

Лекция 3

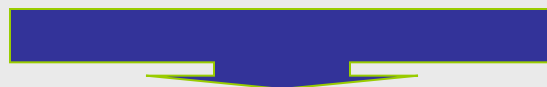
Возможности применения клеточной терапии для лечения ишемического инсульта

Ярыгин Константин Никитич

**д.б.н., член-корр. РАН
зав. лаб. клеточной биологии
ФГБУ «ИБМХ» РАН**

Лечение ишемического инсульта:

- ❑ *улучшение перфузии вещества мозга*
- ❑ *нейропротективная терапия*
- ❑ *репаративная терапия*



**клеточные
технологии**

Цель предварительных исследований

**комплексное изучение
эффектов трансплантации
мезенхимальных стволовых
клеток (МСК) на модели
ишемического инсульта у крыс**

Задачи исследований

- Выбрать и отработать оптимальную (изучение механизма действия трансплантированных клеток, предклинические исследования «токсичности» и эффективности) модель ишемического инсульта
- Разработать методы контроля размера очага ишемии и неврологического статуса животных
- Выбрать наиболее перспективный источник выделения МСК
- Разработать стандартный протокол получения клеточного продукта для трансплантации
- Выработать протокол проведения экспериментов по изучению эффекта трансплантации МСК на восстановление животных после экспериментального ишемического инсульта и провести такие эксперименты
- Изучить клеточные и молекулярные механизмы эффектов МСК

Модель ограниченного экспериментального ишемического инсульта мозга у крыс

В экспериментах использовали крыс-самцов Вистар весом 260-300 г. Временная окклюзия средней мозговой артерии (ОСМА) достигалась продвижением нейлоновой хирургической нити размера 4.0 с утолщенным силиконовым наконечником из внешней сонной артерии через внутреннюю сонную артерию в просвет средней мозговой артерии, что приводило к закупорке последней (модиф. метод Woitzik et al., 2005).

После 1 часа окклюзии хирургическая нить удалялась и происходила реперфузия бассейна средней мозговой артерии. Качество реперфузии контролировалось.

Данные МРТ

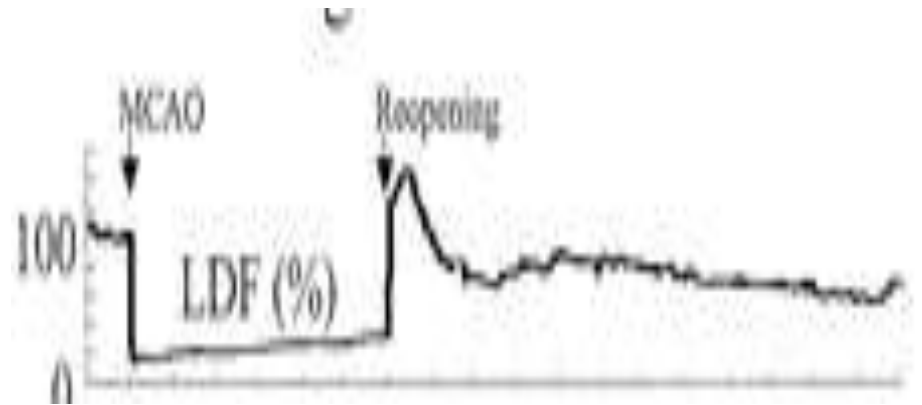
- У всех прооперированных животных развивалась типичная картина локальной ишемии головного мозга, подтверждаемая данными МРТ



Первые сутки после операции.
Режим T2. Массивный корково-
подкорковый очаг.

Преимущества эндоваскулярной модели ОСМА в нашей модификации

- Сравнительно небольшая травматичность вмешательства и хорошая переносимость операции крысами
- Высокая степень воспроизводимости характеристик очага ишемии от животного к животному
- Возможность контроля реперфузии (ЛДФ, определенный режим МРТ)



Трансплантация клеток

После операции ОСМА животным позволяли восстановиться в течение суток, а затем в бедренную вену вводили мезенхимальные стволовые клетки (МСК), выделенные из амниона и Вартонова студня пуповины человека после нормальных родов (2 млн клеток в 1 мл физиологического раствора). После выделения МСК подвергали экспансии в культуре и метили магнитными флуоресцирующими микрочастицами (Bangs Lab.). Непосредственно перед трансплантацией МСК трижды промывали физиологическим раствором. Контрольным животным внутривенно вводили 1 мл физиологического раствора.

МСК из плаценты человека. Регистрационное удостоверение, выданное Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития


ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ

№ ФС-2006/ 340 от 04 декабря 2006 г.
Действительно до 04 декабря 2009 г.

Название медицинской технологии:
Клеточный материал из плаценты человека: получение, культивирование, хранение и транспортировка

Аннотация:
Методика относится к клеточным биотехнологиям, направлена на получение фибробластоподобных клеток из плаценты (с согласия роженицы и при нормальном течении беременности и срочных родах на 38-40 неделях гестации) и включает следующие стадии: тестирование донора (матери); забор биоматериала; транспортировка, выделение клеток путём механического воздействия на ткани плаценты, культивирование клеточной культуры, титрование клеток, тестирование и паспортизация клеточного материала, криоконсервация и длительное криохранилище.

