

ТЕОРЕТИЧНА І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

<https://doi.org/10.35339/msz.2020.86.01.01>

УДК 616.831-005.1-092.9:602.9:611.013.395

І.С. Пуляєва

*ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії
ім. В.Т. Зайцева НАМН України», м. Харків, Україна*

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МОДЕЛЬ ГОСТРОЇ ІШЕМІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ З ІНТРААРТЕРІАЛЬНОЮ ТРАНСПЛАНТАЦІЄЮ МЕЗЕНХІМНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

В основі експериментальної моделі полягає формування гострої ішемії головного мозку шляхом легування загальної сонної артерії з подальшим інтраартеріальним введенням мезенхімних стовбурових клітин у загальну сонну артерію. Експерименти проводили на 15 самках кролів середньоевропейських у віці 12–36 тижнів масою 4–6 кг. Під місцевою та внутрішньовенною анестезією проєкційно виділяли загальну та внутрішню сонні артерії. Загальну сонну артерію перев'язували та вводили мезенхімні стовбурові клітини. Через 1 міс виконували гістохімічне дослідження головного мозку експериментальних тварин. Популяція мезенхімних стовбурових клітин, що вводили, складалася на 96 % із клітин, позитивних за маркерами мезенхімних стовбурових клітин, і менш ніж на 2 % із гемопоетичних клітин і клітин ендотелію, позитивних за відповідними маркерами. Через 6 год після внутрішньоартеріального введення мезенхімних стовбурових клітин було виконано декапітацію одного кроля для гістологічного дослідження головного мозку для візуалізації GFP-позитивних клітин, мічених також ліпофільним маркером PKH26. Через 6 год після трансплантації мезенхімні стовбурові клітини розподілялися у правій півкулі в ділянці кори і базальних ядер (у зоні кровопостачання правої внутрішньої сонної артерії) і візуалізувалися вздовж внутрішньої стінки церебральних судин як у зоні інфаркту мозку, так і по периферії. Уперше отримано експериментальне підтвердження того, що терапевтична активність стовбурових клітин виникає при їхній системній трансплантації та доставці по артерії, що насичує кров'ю зону ішемічного ушкодження мозку.

Ключові слова: сонні артерії, мезенхімні стовбурові клітини, ішемічний інсульт.

Вступ

Трансплантація мезенхімних стовбурових клітин (МСК) є перспективною парадигмою для лікування хворих з ішемічним інсультом. Однак доставка МСК до органів-мішеней є проблемою, тому що після внутрішньовенної інфузії більшість інфузійних клітин потрапляють у легені, що виступають у ролі фільтруючого органа, а після потрапляння у велике коло кровообігу знижується їхня ефективна концентрація [1, 2]. Внутрішньоартеріальна інфузія є

більш ефективним методом доставки МСК, але навіть після цілеспрямованого введення МСК залишається проблема їхньої ефективної інтеграції в паренхіму головного мозку. Більше того, як у доклінічних, так і у клінічних дослідженнях повідомлялось про ускладнення, зокрема про церебральну емболію після внутрішньоартеріальної трансплантації МСК [3]. Відомо, що трансендотеліальна міграція і клітинна адгезія відбуваються опосередковано завдяки взаємодії трансмембранних рецеп-

