

Наместникова Дарья Дмитриевна

**ВЛИЯНИЕ ВНУТРИАРТЕРИАЛЬНОГО И ИНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОГО
ВВЕДЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ТЕЧЕНИЕ
И ИСХОД ОСТРОЙ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У
КРЫС**

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, доцент
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России, Академия постдипломного образования, кафедра нервных болезней и нейрореабилитации, заведующий

Екушева Евгения Викторовна

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

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

Морозов Сергей Георгиевич

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 (ИИ) является одной из ведущих причин смертности и инвалидизации как в Российской Федерации, так и во всем мире [Гусев и соавт., 2018; Kim и соавт., 2020]. На сегодняшний день основным методом лечения данного заболевания является реперфузионная терапия, ограниченная узким «терапевтическим окном» и имеющая ряд ограничений и противопоказаний [Акжигитов и соавт., 2021; Powers и соавт., 2019]. У большинства пациентов после перенесенного ИИ сохраняется пожизненный неврологический дефицит в связи с формированием зоны инфаркта головного мозга. Разработка новых подходов к терапии ИИ остается актуальной задачей и одним из таких подходов могут стать регенеративные клеточные технологии. В последние десятилетия были получены данные о положительном терапевтическом эффекте трансплантации различных типов стволовых клеток (СК) как на экспериментальных моделях у животных, так и при первых клинических испытаниях [Singh и соавт., 2020]. Среди всех типов СК мезенхимальные стволовые клетки (МСК) имеют ряд преимуществ, среди которых важно отметить их высокую эффективность, безопасность, низкую иммуногенность, иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства, относительную легкость культивирования и возможность получения без биоэтических проблем [Li и соавт., 2021; Rascón-Ramírez и соавт., 2021]. Несмотря на проведенные исследования, до сих пор остаются не до конца изученными механизмы терапевтического действия МСК и, как следствие, нет единого мнения об оптимальном способе, дозе, сроках и других параметрах трансплантации, а также об их распределении и путях миграции в головном мозге [Lukomska и соавт., 2019]. Следует отметить, что внутриартериальный и интрацеребральные пути трансплантации клеток, обеспечивающие наиболее быструю и эффективную доставку клеток в пораженный участок мозга при острой ишемии, изучены недостаточно, возможно по причине их относительной сложности. Таким образом, изучение терапевтической эффективности, особенностей распределения и миграции, механизмов действия МСК при этих путях трансплантации крысам с моделью острой фокальной ишемии является актуальным и имеет научно-практическую значимость. Для дальнейшего изучения данной научной проблемы необходимым условием является эффективное моделирование экспериментального инфаркта мозга у лабораторных грызунов. Среди всех существующих методов наиболее близко имитирующей ИИ у человека является модель острой фокальной ишемии головного мозга методом эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии (СМА) с использованием монофиламента [Fluri и соавт., 2015; Koizumi и соавт., 1986; Longa и соавт., 1989]. Несмотря на широкое применение данной методики и её модификаций, подбор филамента и детекция его внутрисосудистого положения остаются непростыми задачами. В связи с этим, необходима дальнейшая оптимизация методики и разработка способа контроля эндоваскулярного положения филамента.

Цель и задачи

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния внутриартериального и интрацеребрального введения мезенхимальных стволовых клеток на течение и исход острой фокальной ишемии головного мозга у крыс.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи.

1. Усовершенствовать модель острой фокальной ишемии головного мозга методом эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии у крыс путем разработки метода интраоперационного контроля внутрисосудистого положения филамента при помощи магнитно-резонансной томографии.

2. Изучить и сравнить выживаемость лабораторных животных при внутриартериальном и интрацеребральном введениях МСК при острой фокальной ишемии головного мозга.

3. Изучить и сравнить динамику изменения веса лабораторных животных при внутриартериальном и интрацеребральном введениях МСК при острой фокальной ишемии головного мозга.

4. Изучить и сравнить динамику изменения общего неврологического дефицита, а также моторную функцию передних конечностей лабораторных животных при внутриартериальном и интрацеребральном введениях МСК при острой фокальной ишемии головного мозга.

5. Изучить и сравнить распределения и миграцию МСК в головном мозге после их интрацеребральной и внутриартериальной трансплантации крысам с моделью острой фокальной ишемии мозга, а также у интактных животных.

6. Исследовать механизмы, обеспечивающие неравномерное распределение трансплантированных МСК в головном мозге после их внутриартериального введения крысам с моделью острой фокальной ишемии головного мозга.

Теоретическая и практическая значимость работы

Усовершенствование методики моделирования острой фокальной ишемии головного мозга у крыс путем МРТ-контроля положения филамента позволит повысить эффективность моделирования инфаркта мозга в доклинических исследованиях и внесет вклад в развитие экспериментальной неврологии и патологической физиологии. Полученные в ходе исследования результаты также внесут вклад в понимание фундаментальных механизмов действия, миграции и хоуминга МСК и могут быть использованы при разработке биомедицинских клеточных технологий лечения инсульта и подготовке к клиническим испытаниям.

Научная новизна работы

В ходе исследования впервые был предложен метод интраоперационного магнитно-резонансного (МРТ) контроля внутрисосудистого положения филамента, что позволило усовершенствовать методику и значимо повысить эффективность моделирования экспериментального инфаркта мозга у крыс при помощи эндоваскулярной окклюзии СМА. Была комплексно оценена и сопоставлена терапевтическая эффективность МСК после внутриартериального и интрацеребрального введения крысам с моделью острой фокальной ишемии мозга. Были подобраны оптимальные параметры для безопасной внутриартериальной трансплантации МСК для предотвращения эмболии церебральных сосудов. Получены новые данные о распределении и миграции МСК в интактном мозге и в условиях острой фокальной ишемии. Получены новые данные о механизмах, обеспечивающих неравномерное распределение трансплантированных клеток в головном мозге после внутриартериального введения.

Положения, выносимые на защиту

1. Впервые разработан метод интраоперационного МРТ контроля внутрисосудистого положения филамента во время проведения эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии у крыс, использование которого позволяет визуализировать одновременно как сам филамент, так и кровоток в церебральных сосудах, а также окружающие мозговые структуры и обеспечивает раннюю диагностику возможных геморрагических осложнений моделирования. Использование данной методики позволяет значимо повысить эффективность моделирования экспериментальной острой фокальной ишемии головного мозга благодаря уменьшению частоты возникновения геморрагических осложнений и увеличению процента инфарктов мозга полушарного типа при моделировании.

2. Внутриартериальная (в дозировке 5×10^5) и интрацеребральная (в дозировке 3×10^5) трансплантация мезенхимальных стволовых клеток являются безопасными, улучшают выживаемость и ускоряют восстановление общего неврологического дефицита у лабораторных животных, а также вызывают значимое улучшение моторной функции передней конечности в течение 14 суток с момента моделирования острой фокальной ишемии головного мозга.

3. Внутривартериальная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток крысам с моделью острой фокальной ишемии головного мозга оказывает более выраженное и быстрое положительное терапевтическое действие по сравнению с интрацеребральным введением. После внутривартериальной трансплантации значительно ускоряется набор веса в течение 14-ти дневного периода наблюдения, а также происходит более раннее (уже к 7-му дню наблюдения) и выраженное уменьшением общего неврологического дефицита у лабораторных животных.

4. После интрацеребрального введения в область стриатума распределение и характер миграции мезенхимальных стволовых имеет общие черты у интактных животных и у крыс с моделью острой фокальной ишемией головного мозга: трансплантированные клетки располагаются компактно вдоль трека введения иглы и в течение 14-ти дней мигрируют вдоль волокон и сосудов мозолистого тела в медиальном и латеральном направлениях в пределах полушария введения, а также периваскулярно.

5. После внутривартериального введения мезенхимальных стволовых клеток во внутреннюю сонную артерию распределение трансплантированных клеток имеет общие черты у интактных животных и у крыс с моделью острой фокальной ишемией головного мозга: МСК распределяются преимущественно в ипсилатеральном (правом) полушарии, а также в стволовых структурах внутри церебральных сосудов. У интактных животных МСК распределяются диффузно в полушарии со стороны введения, а у животных с моделью острой фокальной ишемии головного мозга наибольшее их число локализуется в перинфарктной области и в очаге инфаркта мозга. В обоих случаях трансплантированные клетки находятся внутри церебральных сосудов в тесном контакте с их внутренней стенкой, где сохраняются до 48 часов у интактных животных и до 72 часов у крыс с моделью экспериментального инфаркта мозга.

6. В зоне инфаркта мозга и перинфарктной области значительно повышена экспрессия генов молекул клеточной адгезии ICAM-1 и PECAM-1 по сравнению со сходными анатомическими участками в противоположном полушарии через 24 часа после моделирования острой фокальной ишемии головного мозга.

7. Церебральная перфузия вносит значимый вклад (до 28-30%) в плотность распределение мезенхимальных стволовых клеток в головном мозге после их внутривартериальной трансплантации.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ключевая роль в разработке дизайна и организации научно-исследовательской работы, поиске и анализе научной литературы по теме диссертации. Автор самостоятельно выполнял все микрохирургические манипуляции, тестирование лабораторных животных, участвовал в проведении МР-исследований и подготовке гистологического материала. Автор также принимал непосредственное участие в интерпретации получаемых результатов нейровизуализации и гистологического исследования, а также в анализе, статистической обработке и оформлении всех полученных результатов исследования, подготовке научных статей, докладов и написании текста диссертации.

Внедрение результатов в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Результаты диссертационной работы применяются при осуществлении научно-исследовательских разработок в центре коллективного пользования «Медицинские и биотехнологические нанотехнологии» ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также в отделе ультразвуковой и функциональной диагностика ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства России.