Показания, противопоказания и материально-техническое оснащение изложены в приложении*.

Разработчик/заявитель:
ГОУВПО «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (Российская Федерация, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1).

Соработчик: ООО «Медицинские технологии» (Российская Федерация, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1 стр. 1).

Уровень/масштаб использования:
ГОУ ВПО РГМУ Росздрава; ООО «Медицинские технологии».

Медицинская технология предназначена для:
квалифицированных специалистов с медицинском и/или биологическим образованием, имеющих опыт работы с культурами эукариотических клеток не менее 3-х лет.

Руководитель  **Р.У.Хабриев**
(подпись, печать)

* Регистрационное удостоверение без приложения недействительно.

Форм. № 00-0019. 017 (Москва, 2006).

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ**

№ ФС-2006 340 от 04 декабря 2006 г.

Название медицинской технологии:
Клеточный материал из плаценты человека: получение, культивирование, хранение и транспортировка

Показания:

- подготовительный этап для последующих научных исследований;
- в практическом здравоохранении (при получении соответствующих разрешений на применение);
- получение, культивирование и хранение в криобанке по заказу пациента аутофибробластов с возможностью дальнейшего использования по назначению (согласно разрешённым к применению медицинским технологиям).

Противопоказания:

- ВИЧ 1 и 2, гепатиты В и/или С, сифилис;
- аутоиммунные заболевания (склеродермия, системная красная волчанка, псориаз, ревматоидный артрит и др.);
- Онкологические заболевания.

Материально-техническое обеспечение медицинской технологии:

- Гентамицин 4% рег.№ 003962/01 (Россия), питательная среда DMEM жидкая, рег.№002346/01-2003 (Россия), сыворотка крови плодов коровы рег.№002358/01-2003 (Россия), коллагеназа рег.№ 69/446/6 (Россия), димексид рег.№ 75/244/9 (Россия), Вересен раствор рег.№ 000779/01-2001 (Россия), трипсин стерильный для культуры клеток сухой рег.№ 98/171/4 (Россия), антитела к HLA-ABC, HLA-DR, CD105, CD44, CD34, CD29, CD54, CD13, CD45, CD59, CD117 рег.№2004/10-52 (США);
- Посуда для культивирования клеток и пробирки для хранения и обработки биологических образцов рег.№2002/1037 (Дания); принадлежности для медицинских исследований (наконечники для пипеток, пилетки пробирки, флаконы) рег.№ 2003/969;
- Центрифуга "Biofuge", CO₂-инкубатор "HERAcell", ламинарный шкаф "HERAsafe", термостаты серии В, термостаты низкотемпературные серии ВК рег.№ 98/1598, установка очистки и обеззараживания воздуха БОВ-001-AMC рег.№ 29/16020496/2643-01, инвертированный микроскоп Карл Цейс Axiavert 25 рег.№ 97/539, флуоресцентный микроскоп Карл Цейс Axioplan 2 рег.№ 2002/769, инвертированный флуоресцентный микроскоп Карл Цейс Axiocvert 200 рег.№2002/348; проточный цитофлуориметр Beckman Coulter Cytomics FC-500 рег.№2003/1665; программный медицинский замораживатель KRYO, рег.№2002/1017 (Великобритания).

Руководитель  **Р.У.Хабриев**
(подпись, печать)

Форм. № 00-0019. 017 (Москва, 2006).

МСК из пуповины человека. Регистрационное удостоверение, выданное Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ

№ ФС-2006/ 341 от 04 декабря 2006 г.
Действительно до 04 декабря 2009 г.

Название медицинской технологии:
Клеточный материал из пуповины человека: получение, культивирование, хранение и транспортировка

Аннотация:
Методика относится к клеточным биотехнологиям, направлена на получение фибробластоподобных клеток из пуповины новорожденного (с согласия роженицы и при условии нормального течения беременности и срочных родах на 38-40 неделях гестации) и включает следующие стадии: тестирование донора (матери), забор биоматериала, транспортировка, выделение и культивирование клеточной культуры, титрование клеток, тестирование и паспортизация клеточного материала, криоконсервация и длительное криохранилище.

Показания, противопоказания и материально-техническое оснащение изложены в приложении*.

Разработчик/заявитель:
ГОУВПО «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (Российская Федерация, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1).

Сотрабатчик: ООО «Медицинские технологии» (Российская Федерация, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1 стр.1).

Уровень/масштаб использования:
ГОУ ВПО РГМУ Росздрава; ООО «Медицинские технологии».

Медицинская технология предназначена для:
квалифицированных специалистов с медицинским и/или биологическим образованием, имеющих опыт работы с культурами эукариотических клеток не менее 3-х лет.

Руководитель  **Р.У.Хабриев**
(подпись, печать)

* Регистрационное удостоверение без приложения недействительно.

Форм. № 0024. 03.12.2004. 2/04.

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ**

№ ФС-2006 341 от 04 декабря 2006 г.