© І.С. Пуляєва, 2020

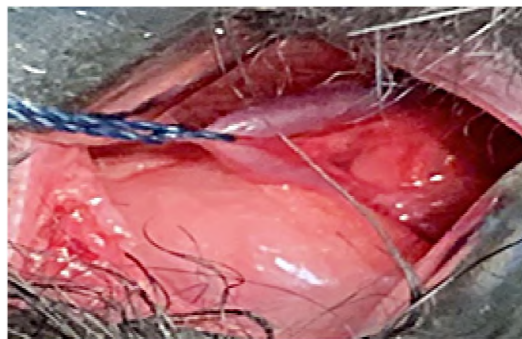
торів VLA4 (дуже пізній антиген-4, інтегрин $\alpha 4\beta 1$), що експресуються стовбуровими клітинами, лейкоцитами та іншими клітинами і VCAM1 (молекула адгезії судинних клітин-1, що експресується на великих і малих судинах в організмі) [4]. Молекула адгезії VCAM1 надмірно експресується на ендотеліальних клітинах головного мозку після інсульту [5]. Мезенхімні стовбурові клітини зазвичай експресують інтегрин $\beta 1$, субодиницю VLA4, але недостатню кількість ITGA4 (інтегрин $\alpha 4$) [5], що може обмежити їхні можливості самонаведення. Доведено гіпотезу, що надмірна експресія ITGA4 на МСК посилює їхні самонаведення мозку після внутрішньокаротидної трансплантації тваринам після перенесеного ішемічного інсульту [5, 6] та зменшує клітинну церебральну емболію, зменшуючи порушення мозкового кровотоку [7].

Мета даного дослідження – зменшення проявів неврологічного дефіциту під час експериментального моделювання ішемії головного мозку у тварин, викликаній оклюзією загальної сонної артерії, шляхом уведення мезенхімних стовбурових клітин у сонну артерію.

Матеріал і методи

Експерименти проводили на 15 самках кролів середньоєвропейських у віці 12–36 тижнів масою 4–6 кг. Пряме джерело: лабораторне вирощування. Тварин утримували у віварії в умовах 12-годинного циклу день / ніч при температурі 22–25 °С. Експерименти на тваринах проводили відповідно до національних рекомендацій щодо догляду й використання тварин відповідно до директиви Європейського Союзу (2010/63/ЄС) та згідно з рішенням етичного комітету Асоціації біобанків України № 2907.2. Тварини мали вільний доступ до їжі та води. Проведено експеримент на 15 кролях, які були розподілені на дві групи: перша – 8 кролів, які отримували лікування МСК, друга – 7 кролів, яким вводили ноотропні препарати.

Кролям обох груп під місцевою і внутрішньовенною анестезією після розсічення шкіри виділяли загальну та внутрішню сонні артерії. У загальну сонну артерію вводили МСК у першій групі та ноотропні препарати у другій групі на рівні біфуркації з її перев'язуванням одразу після введення (рисунки). Для проведення анестезії використовували 0,1 % лідокаїн та пропофол із розрахунку дози на 1 кг маси тіла тварини. Кролів виводили з експерименту



Лігатура на загальну сонну артерію кроля

шляхом декапітації під наркозом. Препарати, що використовувались у постхірургічному періоді догляду за тваринами, – антибіотик цефтриаксон внутрішньовенно.

Виразність проявів ішемії головного мозку оцінювали на 1-шу, 8-му та 15-ту доби після оперативного втручання шляхом визначення неврологічного дефіциту за шкалою тяжкості інсульту національних інститутів здоров'я США (NIHSS). Шкала розділена на бали від 0 до 20, де 20 балів відповідають повному паралічу кінцівок, комі, 0 балів – повній координації, позиції та положенню кінцівки по відношенню до тулуба, стабільному положенню тіла і хвоста. Локомоторний тест виконували в ті ж самі терміни, тварину поміщали у пластиковий циркулярний кейс із неслизькою підлогою. Оцінювали рухи стегон, положення лап, можливість утримувати вагу протягом 4 хв вільного руху тварини.

Через 1 міс проводили забір ділянки головного мозку в обох групах, за винятком 1 кроля із кожної групи, яким виконали декапітацію через 6 год після експериментальної ішемії головного мозку (ЕІГМ). Аналіз міжклітинної взаємодії МСК із мікрооточенням у мозку проводили через 6 год на зрізах головного мозку за допомогою конфокальної мікроскопії.

Результати та їх обговорення

Мультипотентні МСК з аутовенозної крові кролів були фенотиповані на третьому пасажі за наявністю маркерів, специфічних для МСК: CD44, CD90, CD73, CD105; маркерів гемопоетичних стовбурових клітин: CD45, CD34, а також маркера клітин ендотелію: CD31. Отримана популяція клітин складалася на 96 % із клітин, позитивних за маркерами МСК, і менш ніж на 2 % із гемопоетичних клітин і клітин ендотелію, позитивних за відповідними маркерами.