Апробация работы

Материалы диссертации были обсуждены и одобрены на российских и международных конференциях: II национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, Российская Федерация, декабрь 2015 года); XI Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Российская Федерация, май-июнь 2015 года); 32 ежегодный съезд European Society of Magnetic Resonance in Medicine and Biology (Эдинбург, Великобритания, октябрь 2015); XII Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Российская Федерация, май-июнь 2016 года); 10th World Stroke Congress (Хайдарабад, Индия, октябрь 2016 года); 3rd European Stroke Organization Congress (Прага, Чехия, май 2017 года); III национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, Российская Федерация, ноябрь 2017 года) 4th European Stroke Organization Congress (Гетенбург, Швеция, май 2018 года); 11th World Stroke Congress (Монреаль, Канада, октябрь 2018 года); XI Всероссийский съезд неврологов и IV конгресс Национальной ассоциации по борьбе с инсультом (Санкт-Петербург, Российская Федерация, июнь 2019 года); VI национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, Российская Федерация, ноябрь 2019 года); XVI Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Российская Федерация, октябрь 2020 года); XVII Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Российская Федерация, май-июнь 2021 года; 13th World Stroke Congress (проводился дистанционно, октябрь 2021 года); XVIII Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Российская Федерация, май-июнь 2022 года). Апробация работы состоялась 20 сентября 2022 года на совместной научно-практической конференции №1 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 опубликована 31 печатная работа, из которых 4 статьи в рецензируемых изданиях из перечня ВАК, 9 статей в иностранных журналах, индексируемых в библиографической базе данных Scopus, а также 18 тезисов международных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 196 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы и 43 рисунка, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 332 источника.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства высшего образования и науки РФ, соглашение № 075-15-2020-792, уникальный идентификатор RF----190220X0031.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Краткий план экспериментального исследования

На первом этапе экспериментального исследования для усовершенствования модели острой фокальной ишемии головного мозга методом эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии у крыс путем разработки метода интраоперационного контроля внутрисосудистого положения филамента при помощи МРТ экспериментальные животные случайным образом были разделены на следующие группы: (1) группа животных с интраоперационным МРТ контролем моделирования острой фокальной ишемии головного мозга (n=51); (2) группа животных без интраоперационного МРТ контроля за проведением операции (n=38). Крысам из группы (1) сразу после установки филамента в просвет ВСА

проводилось МРТ исследование. Следующее МРТ исследование для животных из обеих групп проводилось спустя 24 часа от момента моделирования острой фокальной ишемии головного мозга для оценки исхода операции, после чего животных выводили из эксперимента.

Для изучения влияния внутриартериального и интрацеребрального введений МСК на течение и исход острой фокальной ишемии головного мозга у крыс, а также для изучения характера распределения и миграции МСК в головном мозге крыс после трансплантации, животные через 24 часа после успешного моделирования экспериментального инфаркта мозга были случайным образом разделены на следующие экспериментальные группы:

- (1) Группа контроля (n=35) – крысы с моделью острой фокальной ишемии головного мозга без трансплантации МСК.
- (2) Группа с внутриартериальным введением МСК (n=36) – крысы с моделью острой фокальной ишемии головного мозга и с внутриартериальной трансплантацией МСК. Для части крыс (n=14) проводилась динамическая оценка терапевтической эффективности в течение 14 суток, а для остальных животных (n=22) проводилась оценка характера распределения и миграции трансплантированных клеток методом МРТ и гистологического исследования крыс на следующие сроки: 1 час (n=8), 24 часа (n=4), 48 часов (n=4), 72 часа (n=4), 7 дней (n=2).
- (3) Группа с интрацеребральным введением МСК (n=31) – крысы с моделью острой фокальной ишемии головного мозга и с интрацеребральной трансплантацией МСК. Для части крыс (n=13) проводилось динамическое наблюдение в течение 14 суток с целью оценки терапевтической эффективности клеточной терапии. У остальных животных (n=18) проводилась оценка характера распределения и миграции трансплантированных клеток методом МРТ и гистологического исследования на следующие сроки: 1 час (n=1), 24 часа (n=2), 11 дней (n=1), 14 дней (n=14).

Для изучения терапевтической эффективности клеточной терапии у животных из всех трех экспериментальных группы в динамике в течение 14 дней оценивали выживаемость, вес, общий неврологический дефицит по модифицированной шкале оценки тяжести инсульта для грызунов (mNSS), объем очага инфаркта мозга по данным МРТ на сроки: через 24 часа после моделирования острой фокальной ишемии головного мозга непосредственно перед трансплантацией МСК (1 день) и далее на 7-й и 14-й день. В конце периода наблюдения, на 14-е сутки, также оценивали также моторную функцию передних конечностей с помощью тест-системы «цилиндр». Схематично дизайн данной части экспериментальной работы представлен на рисунке 1.



Рисунок 1. Дизайн экспериментального исследования по оценке терапевтической эффективности, распределения и миграции МСК после внутриартериального и интрацеребрального введения.

Для изучения характера распределения и миграции МСК в интактном головном мозге после их внутриартериальной и интрацеребральной трансплантации были выделены две экспериментальные группы животных без моделирования острой фокальной ишемии:

- (1) Интактные крысы с внутриартериальным введением МСК (n=16). Животным из данной группы проводилось МРТ исследование в динамике, а для верификации данных МРТ при помощи гистологического исследования крысы были выведены из эксперимента на сроки: 1 час (n=7), 24 часа (n=3), 48 часов (n=2), 72 часа (n=2), 7 дней (n=2).
- (2) Интактные крысы с интрацеребральным введением МСК (n=24). Животным из данной группы также проводилось МРТ исследование в динамике, а для верификации данных МРТ при помощи гистологического исследования крысы были выведены из эксперимента на сроки: 1 час (n=3), 24 часа (n=4), 7 дней (n=3) и 14 дней (n=14).

Для выявления потенциальных молекулярных механизмов хоуминга МСК в головном мозге крыс в условиях экспериментального ишемического инсульта была выделена следующая группа экспериментальных животных: крысы с моделью острой фокальной ишемии головного мозга методом эндоваскулярной окклюзии правой средней мозговой артерии (n=7). Для животным данной группы через 24 ч после моделирования экспериментальной ишемии выполнялся анализ экспрессии генов молекул адгезии методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Дополнительно для оценки влияния вклада церебральной перфузии в распределения МСК в головном мозге после внутриартериальной трансплантации для части интактных крыс (n=3), а также для части животных с моделью острой фокальной ишемии (n=7) было выполнено селективное перфузионное магнитно-резонансное исследование с количественной оценкой перфузионных параметров.

Материал и методы исследования

Лабораторные животные

Экспериментальное исследование проводилось на самцах крыс линии массой 230–300 грамм Wistar (n=238). Самцы были выбраны как объект исследования для исключения нейропротективного действия эстрогенов [Brann и соавт., 2007]. Животные были получены из сертифицированного питомника и содержались в виварии РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Перед началом эксперимента крысы проходили карантин в течение 10–14 дней. На протяжении всего эксперимента животные содержались по 5 крыс в клетке, при соблюдении 12-часового цикла день/ночь, комнатной температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$, влажности 45–65%, и обеспечении свободного доступа к воде и брикетированному корму. Экспериментальное исследование было одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол №140 от 15.12.2014 года), а также университетской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол-заявка № 13/2020 от 08.10.2020 года, протокол заявка № 24/2021 от 10.12.2021 года). Все хирургические манипуляции с лабораторными животными и их обследование при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ) выполнялись под ингаляционной анестезией изофлюраном (Aerран, Baxter HealthCare Corporation, США): 3.5–4% изофлюран для индукции анестезии и 2–2.5% изофлюран для поддержания животного в стадии хирургического (глубокого) наркоза. При моделировании острой фокальной ишемии головного мозга использовалась ингаляционная смесь изофлюрана с атмосферным воздухом, а при проведении трансплантации стволовых клеток и МРТ - смесь изофлюрана с кислородом. Были приложены все усилия для сокращения количества животных, участвующих в эксперименте. Исследователем обеспечивался контроль за состоянием животных, при выявлении признаков боли или иного раздражения вводился анальгетик (мелоксикам) для их облегчения. По окончании эксперимента, а также для проведения гистологического исследования в динамике, крысы выводились из исследования путем ингаляционной анестезии летальной дозой изофлюрана и затем дополнительной внутрибрюшинной инъекцией летальной дозой тилетамина (Золетил, Virbac, Франция).

Клеточная культура

Клеточная культура была любезно предоставлена лабораторией клеточной биологии ФГБНУ Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были выделены из плаценты здоровой роженицы на (38–40 недели гестации). Донор подписывал добровольное информированное согласие на забор клеточного материала. МСК плаценты были охарактеризованы по основным иммунофенотипическим маркерам методом проточной цитометрии и показали отличные мультипотентные свойства путем дифференцировки в три направления: хондрогенном, остеогенном и адипогенном. Для трансплантации использовали клетки 3–5 пассажа. Для оценки распределения и миграции МСК клетки были помечены суперпарамагнитными микрочастицами на основе оксида железа (SPIO) (MC03F, Bang Laboratories, Inc., США, диаметр=0,9 мкм) с флуоресцентной меткой Dragon Green ($\lambda_{ex}=480$ нм, $\lambda_{em}=520$ нм), согласно протоколу фирмы производителя. Также для более точной визуализации трансплантированных клеток в головном мозге крыс для части экспериментов было выполнено двойное мечение МСК магнитными микрочастицами (SPIO) и липофильным мембранным красным клеточным красителем PKH 26 (Sigma-Aldrich, США), согласно протоколу фирмы производителя. Каждая доза МСК для трансплантации составляла 3×10^5 клеток в 15 мкл физиологического раствора для интрацеребрального и 5×10^5 в 2 мл физиологического раствора для внутриартериального введения.