Название медицинской технологии:
Клеточный материал из пуповины человека: получение, культивирование, хранение и транспортировка

Показания:

- подготовительный этап для последующих научных исследований;
- в практическом здравоохранении (при получении соответствующих разрешений на применение);
- получение, культивирование и хранение в криобанке по заказу аутофибробластов с возможностью дальнейшего использования по назначению (согласно разрешенным к применению медицинским технологиям).

Противопоказания:

- ВИЧ I и II, гепатиты В и/или С, сифилис;
- аутоиммунные заболевания (склеродермия, системная красная волчанка, псориаз, ревматоидный артрит и др.);
- онкологические заболевания.

Материально-техническое обеспечение медицинской технологии:

- Гептаминин 4% рег.№ 003962/01 (Россия), питательная среда ДМЕМ жидкая, рег.№002346/01-2003 (Россия), сыворотка крови плод коровы рег.№002358/01-2003 (Россия), коллагеназа рег.№ 69/446/6 (Россия), димексид рег.№ 75/244/9 (Россия), Версена раствор рег.№ 000779/01-2001 (Россия), трипсин стерильный для культуры клеток сухой рег.№ 98/171/4 (Россия), антигены к HLA-ABC, HLA-DR, CD105, CD44, CD34, CD29, CD54, CD13, CD45, CD59, CD117 рег.№2004/10-52 (США);
- Посуда для культивирования клеток и пробирки для хранения и обработки биологических образцов рег.№2002/1037 (Дания); принадлежности для медицинских исследований (наконечники для пипеток, пипетки пробирки, флаконы) рег.№ 2003/969;
- Центрифуга "Biofuge", CO₂-инкубатор "HERAcell", ламинарный шкаф "HERAsafe", термостаты серии В, термостаты низкотемпературные серии ВК рег.№ 98/1598, установка очистки и обеззараживания воздуха БОВ-001-АМС рег.№ 29/16020496/2643-01, инвертированный микроскоп Карл Цейс Axiovert 25 рег.№ 97/539, флуоресцентный микроскоп Карл Цейс Axioplan 2 рег.№ 2002/769, инвертированный флуоресцентный микроскоп Карл Цейс Axiovert 200 рег.№2002/348; проточный цитометр Beckman Coulter Cytomics FC-500 рег.№2003/1665; программный медицинский замораживатель KRYO, рег.№2002/1017 (Великобритания).

Руководитель  **Р.У.Хабриев**
(подпись, печать)

Форм. № 0024. 03.12.2004. 2/04.

Процесс выбора и стандартизации любого клеточного продукта включает

- Выбор первичного материала для выделения клеток
- Создание протокола изоляции источника первичного материала и его транспортировки в лабораторию
- Разработка протокола выделения нужных клеток
- Разработка протокола(ов) культивирования клеток
- Создания оптимального и эффективного по стоимости протокола экспансии клеток в культуре
- Разработка протокола контроля фенотипа клеток по экспрессии поверхностных маркеров
- Проверка клеток на способность к дифференцировке и трансдифференцировке
- Разработка протокола контроля жизнеспособности клеток
- Создание протокола контроля контаминации культуры клеток бактериями, вирусами, микоплазмами, микроскопическими грибами
- Создание протокола долговременной криоконсервации клеток и восстановления культуры после криоконсервации
- Разработка протокола кратковременной (от нескольких часов до нескольких дней) и транспортировки клеток
- Разработка методов масштабирования производства клеток определенного типа

Глоссарий

- **ММСК** (мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки) – гетерогенная популяция мультипотентных клеток костного мозга, способная дифференцироваться в клетки-производные мезодермы – фибробласты, остеобласты, хондробласты, адипоциты, а также, в надлежащих условиях *in vitro* и *in vivo*, - в клетки-производные эктодермы (в частности, нейроны) и эндодермы
- **МСК** – мезенхимальные стволовые клетки – гетерогенная популяция клеток в основном мезодермального происхождения, находящихся в специальных тканевых «нишах» различных органов и обладающих различным потенциалом дифференцировки. Среди них есть и плюрипотентные клетки.

