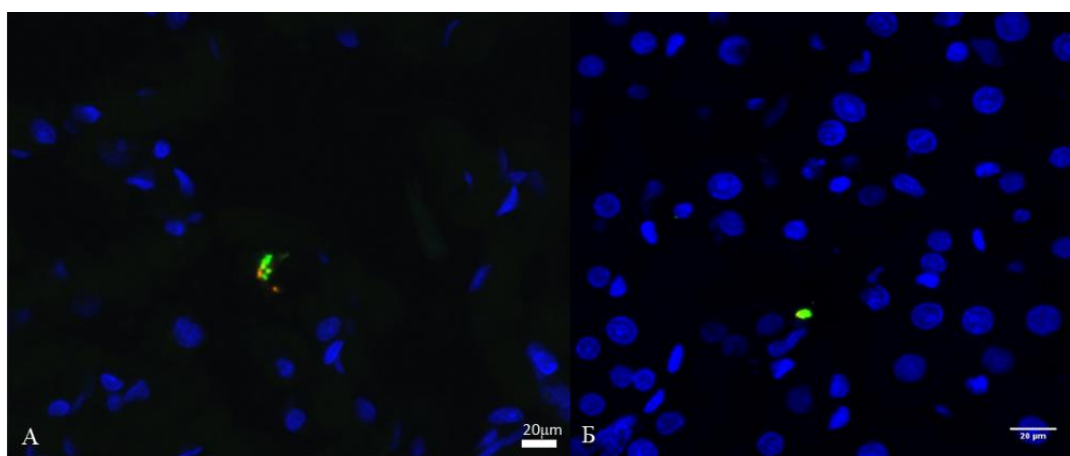


Рис 8. Визуализация МСК в ткани легких (А) и печени (Б) через 24 часа после внутривенной трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток по данным конфокальной микроскопии. Зеленая флюоресценция соответствует GFP, красно-оранжевая - РКН 26, синяя - ядерному красителю DAPI. Визуализируется клетка, несущая двойную метку Масштабный отрезок составляет 20 мкм.

Таким образом, при внутривенном введении МСК в дозе 2×10^6 клеток небольшое, однако детектируемое количество трансплантированных клеток, визуализируется в головном мозге по данным МРТ, что также подтверждается данными гистологического исследования. При этом распределение трансплантированных клеток происходит по обоим полушариями головного мозга и носит диффузный характер. Наибольшее количество трансплантированных МСК в головном мозге детектируется в течение 1-2 часов после трансплантации, однако, клетки задерживаются в головном мозге не более чем 24 часа, после чего элиминируются. Помимо визуализации в головном мозге, так же как и в случае трансплантации 5×10^5 клеток, при введении МСК в дозе 2×10^6 меченые клетки определялись в паренхиматозных органах.

При исследовании гистологическими методами распределения меченных флуоресцентной меткой РКН26 ИПСК-НПК, введенных внутривенно в двух дозировках, трансплантированные клетки в ткани головного мозга, не были выявлены ни у одного животного из исследуемых групп ни в одной временной точке. При этом меченные клетки по данным конфокальной микроскопии детектировались в паренхиматозных органах.

Результаты оценки активности глиальной реакции в полушарии инфаркта головного мозга крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга после внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток.

В рамках изучения механизмов действия мезенхимальных стволовых клеток, было исследовано влияние внутривенной клеточной трансплантации МСК (в дозе 2×10^6 клеток) на активность глиальной реакции в области коры полушария инфаркта головного мозга лабораторных животных по данным иммуногистохимического исследования через 7 суток после введения. Оценка экспрессии GFAP производилась при помощи анализа интенсивности флюоресценции вещества головного мозга в указанной зоне по данным конфокальной микроскопии (Рис.9).