Моделирование острой фокальной ишемии головного мозга

Моделирование острой фокальной ишемии головного мозга проводилось методом транзиторной эндоваскулярной окклюзии правой средней мозговой артерии (ЭОСМА) продолжительностью 90 минут. Для выполнения операции использовались стерильные офтальмологические микрохирургические инструменты (Titan surgical, Россия). Операция проводилась под общей ингаляционной анестезией изофлюраном на воздушной смеси по методике, описанной выше. Животному проводилась также премедикация путем внутрибрюшинной инъекции 0,01 мл атропина сульфатом, разведенном в 1 мл физиологического раствора, для предотвращения брадикардии, чрезмерной секреции слюнных и бронхиальных желез, острого респираторного дистресс-синдрома. После индукции ингаляционной анестезии и местного обезболивания 0,1 мл 0,5% раствором бупивакаина (Маркаин, RECIPIHARM MONTS, Франция) выполнялся срединный разрез в области шеи. Выделялась область бифуркации правой общей сонной артерии (ОСА) на внутреннюю (ВСА) и наружную (НСА) сонные артерии. Через культю НСА вводился филамент с резиновым наконечником (Docol corporation, США, диаметр филамента 0,19 мм, длина 30 мм; диаметр с покрытием $0,37 \pm 0,02$ мм; длина покрытия 3–4 мм) и продвигался к месту отхождения правой СМА до момента ощущения легкого сопротивления. Этот момент считался временем начала окклюзии. Операционную рану ушивали прерывистым узловым швом. Далее животных из группы без интраоперационного МРТ контроля выводили из наркоза до момента окончания периода окклюзии, а крыс из группы с МРТ контролем переносили в МР-томограф для выполнения исследования. После выполнения МРТ в зависимости от полученного результата было три различных алгоритма действий. В случае подтверждения успешной установки филамента с перекрытием тока крови по СМА и отсутствия геморрагических осложнений крыс выводили из-под действия анестезии. В случае выявления геморрагических осложнений (внутри мозговых или оболочечных кровоизлияний) животных выводили из эксперимента методом, описанным выше. В случае некорректного расположения филамента с сохранением кровотока по СМА и при условии отсутствия геморрагических осложнений крыс переносили обратно на операционный стол для изменения положения филамента (выполнялось не более 2-х попыток для одного животного). Через 85–80 мин от момента установки филамента животных вновь вводили в наркоз, операционную рану открывали, производили извлечение филамента и восстановление кровотока по ВСА, затем рану ушивали, производили

антибиотикопрофилактику и помещали животных в подогретую клетку, где они выходили из-под действия наркоза. Схематично этапы операции представлены на рисунке 2.

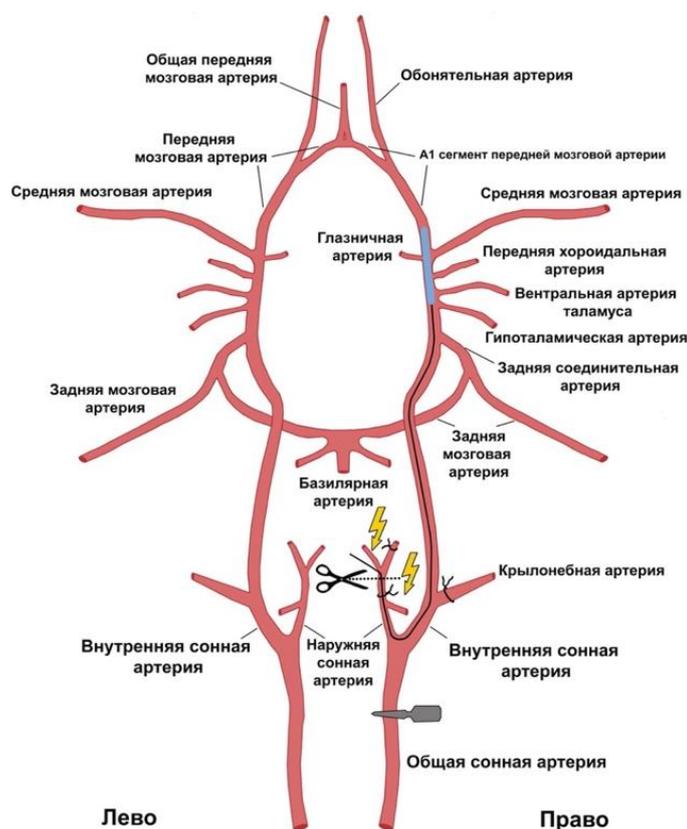


Рисунок 2. Схема операции по моделированию острой фокальной ишемии головного мозга методом ЭОСМА. На изображении представлены брахиоцефальные и мозговые артерии крысы и правильно расположенный в них филамент. Наконечник филамента (изображен синим цветом) находится в просвете ВСА таким образом, что перекрывает место отхождения правой СМА. Дополнительно схематично изображены зоны электрокоагуляции артерий, места наложения лигатур и сосудистой клипсы, место разреза НСА.

Трансплантация МСК

Внутриартериальное введение МСК производили в правую ВСА. Для этого после выделения области бифуркации ОСА через НСА устанавливали полиуретановый микрокатетер (маркировка диаметра 1F, длина 28 см (или 120 см в случае введения клеток в гентри МР-томографа), Braintree Scientific, Inc, США), заполненный физиологическим раствором, в ОСА на 0,3–0,5 мм в направлении ретроградного тока крови. Малый диаметр катетера и его ретроградная установка в просвете ОСА выполнялись для сохранения кровотока во ВСА во время инфузии клеток. Инфузию клеток выполняли при помощи микроинжектора со скоростью 100 мкл/мин. Для изучения прижизненного распределения трансплантированных клеток в режиме реального времени непосредственно в момент трансплантации внутриартериальное введение осуществлялось внутри гентри МР-томографа. После завершения трансплантации катетер извлекали, рану ушивали прерывистым узловым швом.

Для интрацеребрального введения МСК животных помещали в стереотаксическую установку с компьютерной навигационной системой Angle Two (Leica Microsystems GmbH, Германия). Введение клеточной суспензии осуществлялось при помощи микроинжектора со скоростью 3 мкл/мин в область левого стриатума по следующим координатам от брегмы: +0,6 мм в передне-заднем направлении, 3,5 мм в медиально-латеральном направлении, -4,5 мм в вентрально-дорзальном направлении. После введения клеток иглу оставляли в веществе мозга на 5 мин для обеспечения диффузии клеток в месте введения, после чего иглу медленно извлекали, рану ушивали прерывистым узловым швом.

Магнитно-резонансная томография

Магнитно-резонансная томография экспериментальных животных в динамике проводилась на МР-томографе для малых лабораторных животных ClinScan (Bruker BioSpin, США) с индукцией магнитного поля 7 Тл под ингаляционной анестезией изофлюраном по методике, описанной выше.

С помощью МРТ реализовывались следующие задачи:

1. МР-контроль внутрисосудистого положения филамента во время моделирования окклюзии СМА. МР-исследование включало в себя получение T2 взвешенных изображений (T2ви) высокого разрешения и T1 взвешенных изображений (T1ви) высокого разрешения в плоскости, расположенной вдоль хода интракраниального сегмента внутренних сонных артерий (косо-коронарная плоскость).

2. Оценка объема очага инфаркта мозга. Получали T2ви в аксиальной проекции на 1-е (перед трансплантацией МСК), 7-е и 14-е сутки после трансплантации. Морфометрия очага инфаркта мозга в динамике измерялась с использованием программного пакета ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, США) по T2ви.

3. Оценка распределения и миграции МСК, а также безопасности клеточной трансплантации. В динамике в течение 14 суток после трансплантации МСК выполнялась импульсная последовательность SWI (изображения, взвешенные по магнитной восприимчивости) высокого разрешения. Дополнительно для оценки распределения МСК в головном мозге в режиме реального времени непосредственно в момент внутриартериальной трансплантации выполнялись T2*ви с временным разрешением 1 мин на протяжении всего времени инфузии. Для оценки безопасности внутриартериального введения МСК до и после трансплантации выполняли диффузионно-взвешенные изображения (ДВИ) с вычислением карт измеряемого коэффициента диффузии (ИКД). Схематичное описание МР-протокола представлено на рисунке 3.

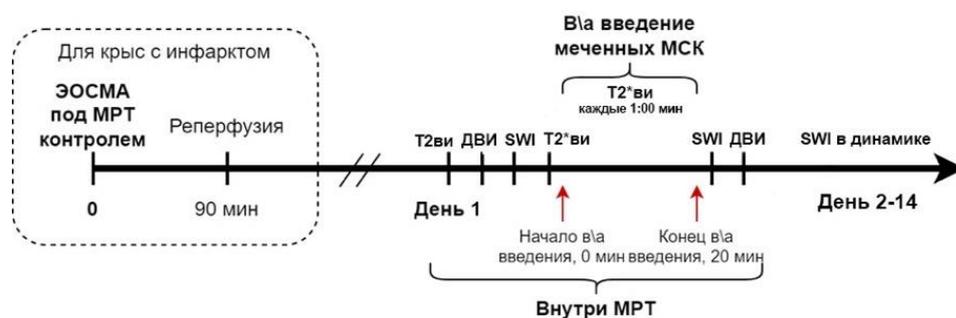


Рисунок 3. Дизайн МРТ исследования для изучения прижизненного распределения МСК в головном мозге после их внутриартериальной трансплантации.

4. Исследование вклада церебральной перфузии в распределение МСК в головном мозге после внутриартериальной трансплантации. Для части животных перед внутриартериальной трансплантацией МСК выполнялось селективное перфузионное исследование. Схематичное описание МР-протокола представлено на рисунке 4. Полученные

данные селективного МР-перфузионного исследования и МР-данные о распределении меченых МСК в головном мозге обрабатывались с использованием созданного в рамках исследовательской работы нашего научного коллектива программного кода для количественного анализа данных [Gubskiy и соавт., 2022].

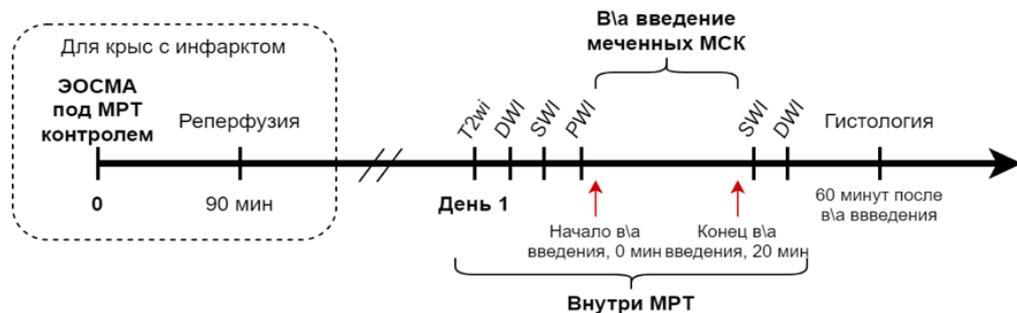


Рисунок 4. Дизайн исследования для изучения церебральной перфузии в распределение МСК в головном мозге после внутриартериальной трансплантации.