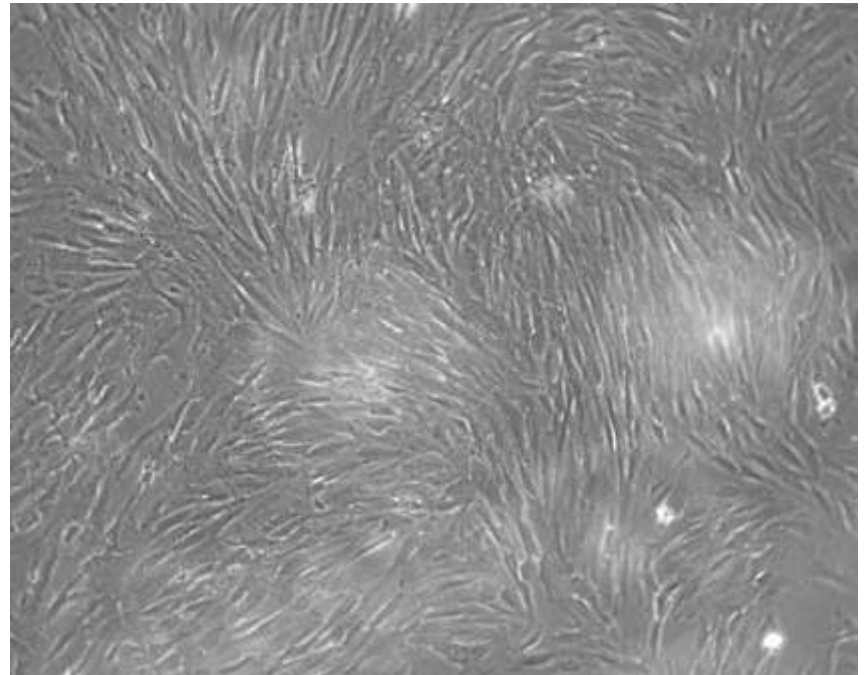
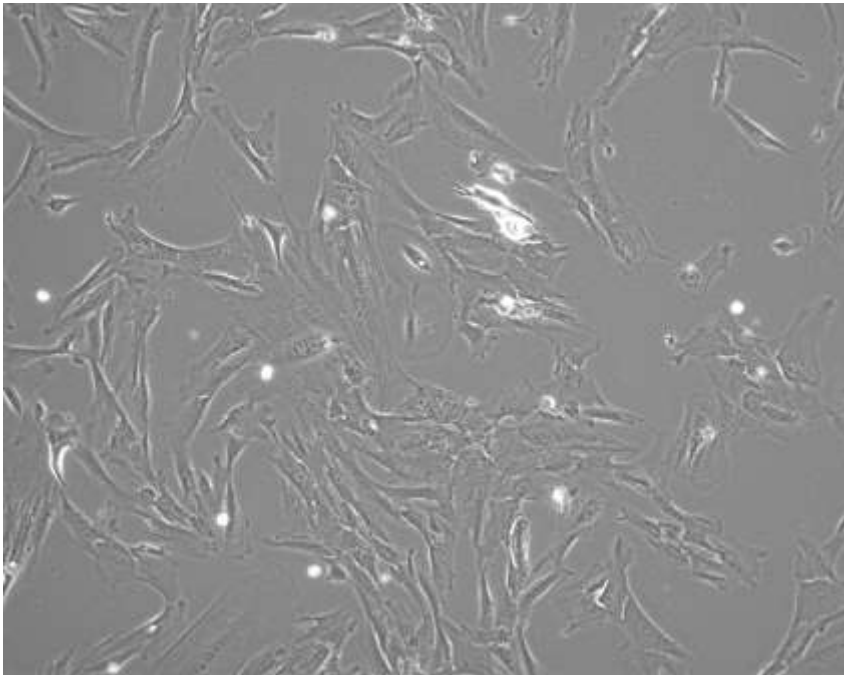
Источники МСК

- Костный мозг
- Периферическая кровь после введения ГМКСФ, например, Лейкомакса
 - Жировая ткань
 - Пульпа зуба
- Волосяной фолликул
- Фетальные ткани
- Вартонов студень пуповины
- Амнион и амниотическая жидкость
 - Хорион

Интерес к МСК связан с их необычными свойствами – неиммуногенностью, плюрипотентностью, способностью снижать остроту иммунологических конфликтов, ролью в создании тканевых «ниш» и способностью направлять дифференцировку эпителиальных, нервных и других клеток.

Дополнительные преимущества
фетальных МСК и МСК из плаценты
и пуповины – их способность
секретировать цитокины и другие
биологически активные вещества в
соотношении и количествах,
обеспечивающих активизацию
процессов регенерации многих
тканей