Через 6 год після введення у праву загальну сонну артерію МСК та її перев'язування виконано декапітацію одного кроля для гістологічного дослідження головного мозку кролів для візуалізації GFP-позитивних клітин, мічених також ліпофільним маркером РКН26. Клітини розподілялися в ділянці кори і базальних ядер правої півкулі (у зоні кровопостачання правої внутрішньої сонної артерії). Мезенхімні стовбурові клітини візуалізуються всередині церебральних судин, уздовж їхньої внутрішньої стінки як у зоні інфаркту мозку, так і по периферії і контактують з ендотеліоцитами. Проаналізувавши гістологічні зображення, ми встановили, що деякі клітини розташовуються всередині судин, інші – у їхніх стінках. Можливо, відбувається міграція МСК уздовж внутрішньої поверхні ендотелію мозкових судин. Отже, спостерігається накопичення GFP і РКН26, мічених МСК, у мозку безпосередньо після їхньої внутрішньоартеріальної інфузії.

У зрізах головного мозку кролів у ділянці введення МСК вдалося виявити GFP-позитивні включення у клітинах, прилеглих до МСК, що мають яскраву флуоресценцію GFP-білка. Імуногістохімічними методами нами було підтверджено, що клітини із включеннями GFP-білка позитивно забарвлювались на β -III-тубулін, тобто були нейронами.

Таким чином, отримано експериментальне підтвердження того, що терапевтична активність стовбурових клітин виникає при їхній внутрішньоартеріальній трансплантації та доставці по артерії, що насичує кров'ю зону ішемічного ушкодження мозку. Отримані дані надають практичний сенс подальшим доклінічним дослідженням із клітинної терапії інсульту з використанням МСК, тому що внутрішньоартеріальна трансплантація – це відносно проста процедура.

Трансплантація нативних МСК приводила до статистично значущого зниження об'єму пошкодження на 25 % – до (179 ± 16) мм³ на відміну від такого у тварин, які отримали ноотропні препарати після перев'язування загальної сонної артерії, при цьому об'єм пошкодження становив (223 ± 15) мм³.

Ефективність методики відтворення моделі повного пошкодження головного мозку оцінювали за результатами шкали неврологічного дефіциту NIHSS. У передопераційному

тестуванні показано, що всі кролі першої групи були без неврологічних випадів із другої доби. Ішемічне пошкодження, виявлене в ділянці кори і стріатума, у тварин другої групи викликало сенсомоторний дефіцит, який оцінювали в динаміці протягом 15 діб. У тварин другої групи спостерігались яскраво виражені порушення чутливості й рухової активності передніх і задніх кінцівок із контралатерального боку від пошкодженої півкулі вже з першої доби. У тварин першої групи неврологічний статус дорівнював у середньому $(8,5 \pm 0,5)$ бала на 1-шу добу після перев'язування сонної артерії і спонтанно відновлювався до $(3,4 \pm 0,5)$ бала на 8-му добу, тоді як у групі без клітинної терапії він дорівнював $(13,5 \pm 0,5)$ бала протягом усього тестування. У групі тварин, які отримували МСК, спостерігалось статистично значуще відновлення сенсомоторних функцій починаючи з 8-ї доби після експериментального моделювання ішемії головного мозку. При післяопераційному тестуванні на 1-шу, 8-му та 15-ту доби в усіх тварин другої групи відмічались неврологічний дефіцит із повним випадінням рухової функції та частковим відновленням із 15-ї доби.