Гистологическое исследование

Животных выводили из эксперимента для проведения гистологического исследования для оценки распределения и миграции МСК в головном мозге: через 1 час, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 7, 11 и 14 дней после трансплантации. Для визуализации магнитных микрочастиц железа методом классической гистологии была использована окраска по Перлсу. Для проведения иммуногистохимического окрашивания срезов головного мозга использовали следующие антитела: anti-alpha SMA (1:500; Abcam, Великобритания), anti-Rat Blood Brain Barrier (1:100; BioLegend, США), anti-Mitochondria (1:100, Abcam, Великобритания). У срезов, не прошедших иммуногистохимическое окрашивание, ядра докрасивали раствором DAPI (2 мкг/мл; Sigma-Aldrich, США). Микрофотографии препаратов были получены с помощью цифрового флуоресцентного микроскопа Keyence BZ-9000E (США), а также лазерного сканирующего конфокального микроскопа Nikon A1R MP+ (Япония).

Полимеразная цепная реакция

Проводился анализ экспрессии генов, кодирующие молекулы клеточной адгезии VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1. Анализ проводился при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Биоматериал забирали через для 24 часа после ЭОСМА из следующих анатомических зон головного мозга: зоны инфаркта мозга и контралатеральной ей области в противоположном полушарии, периинфарктной зоны и контралатеральной ей область в противоположном полушарии, а также области ствола мозга (нижней части варолиевого моста, продолговатого мозга с прилегающей к ним части мозжечка).

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка данных выполнялась в программном пакете IBM SPSS Statistics 23.0 и с использованием пакетов SciPy и statsmodels для Python 3.8. Уровень значимости для всех экспериментов был выбран $p < 0,05$. Использовались следующие статистические методы: точный тест Фишера, метод Каплана-Мейера, общая линейная модель с повторными измерениями, критерий Манна-Уитни, корреляция Спирмена, линейная регрессия методом наименьших квадратов. При сравнение нескольких групп применялась поправка на множественные сравнения (FDR).

Основные результаты исследования

Оптимизация модели острой фокальной ишемии головного мозга

Для успешного выполнения моделирования острой фокальной ишемии головного мозга методом ЭОСМА необходимым условием является правильная постановка филамента в просвете внутренней сонной артерии. Наконечник филамента должен находиться точно

напротив места отхождения СМА от ВСА для обеспечения перекрытия кровотока в СМА. В случае недостаточного введения филамента окклюзия СМА может быть неполной или отсутствовать, а при слишком сильном введении филамента может происходить разрыв церебральных артерий с развитием субарахноидального или даже субдурального кровоизлияний. С целью усовершенствования модели и решения вышеописанных технических трудностей нами был разработан метод интраоперационного контроля внутрисосудистого положения филамента с помощью магнитно-резонансной томографии. Для выполнения данной методики сразу после установки филамента экспериментальным животным выполнялись Т1ви и Т2ви высокого разрешения в плоскости, расположенной вдоль хода интракраниального сегмента ВСА. На полученных изображениях силиконовый наконечник филамента визуализируется как гипоинтенсивная область на Т1ви и Т2ви (рисунок 5). Предложенный метод позволяет не только визуализировать точное внутрисосудистое положение филамента, но и одновременно оценивать архитектуру магистральных артерий головного мозга, кровотока и оценить степень окклюзии СМА, а также наличие геморрагических осложнений.

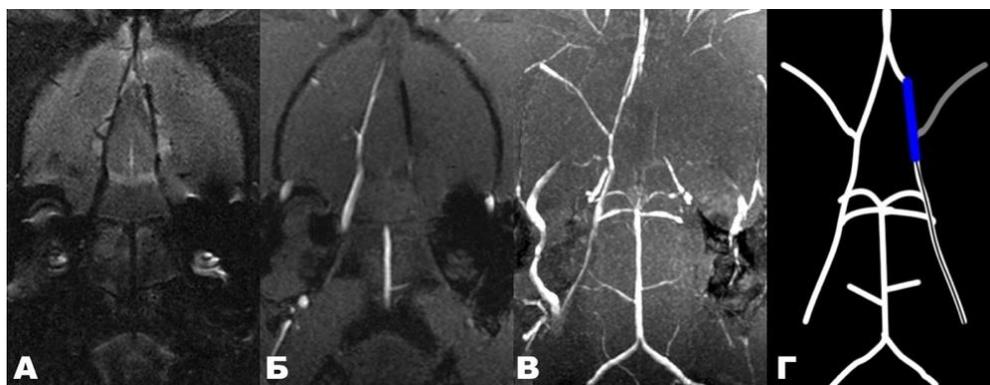


Рисунок 5. Пример МР-визуализации корректного внутрисосудистого расположения филамента. А – Т2ви высокого разрешения. Б - Т1ви высокого разрешения. В - проекция максимальной интенсивности для Т1ви. Г- схема, наконечник отмечен синим цветом.

Для подтверждения эффективности разработанной методики через 24 часа после моделирования сопоставлялись исходы операций у животных из группы 1, которым выполнялся вышеописанный МРТ контроль (n=51), и у животных из группы 2, у которых не контролировалась правильность установки филамента (n=38). При сравнении процента геморрагических осложнений между двумя экспериментальными группами с помощью двухстороннего точного теста Фишера было выявлено, что частота возникновения геморрагических осложнений была значимо ниже у животных из группы 1 (данные представлены на рисунке 6 А).

В процессе исследования было выявлено, что у части животных даже в случае правильного внутрисосудистого расположения филамента в дистальных частях СМА может сохраняться частичный ток крови. На основании наличия или отсутствия частичного тока крови в дистальных частях СМА все животные из группы 1 были разделены на две подгруппы. Для каждой из подгрупп качественно оценивали объем зоны инфаркта головного мозга через 24 часа после моделирования острой фокальной ишемии методом ЭОСМА. При сравнении вышеуказанных исходов между двумя подгруппами с помощью двухстороннего точного теста Фишера было выявлено, что частота формирования инфарктов головного мозга полушарного типа была достоверно выше в подгруппе животных без сохранения тока крови в СМА (данные представлены на рисунке 6 Б).

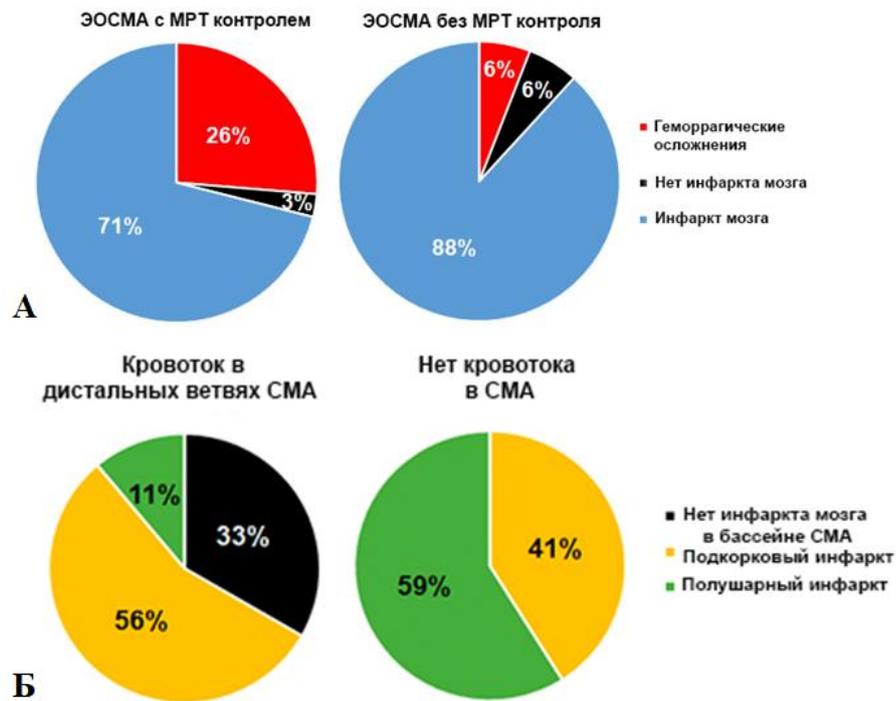


Рисунок 6. Исходы операций по моделированию острой фокальной ишемии головного мозга методом ЭОСМА.

А: Диаграммы представляют процентные соотношения различных исходов операции (геморрагических осложнений, неуспешного и успешного моделирования инфаркта мозга) у животных с и без МРТ контроля внутрисосудистого положения филамента.

Б: Диаграммы представляют процентное соотношение исходов операций (отсутствие инфаркта мозга в бассейне СМА, формирование подкоркового или полушарного инфаркта) у животных с и без сохранения частичного тока крови в дистальных ветвях СМА.

Таким образом, предложенная нами методика интраоперационного МРТ контроля внутрисосудистого положения филамента позволяет значительно повысить эффективность успешного моделирования экспериментальной острой фокальной ишемии благодаря снижению частоты возникновения геморрагических осложнений. Вместе с этим использование данной методики также позволяет быстро выявить и вывести из эксперимента крыс с геморрагическими осложнениями, провести репозицию филамента в случае недостаточной степени окклюзии СМА, а также визуализировать наличие остаточного тока крови в дистальных частях СМА и также исключить таких животных с целью увеличения количества получаемых инфарктов мозга полушарного типа.

Оценка терапевтической эффективности трансплантации МСК

На следующем этапе настоящего исследования была комплексно оценена и сопоставлена терапевтическая эффективность МСК после их внутриартериального и интрацеребрального введения крысам с моделью острой фокальной ишемии методом ЭОСМА. В течение 14-ти дневного периода наблюдения проводили оценку выживаемости, веса лабораторных животных, общего неврологического дефицита с использованием модифицированной шкале оценки тяжести инсульта для грызунов (mNSS), моторной функции передней конечности с помощью тест-системы «цилиндр», объема очага инфаркта головного мозга по данным МРТ у животных из трех экспериментальных группы: группы с внутриартериальным введением МСК, группы с интрацеребральным введением МСК, а также у группы контроля (крысы с моделью ЭОСМА без клеточной терапии).

При анализе выживаемости были выявлены достоверно значимые различие между группой контроля и обеими группами с трансплантацией МСК. Достоверных различий при

сравнении между собой групп с внутриартериальной и интрацеребральной трансплантацией МСК выявлено не было. Таким образом, и внутриартериальная и интрацеребральная трансплантация МСК в равной степени приводила к значимому улучшению выживаемости лабораторных животных с моделью острой фокальной ишемии головного мозга (рисунок 7 А).