**Фибробластоподобные клетки, выделенные из
плаценты (хорион) на 2-й (слева) и 12-й день (справа)
культивирования**



CD

KM

Плацинта

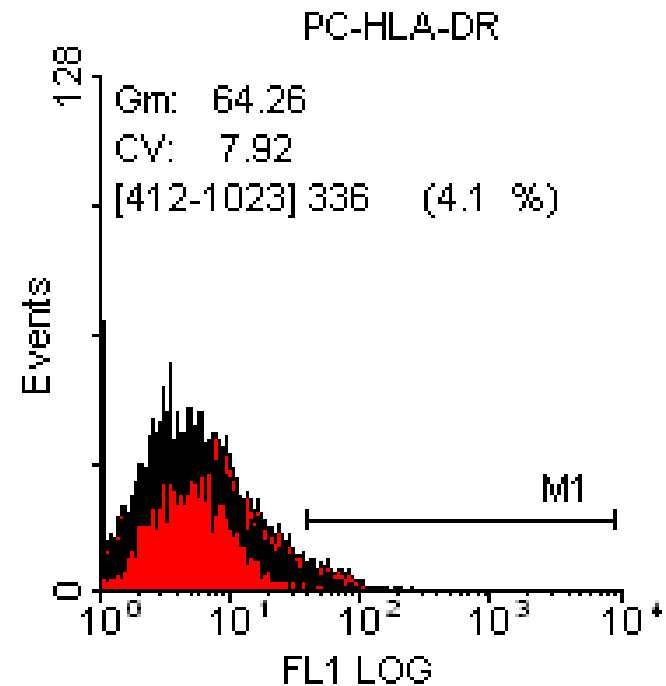
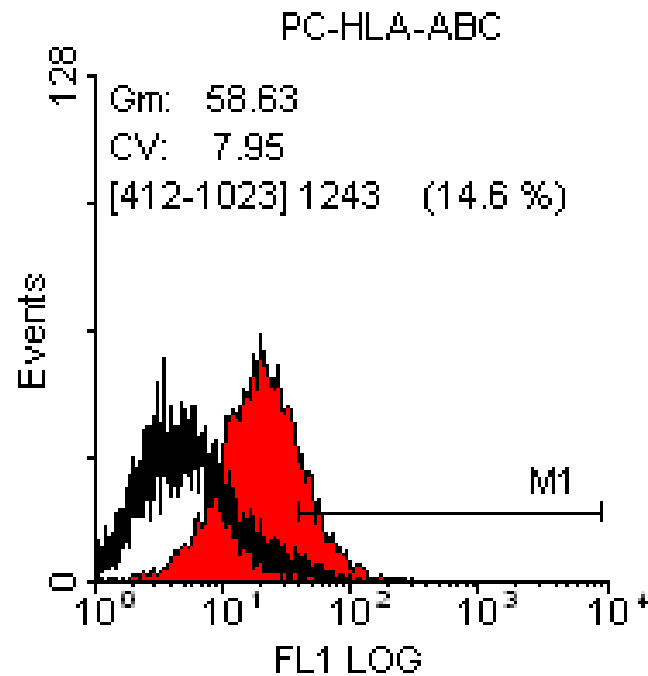
Хорион

Амнион

Хорион_микроскопия

HLA-ABC	+	low	low	low	low
CD13	+	+	+	+	+
CD29	+	+	+	+	+
CD31	+	+	+	+	+
CD44	+	+	+	+	+
CD49e	+				
CD54	+	+	+	+	+
CD73	+	+			
CD90	+				
CD105	+	+			
CD106	+		low	-	-
CD166	+	+			
HLA-DR	-	-	-	-	-
CD14	-	-			
CD31	-	-			
CD34	-	-	-	-	-
CD45	-	-	-	-	-
CD49d	-				
CD117	-	-			
CD133	-	-			

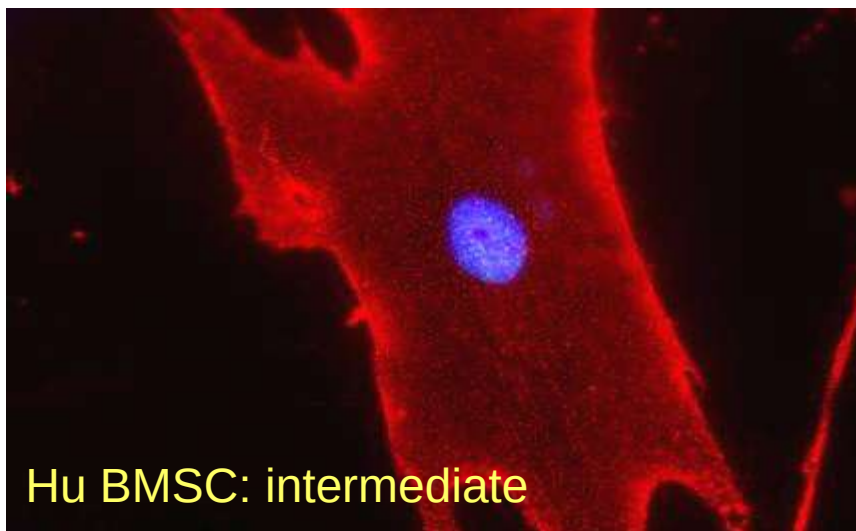
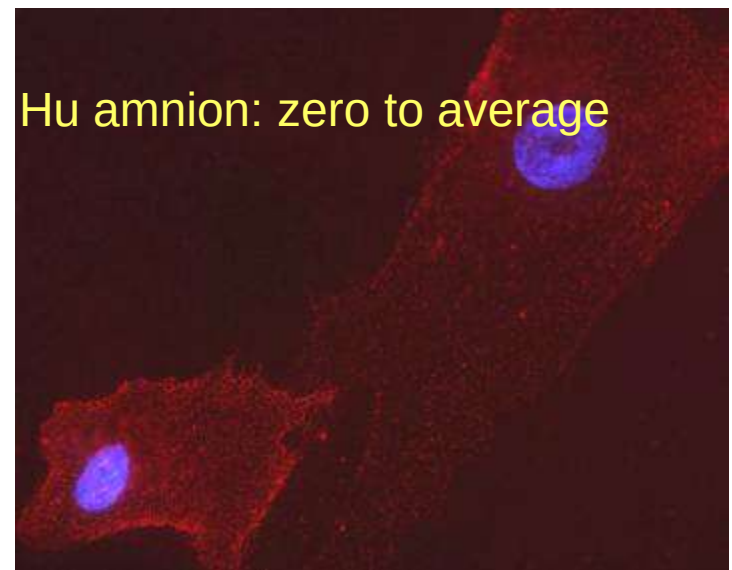
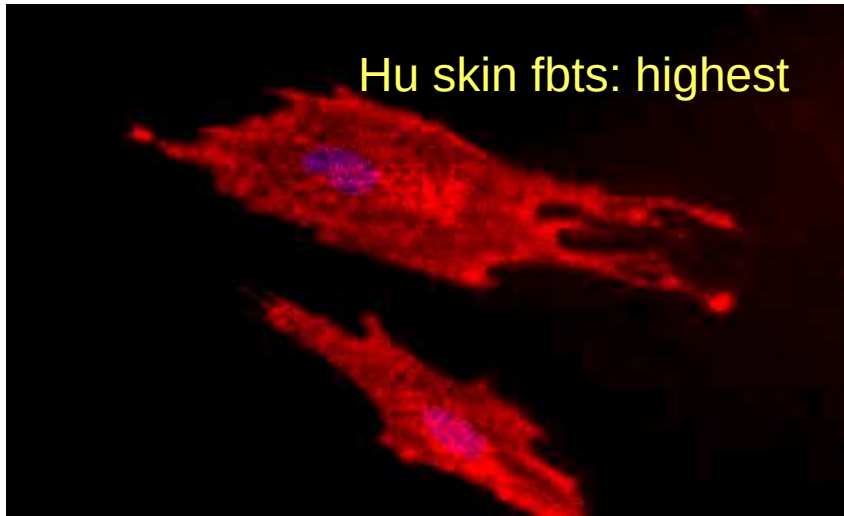
Проточная цитометрия МСК из амниона человека