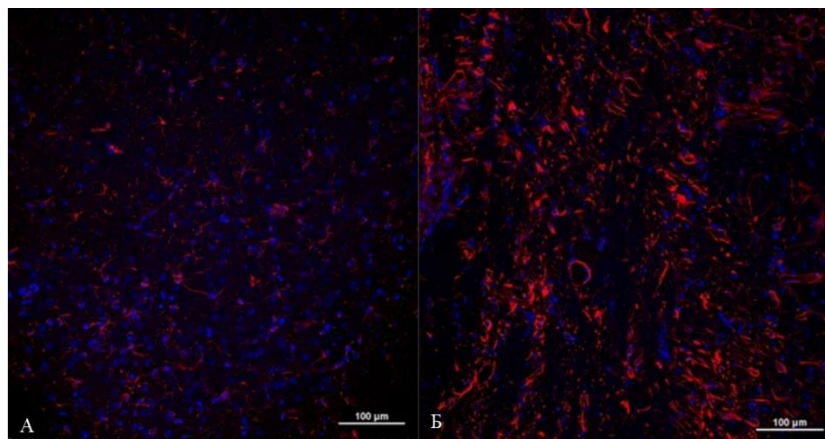


Рис. 9. Активность экспрессии GFAP клетками нейроглии в области коры полушария инфаркта головного мозга крысы из группы клеточной терапии МСК (А) и крысы из группы контроля (Б). Данные конфокальной микроскопии, совмещенное изображение: красная флюоресценция соответствует окраске антителами к GFAP, ядра докрашены DAPI. Масштабный отрезок равен 100 мкм.

При оценке выраженности глиальной реакции в области коры головного мозга в полушарии инфаркта методом факторного дисперсионного анализа с группировкой (Nested Factorial ANOVA) была выявлена достоверно более низкая экспрессия GFAP в исследуемой области мозга у крыс из группы клеточной терапии МСК по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$) (Рис.10).

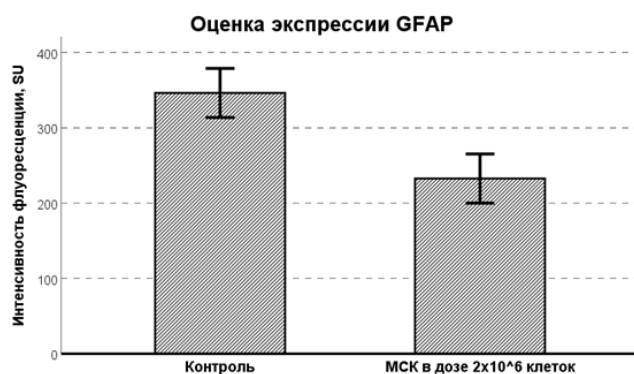


Рис. 10. Диаграмма оценки экспрессии GFAP в области коры полушария инфаркта головного мозга крыс в группе контроля (инфузия физиологического раствора) и группе клеточной терапии МСК (трансплантация 2×10^6 клеток) на 7-е сутки после введения.

Резюмируя проведенное исследование клеточной терапии на модели экспериментального инфаркта головного мозга у крыс можно заключить, что мезенхимальные стволовые клетки оказывают положительный терапевтический эффект на течение ишемии головного мозга. Полученные данные об особенностях влияния МСК на процесс восстановления лабораторных животных с моделью экспериментального инфаркта головного мозга, дозозависимом эффекте внутривенной трансплантации МСК, а также результаты исследования механизмов действия трансплантированных клеток на ткань головного мозга создадут основу для дальнейшего изучения эффективности клеточной терапии и последующего перехода к исследованиям в клинической практике.

ВЫВОДЫ

1. Терапевтическая эффективность внутривенной трансплантации МСК лабораторным животным с моделью острой фокальной ишемии головного мозга носит дозозависимый характер. Применение МСК в дозе 5×10^5 клеток значительно влияет на восстановление неврологических функций с 14 суток после клеточной инфузии, при этом терапевтический эффект длится до 30-го дня после трансплантации. Внутривенная трансплантация 2×10^6 МСК достоверно улучшает функциональное восстановление крыс, начиная с 7-х суток после введения, при этом длительность эффекта составляет 60 суток.