При анализе динамики изменения нормированного (к первым суткам) веса животных за все время наблюдения достоверные различия были выявлены только между группами контроля и группой с внутриартериальным введением МСК (рисунок 7 Б). Таким образом, только после внутриартериальной трансплантации МСК экспериментальные животные ускоряли набор веса, из чего можно сделать вывод об улучшении их общего состояния.

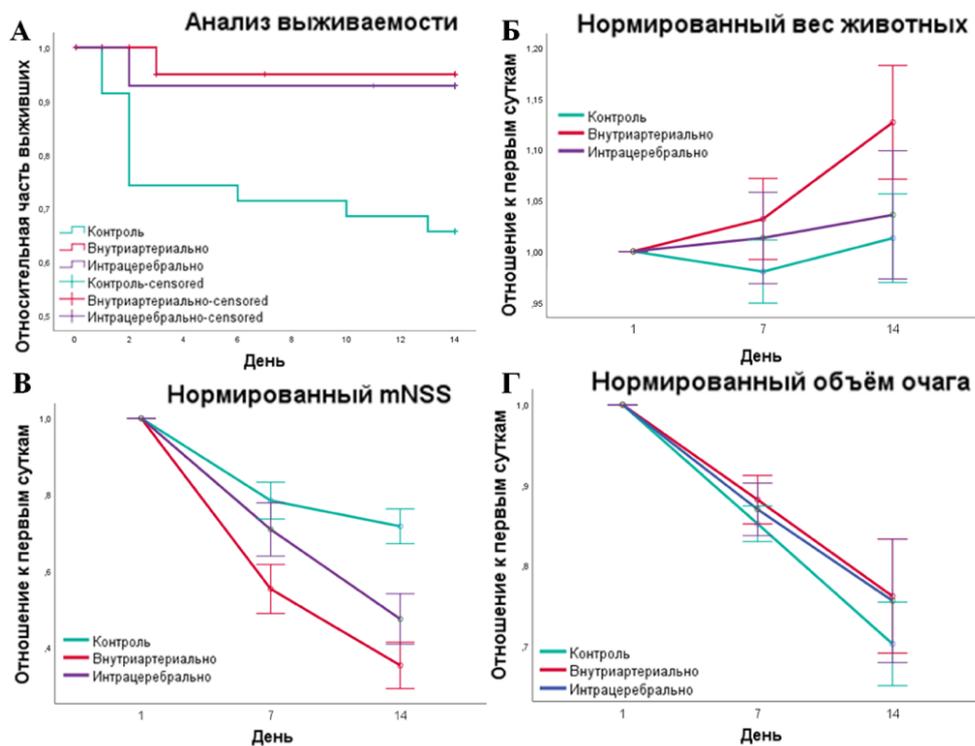


Рисунок 7. Терапевтическая эффективность МСК в течение всего периода наблюдения (14 суток). А: Кривые выживаемости Каплана-Мейера. Б: График динамики изменения веса животных. В: График динамики изменения неврологического дефицита экспериментальных животных, измеренного по шкале mNSS. Г: График динамики изменения объема очага инфаркта головного мозга по данным МРТ. На графиках Б-Г представлены средние значения и стандартные отклонения (планки).

При анализе динамики изменения нормированного (к первым суткам) неврологического дефицита животных за все время наблюдения были достоверные различия между всеми экспериментальными группами. Было показано, что при обоих способах трансплантации МСК происходит уменьшение выраженности неврологического дефицита, однако данный эффект более выражен и наступает быстрее (уже к 7-му дню) при внутриартериальной клеточной трансплантации (данные представлены на рисунке 7 В). Дополнительно была также оценена моторная функция передней конечности на стороне пареза по данным теста «цилиндр» на 14-й день наблюдения. Согласно полученным данным, выявлены статистически значимые различия между группой контроля и группой с внутриартериальной трансплантацией МСК, а также группой контроля и группой с интрацеребральным введением МСК. При этом группы с клеточной терапией статистически достоверно не различались между собой. Таким образом, трансплантация МСК способствует значимому ускорению восстановления моторного дефицита

передней конечности при обоих способах трансплантации на 14-й день после моделирования острой фокальной ишемии головного мозга.

При оценке динамики изменения нормированного (к первым суткам) объема очага инфаркта мозга по данным МРТ было выявлено постепенное уменьшение объема во всех исследуемых группах животных, однако статистический анализ полученных данных показал, что достоверных различий в динамике регресса объема очага инфаркта головного мозга между всеми исследованными группами выявлено не было (данные представлены на рисунке 7 Г).

Оценка распределения и миграции МСК в головном мозге

В настоящем исследовании распределение и характер миграции в головном мозге человеческих плацентарных МСК после их внутриартериальной и интрацеребральной трансплантации крысам с моделью острой фокальной ишемии, а также у интактных животных, были изучены при помощи прижизненной МРТ визуализации с верификацией её результатов по данным гистологического исследования. Перед введением МСК были помечены SPIO с флуоресцентный зеленый белок Dragon Green, а также дополнительно липофильным мембранным красным красителем PKH26. Для МР-визуализации использовали импульсные последовательности T2* и SWI, которые чувствительные к изменениям локальной неоднородности магнитного поля и, следовательно, позволяют детектировать зоны скопления суперпарамагнитных микрочастиц оксида железа как зоны снижения интенсивности МР-сигнала.

При интрацеребральной трансплантации МСК как у крыс с экспериментальным инфарктом головного мозга, так и у интактных животных, на всех сроках наблюдения трансплантат визуализировался по ходу введенной в мозг иглы в коре, мозолистом теле и стриатуме в левом полушарии. В коре и стриатуме основная масса МСК локализовалась компактно вдоль трека введения иглы, и лишь единичные клетки мигрировали в вещество мозга. В области мозолистого наблюдалась более дальняя миграция в медиальном и латеральном направлениях от зоны введения. В случае животных с моделью острой фокальной ишемии нам не удалось визуализировать МСК в зоне инфаркта головного мозга после их интрацеребрального введения в область левого стриатума. При сравнении миграции МСК в интактном головном мозге и в условиях острой фокальной ишемии на сроке 14 дней после трансплантации не было выявлено различий по характеру и дальности миграции (данные представлены на рисунке 8). Кроме того, нам удалось показать, что и у интактных животных, а также у крыс с моделью острой фокальной ишемии, на всех исследуемых сроках значительная часть трансплантированных клеток визуализировалась вокруг церебральных сосудов с их внешней стороны.

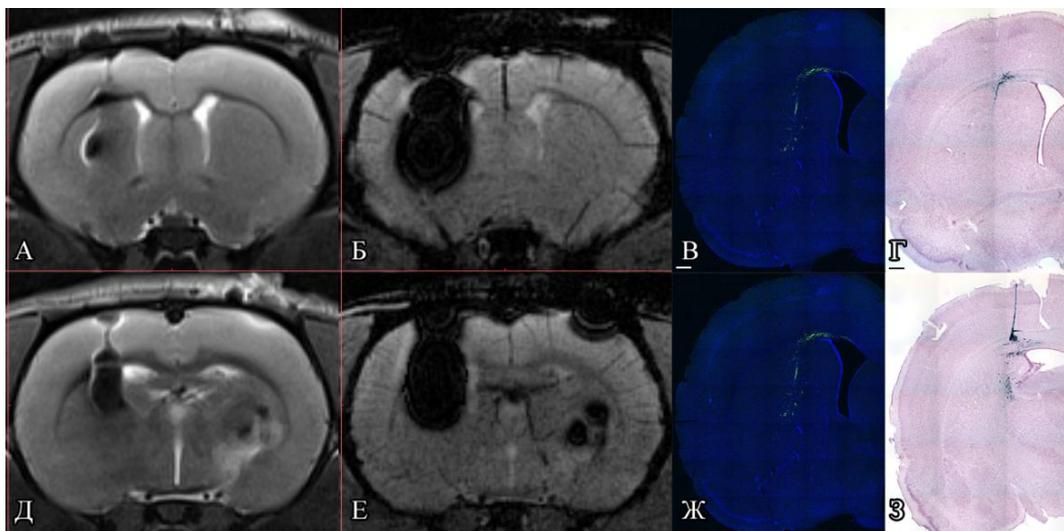


Рисунок 8. Миграция МСК в интактном мозге (верхний ряд) и в условиях острой фокальной ишемии (нижний ряд) после интрацеребральной трансплантации. А, Д – T2*ви; Б,Е – SWI, гипоинтенсивные зоны соответствуют места скопления SPIО меченных МСК, а также геморрагической трансформации зоны инфаркта мозга. В, Ж – данные флуоресцентной микроскопии, указан масштаб 500 мкм, зеленая флуоресценция соответствует локализации SPIО меченных клеток. Г, З – данные окраски по Перлсу, масштаб 500 мкм, места голубого окрашивания соответствуют локализации клеток, меченных микрочастицами оксида железа.

При внутриартериальном введении МСК был также исследован характер распределения и миграции трансплантированных клеток в головном мозге как у интактных крыс, так и у животных с моделью острой фокальной ишемии. Распределение клеток в головном мозге оценивали при помощи МРТ в режиме реального времени непосредственно в момент инфузии МСК в гентри МР-томографа с получением T2*ви с временным разрешением 1 минута и далее с использованием режима SWI высокого разрешения в динамике. Было показано, что после внутриартериальной трансплантации МСК распределялись преимущественно в ипсилатеральном полушарии, а также в стволовых структурах внутри церебральных сосудов. В контрлатеральном полушарии детектировались лишь единичные меченые клетки. У интактных животных трансплантированные МСК распределялись равномерно по всему правому полушарию, в том время как у животных с моделью ЭОСМА наибольшее число клеток визуализировалось в перинфарктной области уже в первые 15 мин после начала введения, а позднее (с 15 по 30 минуты) и в очаге ишемии (данные представлены на рисунке 9).