Повышение экспрессии МНС первого класса с увеличением пассажей культуры МСК из амниона человека

Antigen Batch, passage	HLA-ABC	HLA-DR
PC2, MSC, 1p	15	< 4
PC2, MSC, 10p	87	< 3

Экспрессия МНС Class I в различных мезенхимальных клетках человека



Экспрессия эндотелиального маркера фактора Фон Виллебрандта

Hu skin fbts: no expression

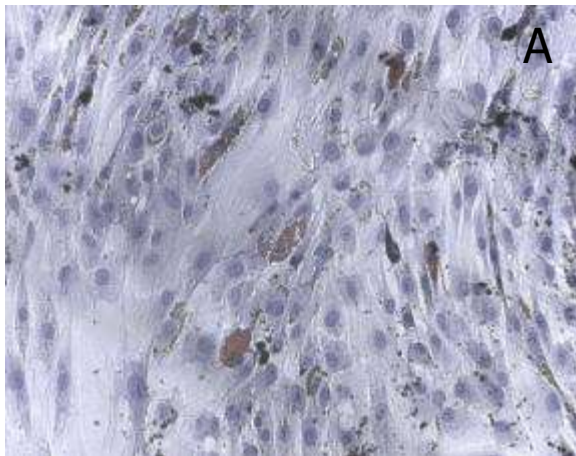
About 5% of cells

Hu BMSC: expression in about 20%
of cells

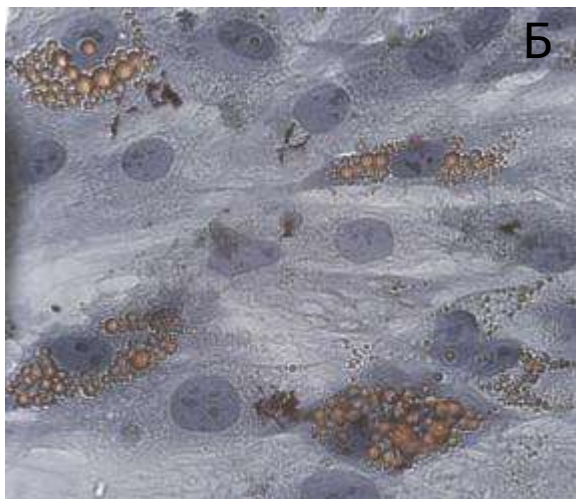
Hu umb cord: expression in 20% of
cells at 50% confluency and in
10% (5% very high expression) of
cells at >80% confluency

Дифференцировка в адипоциты

Окрашивание клеток красителем OilRed



Дифференцировочная среда:
DMEM-F12, 0,5 мкМ IBMX,
1 мкМ дексаметазона,
100 мкМ индометацина,
10 мкг/мл инсулина, 10% FBS



Условия адипогенной дифференцировки:
постановка при достижении клетками
100% конфлюентности,
смена среды проводилась каждые три дня.
Время дифференцировки: до 4 недель

Микрофотографии клеток после 4-х недель адипогенной дифференцировки. Жировые вакуоли окрашены OilRed, ядра клеток – гематоксилином.