Таким чином, отримано результати щодо нейропротекторних ефектів МСК. Серед аргументів на підтримку теорії паракринного механізму нейропротекторного ефекту стовбурових клітин було таке спостереження – позитивні ефекти від МСК проявляються досить швидко після їхньої трансплантації. Однак механізми, що лежать в основі регенеративного потенціалу, до кінця не ясні і потребують подальшого вивчення. Один зі способів дослідження механізмів впливу стовбурових клітин на функцію органа полягає в безпосередньому вивченні взаємодії між клітинами організму і трансплантованими клітинами, у пошуку хімічних сполук, які стовбурові клітини можуть секретувати в міжклітинний простір після їхньої трансплантації. Те ж саме стосується і клітин реципієнта, оскільки вони можуть реагувати на присутність трансплантованих клітин синтезом і секрецією різних біологічних сполук. Таке «спілкування» між сусідніми в тканині клітинами або навіть віддаленими органами всередині одного організму з великою ймовірністю має місце, і отримано досить велику кількість даних, що підтверджують існування даного феномена.

Висновки

Під час експериментальної моделі ішемії головного мозку у тварин, викликаної оклюзією загальної сонної артерії, шляхом уведення мезенхімних стовбурових клітин у сонну артерію доведено зменшення проявів неврологічного дефіциту до $(8,5 \pm 0,5)$ бала відносно показника групи тварин, які не отримували стовбурових клітин, що в середньому становив $(13,5 \pm 0,5)$ бала неврологічного дефіциту на 1-шу добу ішемії головного мозку.

Подана модель ішемії головного мозку у тварин із ураженням мозку викликає серйозні

неврологічні порушення (від 5 до 15 балів за шкалою NIHSS), а використання мезенхімних стовбурових клітин за неможливості відновлення кровообігу доводить ефективність лікування й зменшення проявів неврологічного дефіциту.

Перспективність дослідження

Зазначена експериментальна модель ішемії мозку з трансплантацією стовбурових клітин допомагає виключити спонтанну регенерацію нейронів, що особливо важливо в експериментах по створенню гострого порушення мозкового кровообігу.

Список літератури

1. Lappalainen R.S., Narkilahti S., Huhtala T., Liimatainen T., Suuronen T., Narvanen A. et al. (2008). The SPECT imaging shows the accumulation of neural progenitor cells into internal organs after systemic administration in middle cerebral artery occlusion rats. *Neurosci. Lett.*, vol. 440, issue 3, pp. 246–250. DOI: 10.1016/j.neulet.2008.05.090, PMID: 18572314.
2. Paraskevas K.I., Veith F.J., Spence J.D. (2018). How to identify which patients with asymptomatic carotid stenosis could benefit from endarterectomy or stenting. *Stroke Vasc. Neurol.*, vol. 3, issue 2, pp. 92–100. DOI: 10.1136/svn-2017-000129, PMID: 30022795, PMCID: PMC6047337.
3. Boltze J., Arnold A., Walczak P., Jolkonen J., Cui L., Wagner D.C. (2015). The dark side of the force – constraints and complications of cell therapies for stroke. *Front. Neurol.*, vol. 6, pp. 155. DOI: 10.3389/fneur.2015.00155, PMID: 26257702, PMCID: PMC4507146.
4. Nitzsche F., Muller C., Lukomska B., Jolkonen J., Deten A., Boltze J. (2017). Concise review: MSC adhesion cascade-insights into homing and transendothelial migration. *Stem Cells*, vol. 35, issue 6, pp. 1446–1460. DOI: 10.1002/stem.2614, PMID: 28316123.
5. Gauberti M., Montagne A., Marcos-Contreras O.A., Le Behot A., Maubert E., Vivien D. (2013). Ultra-sensitive molecular MRI of vascular cell adhesion molecule-1 reveals a dynamic inflammatory penumbra after strokes. *Stroke*, vol. 44, issue 7, pp. 1988–1996. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.000544, PMID: 23743972.
6. Abbott A.L., Nicolaides A.N. (2015). Improving outcomes in patients with carotid stenosis: call for better research opportunities and standards. *Stroke*, vol. 46, issue 1, pp. 7–8. DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.007437, PMID: 25406149.
7. Maerz J.K., Roncoroni L.P., Goldeck D., Abruzzese T., Kalbacher H., Rolauffs B. et al. (2016). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells differ in their attachment to fibronectin-derived peptides from term placenta-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 7, pp. 29. DOI: 10.1186/s13287-015-0243-6, PMID: 26869043, PMCID: PMC4751672.