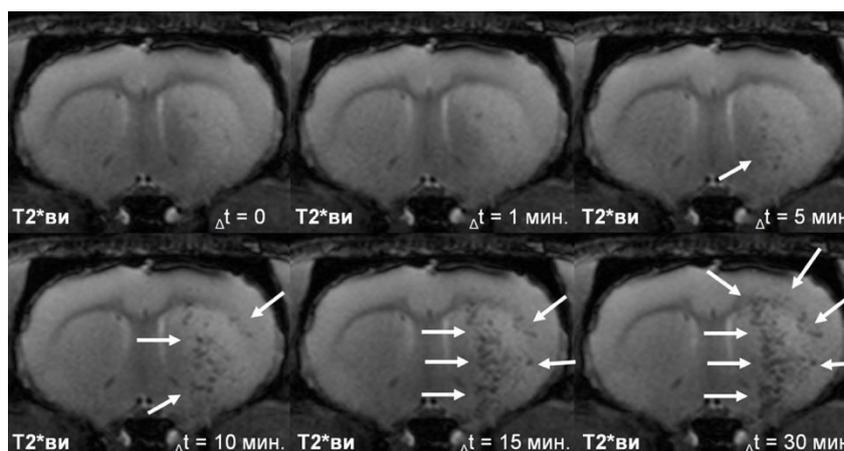


Рисунок 9. Визуализация МСК после внутриартериальной трансплантации крысам с моделью острой фокальной ишемии методом МРТ в режиме реального времени. Представлены T2*ви с временным разрешением 1 мин на 10, 15 и 30 минуты инфузии. Зоны скопления SPIО меченных клеток отмечены белыми стрелками.

После внутриартериальной трансплантации МСК визуализировались внутри церебральных сосудов в тесном контакте с их внутренней стенкой (рисунок 10), где сохранялись до 48 часов у интактных животных и до 72 часов у крыс с моделью экспериментального инфаркта мозга (рисунок 11). Миграции МСК через структуры гематоэнцефалического барьера выявлено не было.

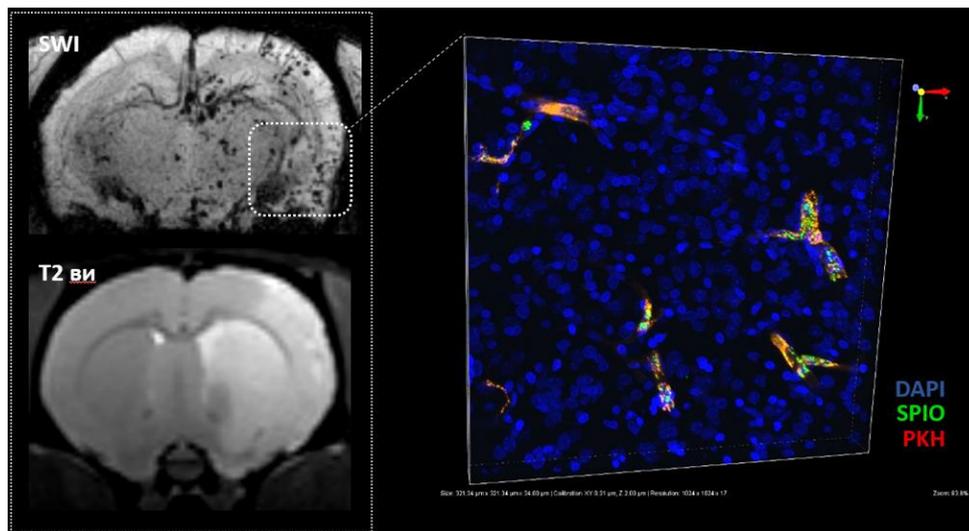


Рисунок 10. Локализация МСК внутри церебральных сосудов после внутриартериальной трансплантации. Гипоинтенсивные зоны на SWI - места скопления меченых МСК. На T2-ВИ гиперинтенсивная область - зона инфаркта мозга. Врезка — данные конфокальной микроскопии: зеленая флюоресценция соответствует SPIO метке, красно-оранжевая - PKH26, синяя - DAPI.

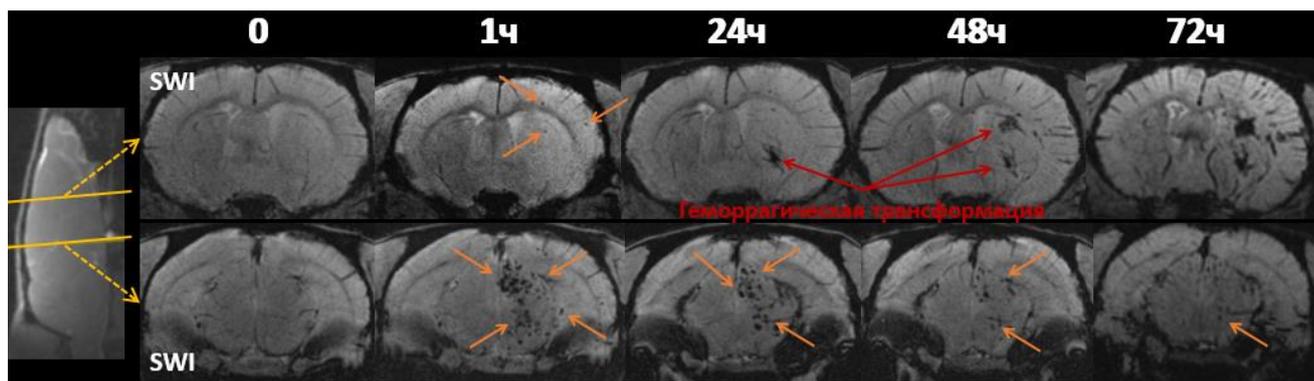


Рисунок 11. МРТ головного мозга крыс с моделью острой фокальной ишемии после внутриартериальной трансплантации меченых МСК в динамике. Представлены МР-изображения головного мозга одного и того же животного (два различных уровня схематично отмечены на сагиттальном срезе) в режиме SWI до введения и в течение 72 ч. после в динамике. Зоны скопления SPIO меченых клеток гипоинтенсивны на SWI и отмечены оранжевыми стрелками. Зоны геморрагической трансформации инфаркта мозга отмечены красными стрелками.

Закономерности и механизмы биораспределения в головном мозге системно введенных клеток в настоящее время до конца не определены. Остается неясным, происходит ли активный хоуминг к очагу повреждения и/или к определенным структурам мозга или же “застревание” МСК в капиллярах по ходу тока крови. На следующем этапе нашего исследования нами был исследованы механизмы, которые могут обеспечивать неравномерное распределение в головном мозге трансплантированных клеток после их внутриартериальной трансплантации крысам, а именно особенность экспрессии молекул клеточной адгезии в разных участках головного мозга в условиях экспериментальной ишемии и вклад церебральной перфузии в распределение трансплантированных клеток.

Исследование экспрессии генов молекул клеточной адгезии в различных участках головного мозга в условиях острой фокальной ишемии

Был проведен анализ экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени следующих молекул клеточной адгезии церебральных сосудов: молекулы межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), молекулы адгезии сосудистых клеток 1 (VCAM-1) и молекулы адгезии эндотелиальных клеток/тромбоцитов 1 (PECAM-1). Для анализа были выбраны следующие зоны головного мозга: зона инфаркта мозга и контралатеральная ей область в противоположном полушарии, перинфарктная зона и контралатеральная ей область в противоположном полушарии, а также область ствола с прилегающей к ней частью мозжечка. В результате проведенного анализа нам удалось показать, что в зоне инфаркта головного мозга (бассейн кровоснабжения правой средней мозговой) и перинфарктной области (задние отделы затылочной доли, область таламуса, гипоталамуса, гиппокампа, часть базальных ядер и средней мозга) значительно повышена экспрессия генов ICAM-1 и PECAM-1 по сравнению со сходными областями с контралатеральной стороны. Согласно полученным результатам, именно в вышеуказанных областях головного мозга после внутриартериального введения детектируется наиболее число трансплантированных МСК. При аналогичном попарном сравнении уровня экспрессии гена VCAM-1 в вышеописанных зонах не было выявлено достоверных различий между различными областями головного мозга.

Исследование вклада церебральной перфузии в распределение МСК после внутриартериального введения

Для части экспериментальных животных в настоящем исследовании перед внутриартериальной трансплантацией МСК выполнялось селективное МР-перфузионное исследование с внутриартериальным введением гадолиний содержащего контрастного средства для оценки влияния церебральной перфузии на распределение МСК. При визуальной оценке полученных перфузионных карт и карт распределения меченых МСК по данным SWI, мы наблюдали визуальную схожесть расположения мест аккумуляции меченых клеток и зон с высокой перфузией как у животных с моделью экспериментального инфаркта мозга, так и у интактных животных (данные представлены на рисунке 12).

В настоящем исследовании был впервые проведен количественный анализ корреляции между перфузионными параметрами и распределением меченых МСК в головном мозге по данным МРТ исследования для чего было использовано два подхода: оценка с применением маски выделенного мозга и оценка только в регионах распределения МСК. Более точное измерение вклада перфузии возможно при использовании второго подхода, при котором происходит исключение зон, расположенных вне области кровоснабжения правой ВСА. Результаты, полученные при таком подходе, продемонстрировали корреляцию между распределением внутриартериально трансплантированных МСК и данными МР-перфузионного исследования как в интактной группе, так и в группе с экспериментальным инфарктом мозга. Однако, коэффициент детерминации в таком случае не превысил 28-30%, что означает, что на основании данных перфузионного исследования, можно предсказать не более трети плотности распределения МСК при их внутриартериальной трансплантации.

Полученные результаты свидетельствуют, что распределение мезенхимальных стволовых клеток в головном мозге после их внутриартериальной трансплантации не может быть объяснено лишь только перфузией вещества головного мозга. Метод оценки данных МР-перфузии с использованием маски всего мозга показал несколько меньший коэффициент детерминации (23–25%), однако подобный подход позволяет предсказывать плотность распределения МСК перед их введением, и может быть использован не только в экспериментальных исследованиях, но потенциально может быть также применен и в клинических исследованиях по изучению клеточной терапии ишемического инсульта с использованием МСК. Полученные данные селективной МР-перфузии смогут помочь в принятии решения о целесообразности выбора внутриартериального способа введения и подборе его параметров (доза клеток, объём инфузии, скорость введения и других) на основании индивидуальных перфузионных особенностей пациента.