А, Б – объектив 20X, 40X , соответственно

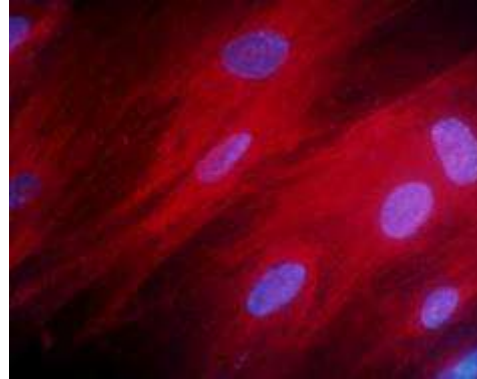
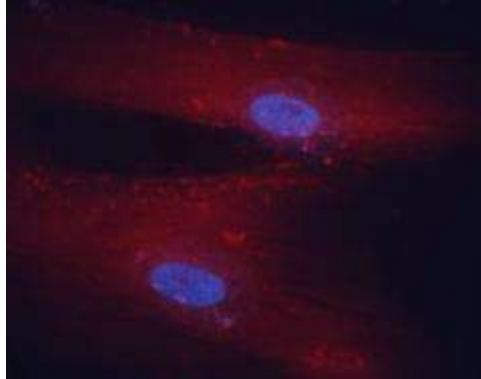
Остеогенная дифференцировка

Дифференцировочная среда:

DMEM-F12, 10% FBS, 10 мМ β -глицерофосфата,
0,1 мкМ дексаметазона, 0,5 мМ аскорбиновой кислоты,

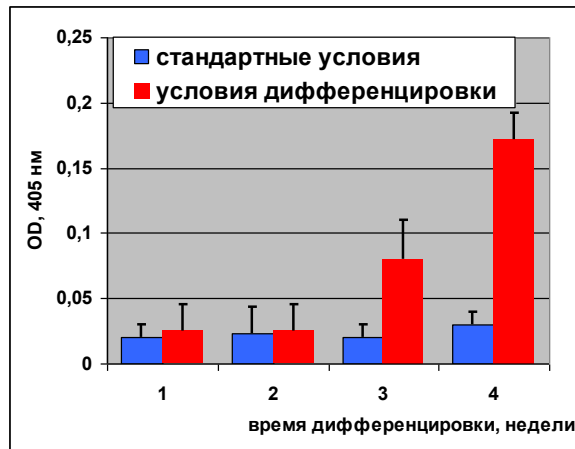
Усиление экспрессии остеонектина в дифференцировочных условиях

контроль	дифференцировка
----------	-----------------

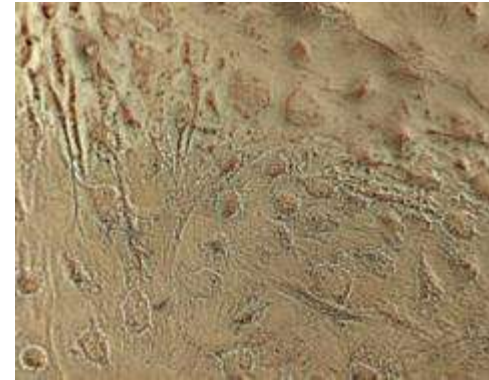


Окрашивание клеток антителами к остеонектину (красная флуоресценция), ядра окрашены DAPI (синяя флуоресценция)

Усиление активности щелочной фосфотазы в условиях остеогенной дифференцировки



Окрашивание по ВанКоссу

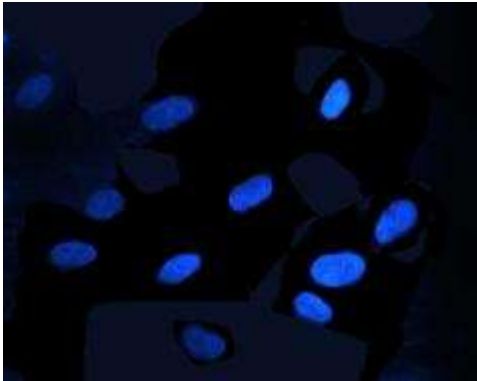


Микрофотографии клеток после остеогенной дифференцировки. Темно-коричневое окрашивание - связанные формы кальция

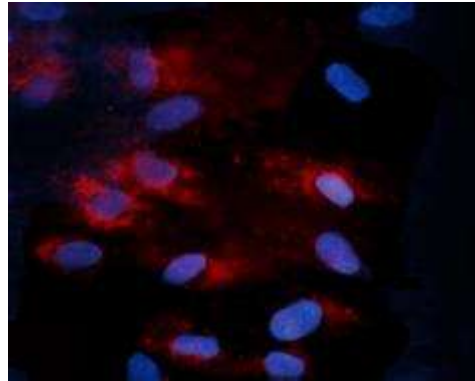
Условия остеогенной дифференцировки:
постановка при достижении клетками 80% конфлюентности,
смена среды проводилась каждые три дня.
Время дифференцировки: до 4 недель