2. Внутривенная трансплантация ИПСК-НПК в дозе 5×10^5 и 2×10^6 клеток приводит к значимому улучшению выживаемости лабораторных крыс, однако только трансплантация 2×10^6 ИПСК-НПК способствует восстановлению функций нервной системы лабораторных животных с моделью инфаркта головного мозга.

3. При сравнении терапевтической эффективности внутривенной трансплантации МСК и ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 клеток не отмечалось значимой разницы при оценке динамики восстановления неврологического дефицита. При этом только трансплантация ИПСК-НПК оказывала значимое влияние на выживаемость лабораторных крыс с моделью ишемического инфаркта головного мозга.

4. При внутривенной трансплантации распределение МСК в головном мозге лабораторных крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга носит диффузный характер по данным МРТ в режиме реального времени. При этом клетки в малом количестве детектируются в обоих полушариях в течение первого часа после введения, после чего постепенно элиминируются из головного мозга, и не обнаруживаются спустя 24 часа после введения.

5. По данным гистологического исследования при внутривенной трансплантации МСК обнаруживаются в единичном количестве в обоих полушариях головного мозга через 2 часа после внутривенной трансплантации, и спустя 24 часа из головного мозга элиминируются. При этом отмечается накопление трансплантированных МСК в тканях паренхиматозных органов, в которых клетки визуализируются до 24 часов.

6. По данным иммуногистохимического исследования на 7-е сутки после внутривенной трансплантации МСК отмечается значимое уменьшение активности глиальной реакции в области коры полушария инфаркта у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании полученных в настоящем исследовании результатов разработаны следующие практические рекомендации для использования в клинической, научно-исследовательской и преподавательской деятельности:

1. Применение клеточной терапии мезенхимальными стволовыми клетками на животных моделях экспериментального инфаркта головного мозга имеет дозозависимый характер, что следует учитывать при разработке протокола клеточной терапии на клинической стадии исследования.

2. Для выполнения внутривенной трансплантации стволовых клеток в экспериментальных исследованиях следует применять протокол введения, составленный с учетом размеров трансплантированных клеток, оптимальной дозы и скорости введения клеточной суспензии.

3. С целью проведения прижизненной визуализации меченных микрочастицами оксида железа мезенхимальных стволовых клеток и распределения их в головном мозге лабораторных крыс при внутривенной трансплантации целесообразно использовать метод динамического МР-сканирования с получением изображений взвешенных по магнитной восприимчивости (на основе импульсной последовательности SWI TR/TE/FA=50/19,1/15 толщиной 0,5 мм) и временем одной фазы 7 минут, что позволяет детектировать единичные скопления меченых трансплантированных клеток.

4. Данные МР-сканирования, применяемые для прижизненной визуализации меченных микрочастицами оксида железа мезенхимальных стволовых клеток и изучения их распределения в головном мозге, соотносятся с данными гистологического исследования. Предпочтение МРТ для детекции трансплантированных клеток позволяет сократить количество животных, задействованных в эксперименте.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ

1. Черкашова, Э.А. Сравнительный анализ эффектов внутривенного введения мезенхимных стромальных клеток плаценты и нейральных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток, на течение острого ишемического инсульта у крыс / Бурунова В.В., Бухарова Т.Б., Губский И.Л. и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – Автономная некоммерческая организация Издательство Российской академии медицинских наук – 2018. – № 4. – С. 244-254

2. Черкашова, Э.А. Клеточная терапия ишемического инсульта. Типы стволовых клеток и результаты доклинических исследований / Таирова Р.Т., Сухинич К.К., Губский Л.В., Ярыгин К.Н. и др. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2018. – Т. 118, № 9-2. – С. 69-75

3. Черкашова, Э.А. Клеточная терапия ишемического инсульта. Результаты клинических исследований и перспективы применения в Российской Федерации // Таирова Р.Т., Губский Л.В., Ярыгин К.Н. и др. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2018. – Т. 118, № 12-2. – С. 94-104

4. Черкашова, Э.А. Методы получения индуцированных плюрипотентных клеток и их применение в терапии заболеваний центральной нервной системы / Наместникова Д.Д., Губский