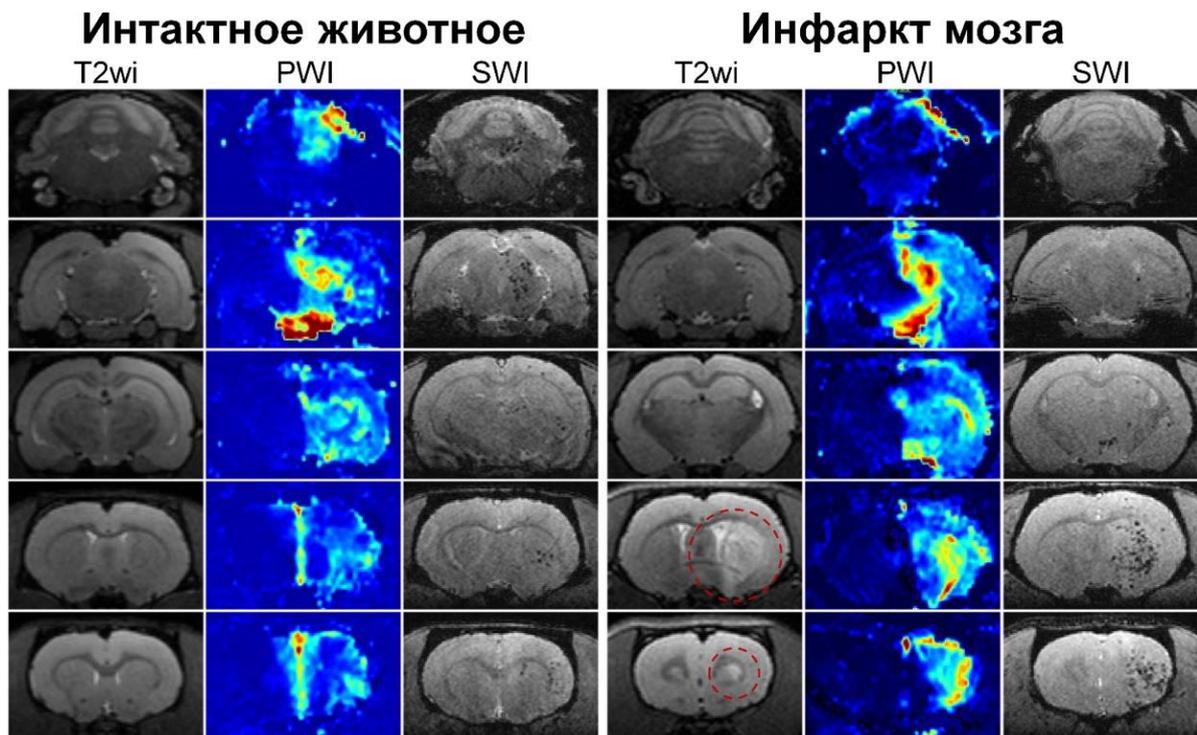


Рисунок 12. МРТ изображения интактного животного (левые столбцы) и крысы с экспериментальным инфарктом мозга (правый столбцы). Представлены 5 последовательных коронарных срезов следующих импульсных последовательностей: T2-ВИ перед трансплантацией МСК (зона инфаркта мозга отмена красным пунктиром); перфузионная карта, полученная перед трансплантацией МСК; SWI через 20 минут после начала трансплантации, меченые МСК визуализируются как гипоинтенсивные области.

На основании полученных в настоящем исследовании результатов можно заключить, что длительное нахождение МСК внутри церебральных сосудов и их проникновение через ГЭБ не являются обязательным условием для оказания терапевтического действия. Можно предположить, что МСК опосредуют свое положительное действие благодаря паракринным механизмам, а также межклеточным взаимодействиям с клетками церебральных сосудов и другими компонентами нейроваскулярной ниши, запуская “триггерные” механизмы, приводящие к пролонгированному положительному функциональному восстановлению животных после моделирования острой фокальной ишемии головного мозга. Полученные в ходе исследования результаты также внесут вклад в понимание фундаментальных механизмов действия и миграции МСК, что может быть использовано при подготовке к клиническим испытаниям по применению МСК в терапии ишемического инсульта у пациентов.

ВЫВОДЫ

1. Был разработан метод интраоперационного МРТ контроля внутрисосудистого положения филамента, использование которого позволяет повысить эффективность моделирования инфаркта мозга методом эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии благодаря значимому уменьшению частоты геморрагических осложнений (с 26% до 6% от общего числа прооперированных животных) и увеличению частоты моделирования инфарктов мозга полушарного типа (с 11% до 59%).

2. Выживаемость лабораторных животных с моделью острой фокальной ишемии головного мозга методом ЭОСМА достоверно и в равной степени улучшалась в течение 14-ти дней как после внутриартериального, так и после интрацеребрального введения МСК по сравнению с животным из контрольной группы.

3. Динамика набора веса лабораторных животных в течение 14-ти дней после моделирования острой фокальной ишемии значительно увеличивалась у крыс только после внутриартериальной трансплантации МСК. Интрацеребральная трансплантация МСК не оказывала значимого влияния на динамику изменения веса лабораторных животных по сравнению с контрольной группы.

4. При внутриартериальной и интрацеребральной трансплантации МСК выявлено значимое ускорение восстановления общего неврологического дефицита, оцененного по шкале mNSS, у лабораторных животных с моделью острой фокальной ишемии головного мозга по сравнению с группой контроля. После внутриартериального введения МСК происходит более раннее (уже к 7-му дню наблюдения) и выраженное уменьшение общего неврологического дефицита у лабораторных животных. При внутриартериальной и интрацеребральной трансплантации МСК выявлено значимое и равнозначное улучшение моторной функции передней левой (паретической) конечности у крыс по сравнению с животными из контрольной группы.

5. При интрацеребральной трансплантации характер распределения и миграции МСК у интактных животных и у крыс с моделью острой фокальной ишемией головного мозга не различался: МСК мигрировали вдоль мозолистого тела в латеральном и медиальном направлениях в пределах полушария введения, а также периваскулярно.

6. При внутриартериальном введении характер распределения и миграции МСК в головном мозге интактных животных и крыс с моделью острой фокальной ишемией головного мозга имел следующие общие черты: МСК распределялись преимущественно в ипсилатеральном (правом) полушарии, в стволовых структурах внутри церебральных сосудов, а единичные клетки детектировались в противоположном полушарии. У интактных животных трансплантированные МСК распределялись равномерно по всему правому полушарию, в том время как у животных с моделью ЭОСМА наибольшее число клеток визуализировалось в перинфарктной области и в очаге инфаркта мозга. В обоих случаях клетки находятся внутри церебральных сосудов в тесном контакте с их внутренней стенкой и сохранялись там до 48 часов у интактных животных и до 72 часов у крыс с моделью острой фокальной ишемии.

7. Церебральная перфузия вносит значимый вклад (до 28-30%) в плотность распределение МСК в головном мозге после их внутриартериальной трансплантации. В зоне инфаркта мозга и перинфарктной области (в местах наибольшего скопления МСК после внутриартериального введения) через 24 часа после моделирования острой фокальной ишемии методом ЭОСМА также выявлено значимое повышение экспрессия генов молекул клеточной адгезии ICAM-1 и PECAM-1 по сравнению со таковым в анатомически сходных участках в противоположном полушарии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

1. При моделировании у лабораторных крыс острой фокальной ишемии головного мозга методом эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии целесообразно проводить интраоперационный МРТ контроль внутрисосудистого положения филамента, согласно методике, разработанной в настоящем исследовании, с целью уменьшения вероятности возникновения геморрагических осложнений и увеличения процента моделирования инфарктом мозга полушарного типа.

2. При выполнении интраоперационного МРТ контроля внутрисосудистого положения филамента во время моделирования острой фокальной ишемии методом эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии в случае выявления некорректного расположения филамента в просвете внутренней сонной артерии и при условии отсутствия

геморрагических осложнений рекомендуется выполнять его репозицию (не более 2-х раз во избежание травматизации интимы церебральных сосудов).

3. При экспериментальных научных исследованиях на крысах (массой 230-300 граммов) в случае внутриартериального введения человеческих мезенхимальных стволовых клеток для обеспечения безопасной трансплантации рекомендовано использовать следующие параметры введения: доза не более 5×10^5 клеток в 2 мл физиологического раствора, скорость введения не более 100 мкл/мин, а также положение сосудистого катетера в просвете общей сонной артерии 0,3-0,5 мм от области бифуркации сонных артерий в направлении ретроградном току крови.

4. Для проведения прижизненной визуализации в головном мозге лабораторных грызунов мезенхимальных стволовых клеток, меченных суперпарамагнитными микрочастицами оксида железа, непосредственно в момент их внутриартериальной трансплантации целесообразно использование следующих параметров: длина сосудистого микрокатетера не менее 120 см, проведение инфузии клеток непосредственно в гентри МР-томографа, использование импульсной последовательности с T2*-взвешенностью и с временным разрешением 1 минута на протяжении всего времени инфузии (2D Gradient Echo с радиочастотным очищающим импульсом; TR/TE = 279/14 мс; FA = 30; усреднение = 1; FOV = 24×24 мм; толщина среза = 1 мм; размер матрицы = 173×192).

5. Мезенхимальные стволовые клетки оказывают положительное терапевтическое действие как при внутриартериальной, так и при интрацеребральной трансплантации у крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга благодаря улучшению выживаемости, степени и скорости регресса неврологического дефицита, однако системное внутриартериальное введение оказывает более быстрое и выраженное действие, что следует учитывать в случае разработки протокола клинических испытаний клеточной терапии мезенхимальными стволовыми клетками для пациентов с острым ишемическим инсультом.

6. Выполнение селективного перфузионного МР-исследования с внутриартериальным введением контрастного агента на основе гадолиния может быть использовано для предсказания плотности распределения мезенхимальных стволовых клеток в головном мозге перед их внутриартериальной трансплантацией.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ

1. Namestnikova D. MRI evaluation of frequent complications after intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells in rats // Gubskiy I., Chekhonin V., Gubsky L., Yarygin K. et al. // **IOP Journal of Physics: Conference Series**. - 2017. – Т. 886, №1. – С. 012012. **Scopus**

2. Namestnikova D. Methodological aspects of MRI of transplanted superparamagnetic iron oxide-labeled mesenchymal stem cells in live rat brain // Gubskiy I., Chekhonin V., Gubsky L., Yarygin K. et al. // **PLoS One**. – 2017. – Т. 12, № 10. – С. e0186717. **Scopus**

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

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

5. Gubskiy I.L. MRI Guiding of the Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats Aimed to Improve Stroke Modeling // Namestnikova D.D., Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Gubsky L.V., Yarygin K.N. et al. // **Translational Stroke Research**. – 2018. – Т. 9, № 4. – С. 417-425. **Scopus**

6. Сухинич К.К. Распределение и миграция мезенхимных стромальных клеток плаценты человека в головном мозге здоровых крыс после стереотаксической или внутриартериальной трансплантации // Наместникова Д.Д., Губский И.Л., Чехонин В.П., Губский Л.В., Ярыгин К.Н. и др. // **Клеточные технологии в биологии и медицине.** - 2019 – № 4 – С. 227-237.