И.С. Пуляева

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ОСТРОЙ ИШЕМИИ МОЗГА С ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В СОННУЮ АРТЕРИЮ

В основе экспериментальной модели лежит формирование острой ишемии головного мозга путем легирования общей сонной артерии с дальнейшим введением мезенхимальных стволовых клеток в общую сонную артерию. Эксперименты проводили на 15 самках кролей среднеевропейских в возрасте 12–36 недель массой 4–6 кг. Под местной и внутривенной анестезией проекционно выделяли общую и внутреннюю сонные артерии. Общую сонную артерию перевязывали и вводили мезенхимальные стволовые клетки. Через 1 мес выполняли гистохимическое исследование головного мозга экспериментальных животных. Популяция клеток, выделенных из мозга, состояла на 96 % из клеток, положительных по маркерам мезенхимальных стволовых клеток, и менее чем на 2 % из гемопоэтических клеток и клеток эндотелия, положительных по соответствующим маркерам. Через 6 ч после внутриартериального введения мезенхимальных стволовых клеток была выполнена декапитация одного кроля для гистологического исследования для визуализации GFP-по-

зитивних кліток, мечених також маркером ліпофіла РКН26. Через 6 ч після трансплантації мезенхімальні стоволові клітки розподілялись у правого півшаря в області кори і базальних ядер (в зоні кровоснабження правої внутрішньої сонної артерії) і візуалізувались вздовж внутрішньої стінки церебральних судин як в зоні інфаркту мозку, так і по периферії. Вперше отримано експериментальне підтвердження того, що терапевтична активність стоволових кліток виникає при їх системній трансплантації і доставці по артерії, яка насичує кров'ю зону ішемічного пошкодження мозку.

Ключові слова: сонні артерії, мезенхімальні стоволові клітки, ішемічний інсульт.

I.S. Pulyaeva

AN EXPERIMENTAL MODEL OF ACUTE CEREBRAL ISCHEMIA WITH TRANSPLANTATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS INTO THE CAROTID ARTERY

Transplantation of mesenchymal cells is a perspective paradigm for treatment of stroke. However after intravenous injection most infusion cells get in filter organs, such as lungs. Experimental model of cerebral ischemia with transplantation of mesenchymal cells in a carotid was developed. Experiments on 15 animals conducted on by the females of crawls in age 12–36 weeks weighing 4–6 kg. The general and internal carotid arteries were projected under local and intravenous anesthesia. General carotid artery was ligated and mesenchymal stem cells were injected. The population of the cages abstracted from a brain was folded on 96 % from cages positive for by the markers of mesenchymal cells, and less than on 2 % from hematopoietic cells and cells of endothelia, positive after corresponding markers. In 6 hour after introduction to the right internal carotid of mesenchymal cells, the histological encephaloscropy of crawls was executed for visualization of GFP-positive cages mark also the marker of lipophil of PKH26. In 6 hour after transplantation of cage distributed at a right hemisphere in area of bark and basale kernels (in the zone of blood supply of right internal carotid) and visualized along the midwall of cerebral vessels both in the zone of heart attack of brain and for peripheries. Experimental confirmation of that therapeutic activity of mesenchymal cells arises up during their system transplantation and delivery on an artery that supplies with blood the zone of ischemic damage of brain is first got.

Keywords: carotid arteries, mesenchymal stem cells, ischemic stroke.

Надійшла 22.01.20

Відомості про автора

Пуляєва Інна Сергіївна – кандидат медичних наук, старший науковий співробітник відділення гострих захворювань судин ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМНУ» (м. Харків).

Адреса: 61103, м. Харків, в'їзд Балакірева, 1, ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМНУ».

Тел.: +38(057)349-41-50.

E-mail: pulyaeva.inna@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6824-7232>.