Л.В., Ярыгин К.Н. и др. // **Вестник трансплантологии и искусственных органов**. - Москва: Издательство Российской академии медицинских наук - 2019. - №4. – С. 253-261

5. Черкашова Э.А. Оценка эффективности и распределения мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека и нейральных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, при их внутривенной трансплантации крысам с острой фокальной ишемией головного мозга. / Бурунова В.В., Губский Л.В., Ярыгин К.Н. и др. // **Нейронаука для медицины и психологии: XVII Международный междисциплинарный конгресс: труды конгресса**. - Судак, Крым - Москва: МАКС Пресс, 2021. - С. 418-421

6. Черкашова, Э.А. Системная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальном инфаркте мозга / Черкашова Э.А., Губский Л.В., Ярыгин К.Н. и др. // **Нейронаука для медицины и психологии: XVIII Международный междисциплинарный конгресс: Труды Конгресса**. – Москва: МАКС Пресс, 2022. – С. 244-245

7. Черкашова, Э.А. Дозозависимый эффект внутривенной трансплантации мезенхимных стволовых клеток у крыс с острой фокальной ишемией головного мозга // Наместникова Д.Д., Губский Л.В., Ярыгин К.Н. и др.// **Клеточные технологии в биологии и медицине**. - 2022 – № 2 – С. 67-72

8. Cherkashova E.A. Effects of intra-arterial and intravenous transplantation of induced pluripotent stem cells-derived neural progenitor cells on ischemic stroke recovery in rats. / I.L. Gubskiy, L.V. Gubsky, S.L. Kiselev, K.N. Yarygin et al. // **European Stroke Organisation: European Stroke Journal** – 2018. - Т. 3(IS) – С. 531

9. Cherkashova E.A. Cell therapy of ischemic stroke: studies using the rat middle cerebral artery occlusion model. / D.D. Namestnikova, S.L. Kisilev, V.P. Chekhonin, L.V. Gubsky. et al. // **CTERP INTERNATIONAL CONFERENCE “Translational Research in Cell Therapy”**: материалы конференции – Москва - 2018. – С. 26

10. Cherkashova E.A. Comparative Analysis of the Effects of Intravenous Administration of Placental Mesenchymal Stromal Cells and Neural Progenitor Cells Derived from Induced Pluripotent Cells on the Course of Acute Ischemic Stroke in Rats. / V. V. Burunova, L. V. Gubskii, S. L. Kisevev, K. N. Yarygin. et al. // **Journal Bulletin of Experimental Biology and Medicine** – 2019. - №4. – Т. 166, С. 558-566 **Scopus**

11. Cherkashova E.A. Methods of Generation of Induced Pluripotent Stem Cells and Their Application for the Therapy of Central Nervous System Diseases / G. E. Leonov, L. V. Gubskii, D. V. Goldstein, K. N. Yarygin et al. // **Journal Bulletin of Experimental Biology and Medicine** – 2020. – Т. 168, С. 566–573 **Scopus**

12. Cherkashova E. Real-time MRI of mesenchymal stem cell distribution in rat brain after intra-arterial and intravenous transplantation in experimental stroke. / I. Gubskiy, L. Gubskiy, K. Yarygin. et al. // **International Journal of Stroke**. – 2021. - Volume 16 - Issue 2 – P. 101-102

13. Cherkashova E.A. Dose-Dependent Effects of Intravenous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Rats with Acute Focal Cerebral Ischemia D.D. Namestnikova, L.V. Gubsky, K.N. Yarygin et al. // **Cell Technologies in Biology and Medicine** -2022 - № 2 – С. 514-518. **Scopus**

Список сокращений и условных обозначений

ИПСК-НПК – нейральные прогениторные клетки, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

МРТ – магнитно-резонансная томография

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

GFAP – glial fibrillary acidic protein

GFP – green fluorescent protein

SPIO – superparamagnetic iron oxide

SWI – susceptibility-weighted imaging

WHO – World Health Organization