7. Sukhinich K. K. // Distribution and Migration of Human Placental Mesenchymal Stromal Cells in the Brain of Healthy Rats after Stereotaxic or Intra-Arterial Transplantation // Namestnikova D.D., Gubskii I. L., Chekhonin V. P., Gubskii L. V., Yarygin K. N. et al. // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** – 2020.- Т. 168, № 4. – С.542–551. **Scopus**

8. Namestnikova D.D. Combined Cell Therapy in the Treatment of Neurological Disorders // Gubsky L.V., Majouga A.G., Yarygin K. N. et al. // **Biomedicines.** – 2020. - Т.8, № 12. – С. 8120613. **Scopus**

9. Namestnikova D.D. Intra-Arterial Stem Cell Transplantation in Experimental Stroke in Rats: Real-Time MR Visualization of Transplanted Cells Starting With Their First Pass Through the Brain With Regard to the Therapeutic Action // Gubsky L.V., Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yarygin K.N. et al. // **Frontiers in Neuroscience.** – 2021. - Т.2, № 15.- С. 641970. **Scopus**

10. Yarygin K.N. Cell Therapy of Stroke: Do the Intra-Arterially Transplanted Mesenchymal Stem Cells Cross the Blood–Brain Barrier? // Namestnikova D.D., Sukhinich K.K., Gubskiy I.L., Majouga A.G., Kholodenko I.V. // **Cells.** – 2021. - Т. 10, № 11.- С. 2997. **Scopus**

11. Губский И.Л. Построение 3d-модели распределения внутриартериально трансплантированных клеток в головном мозге крысы по данным мрт, верифицированным гистологическим исследованием // Наместникова Д.Д., Губский Л.В. Чехонин В.П., Ярыгин К.Н. и др. // **Клеточные технологии в биологии и медицине.** – 2021 - № 2 – С. 90-96.

12. Gubskiy I.L. MRI-Based and Histologically Verified 3D Modeling of Spatial Distribution of Intra-Arterially Transplanted Cells in Rat Brain // Namestnikova D.D., Gubsky L.V., Chekhonin V.P., Yarygin K.N. et al. // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** – 2021.- Т. 171, № 2.– С. 517–522. **Scopus**

13. Gubskiy I.L. The Impact of Cerebral Perfusion on Mesenchymal Stem Cells Distribution after Intra-Arterial Transplantation: A Quantitative MR Study // Namestnikova D.D., Abakumov M.A., Chekhonin V.P., Gubsky L.V., Yarygin K.N. et al. // **Biomedicines.** – 2022. - Т.10, № 2.- С. 353. **Scopus**

ТЕЗИСЫ

1. Наместникова Д.Д. Прижизненная визуализация мезенхимальных стволовых клеток в головном мозге крыс с использованием различных режимов магнитно-резонансной томографии / Ярыгин К.Н., Губский Л.В. и др. // 2-й национальный конгресс по регенеративной медицине: Труды Конгресса. – Москва, 2015. – С.119-120.

2. Наместникова Д.Д. МРТ контроль миграции мезенхимальных стволовых клеток в мозге крыс / Губский И.Л., Губский Л.В., Ярыгин К.Н. // Нейронаука для медицины и психологии: 11-й Международный междисциплинарный конгресс: Труды Конгресса. – Москва: МАКС Пресс, 2015. – С. 290-291.

3. Kutasheva A. MR protocol optimization for rodent model of middle cerebral artery occlusion for drug discovery and early preclinical trials / Gubskiy I., Namestnikova D., Gubsky L.V., Pogoreltsev V., Gulyaev M.V., Pirogov Y.A. // Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine. – 2015 - Т.28 , №1S. – С. 365-366.

4. Губский Л.В. Мультимодальная МРТ характеристика эндоваскулярной модели острой фокальной ишемии мозга у крыс / Наместникова Д.Д., Губский И.Л. // Нейронаука для медицины и психологии: 12-й Международный междисциплинарный конгресс: Труды Конгресса. – Москва: МАКС Пресс, 2016. – С. 138.

5. Namestnikova D. Intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells in ischemic stroke: preventing the complications. / Gubskiy I., Gubsky L., Yarygin K. et al. // *International Journal of Stroke*. – 2016. – Т.11, №3S. – С 23-24.
6. Gubskiy I. Intraoperative MRI control in transient middle cerebral artery occlusion model in rodents. / Namestnikova D., Yarygin K., Gubsky L. // *European Stroke Journal*. – 2017. – Т.2, №1S. – С. 213.
7. Namestnikova D. Mesenchymal stem cells in treatment of ischemic stroke: therapeutic effects, cell migration and complications after intra-arterial infusion in rats / Gubskiy I., Gubsky L., Yarygin K. et al. // *European Stroke Journal*. – 2017. – Т.2, №1S. – С. 213-214.
8. Наместникова Д.Д. Мезенхимальные стволовые клетки в лечении экспериментального ишемического инсульта: терапевтические эффекты, миграция клеток и осложнения после внутриартериального введения у крыс / Губский И.Л., Губский Л.В., Ярыгин К.Н. и др. // *Гены и клетки*. - 2017. - Т. 12, № 3. – С.175.
9. Namestnikova D. A comparative study of mesenchymal stem cell, IPS-derived neural progenitor cells and directly reprogrammed neural progenitor cells in treatment of ischemic stroke in rats / Gubskiy I.L., Gubsky L.V., Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yarygin K.N. et al. // *International Journal of Stroke*. – 2018. – Т.13, №2S. – С 81-82.
10. Губский Л.В. Модель временной окклюзии средней мозговой артерии у крыс с интраоперационным МРТ контролем / Губский И.Л., Наместникова Д.Д., Черкашова Э.А., Баклаушев В.П., Ярыгин К.Н. // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2019. – Т.119, № 5-2. – С. 514-515.
11. Д.Д. Наместникова Сравнение эффективности внутриартериальной трансплантации мезенхимальных стромальных клеток плаценты, репрограммированных нейральных прогениторных клеток и нейральных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых, в терапии экспериментального инфаркта мозга у крыс / Губский И.Л., Чехонин В.П., Баклаушев В.П., Ярыгин К.Н., Губский Л.В. и др. // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2019. – Т.119, № 5-2. – С. 520-521.
12. Наместникова Д.Д. Терапевтическая эффективность и биораспределение мезенхимальных стромальных клеток и нейральных прогениторных клеток, полученных из разных источников, после внутриартериальной трансплантации крысам с моделью экспериментального инфаркта мозга / Губский И.Л., Губский Л.В., Баклаушев В.П., Ярыгин К.Н. и др. // *Гены и клетки*. - 2019. - Т.14, №4. – С.161-162.
13. Губский Л.В. Экспериментальная модель инфаркта мозга у крыс для изучения влияния трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на церебральные изменения / Наместникова Д.Д., Губский И.Л. // *Нейронаука для медицины и психологии: XVI Международный междисциплинарный конгресс: Труды Конгресса*. – Москва: МАКС Пресс, 2020. – С. 168-169.
14. Наместникова Д.Д. Распределение мезенхимальных стромальных клеток человека в головном мозге после их внутриартериального введения крысам с моделью экспериментального ишемического инсульта при помощи МРТ в режиме реального времени / Губский И.Л., Баклаушев В.П., Губский Л.В., Ярыгин К.Н. и др. // *Нейронаука для медицины и психологии: XVII Международный междисциплинарный конгресс: Труды Конгресса*. – Москва: МАКС Пресс, 2021. – С. 276-277.
15. Namestnikova D. Real-time MRI of mesenchymal stem cell distribution in rat brain after intra-arterial and intravenous transplantation in experimental stroke // Cherkashova E., Gubskiy I., Gubskiy L., Yarygin K. et al. // *International Journal of Stroke*. – 2021. - Т. 16, №2. – С. 101-102.
16. Gubskiy I. Selective intra-arterial perfusion for prediction of stem cells distribution after intra-arterial transplantation / Namestnikova D., Gubskiy L., Yarygin K. et al. // *International Journal of Stroke*. – 2021. – Т. 16, №2. – С. 509-110.

17. Губский И.Л. Селективное внутриартериальное мр-перфузионное исследование головного мозга при внутриартериальной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток/ Наместникова Д.Д., Губский Л.В., Ярыгин К.Н. и др. // Нейронаука для медицины и психологии: XVIII Международный междисциплинарный конгресс: Труды Конгресса. – Москва: МАКС Пресс, 2022. – С. 111-112.

18. Наместникова Д.Д. Системная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальном инфаркте мозга / Черкашова Э.А., Губский И.Л., 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.

Список сокращений и условных обозначений

ВИ - взвешенные изображения;

ДВИ – диффузионно-взвешенные изображения;

ИИ – ишемический инсульт;

ИКД – измеряемый коэффициент диффузии;

МСК – мезенхимальные стволовые клетки;

МРТ – магнитно-резонансная томография;

МСК – мезенхимальные стволовые клетки;

НСА – наружная сонная артерия;

ОСА – общая сонная артерия;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СК – стволовые клетки;

СМА – средняя мозговая артерия;

ЭОСМА – эндоваскулярная окклюзия средней мозговой артерии;

ICAM – inter-cellular adhesion molecule 1, молекула межклеточной адгезии 1 типа;

mNSS - modified neurological severity score, модифицированная шкала оценки тяжести инсульта;

PECAM-1 – platelet endothelial cell adhesion molecule 1, молекула адгезии эндотелиальных клеток/тромбоцитов 1 типа;

SPIO – superparamagnetic iron oxide, суперпарамагнитные частицы оксида железа;

VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule 1, молекула адгезии сосудистых клеток 1 типа;

SWI – susceptibility-weighted imaging, изображения, взвешенные по магнитной восприимчивости.