Дифференцировка в гепатоциты

Контроль



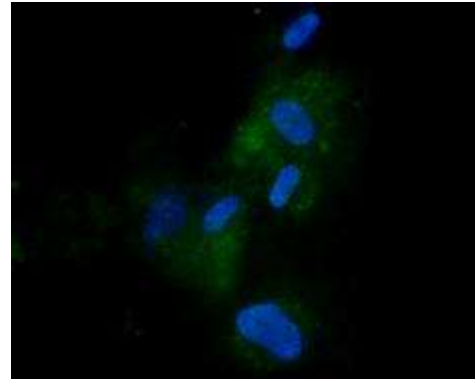
Дифференцировка



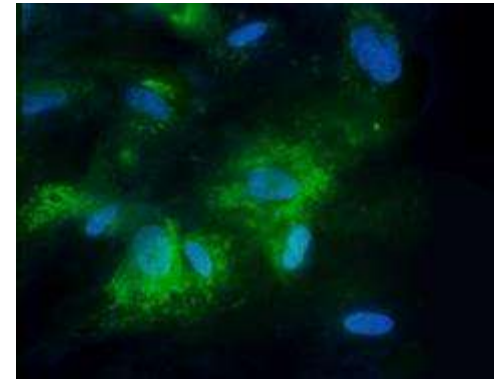
Дифференцировочная среда:
DMEM-F12, 10% FBS, 20 нг/мл HGF,
20 нг/мл OSM, 0,5 мкМ дексаметазона,
5 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл трансферина,

Окрашивание клеток антителами к альбумину
(красная флуоресценция), ядра окрашены DAPI
(синяя флуоресценция)

Контроль



Дифференцировка

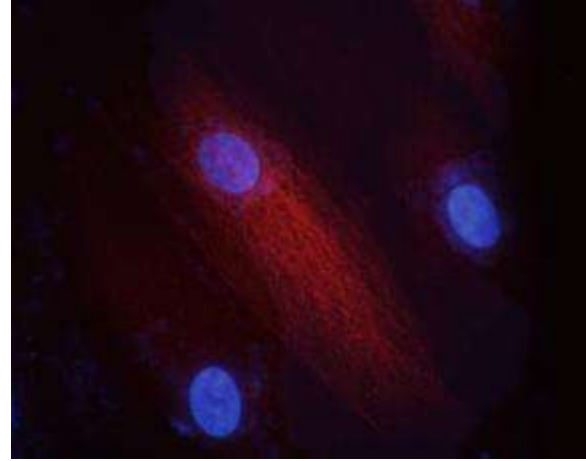


Окрашивание клеток антителами к α -фетопротеину
(зеленая флуоресценция), ядра окрашены DAPI
(синяя флуоресценция)

**Также была показана способность клеток амниона человека
дифференцироваться в направлении нервных клеток**

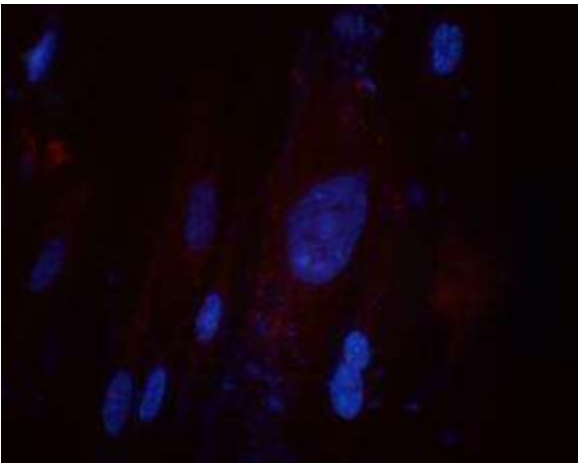
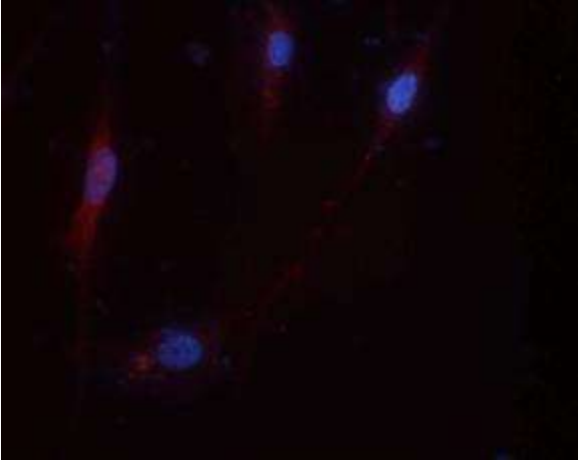
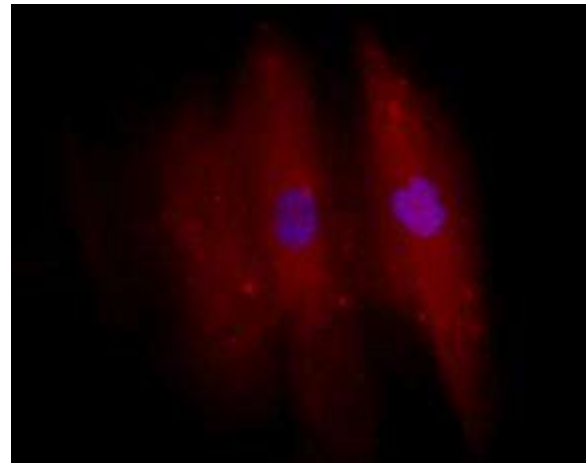
Нейрональная дифференцировка клеток амниона человека, индуцированная ростовыми факторами и гормонами

Экспрессия β III-тубулина



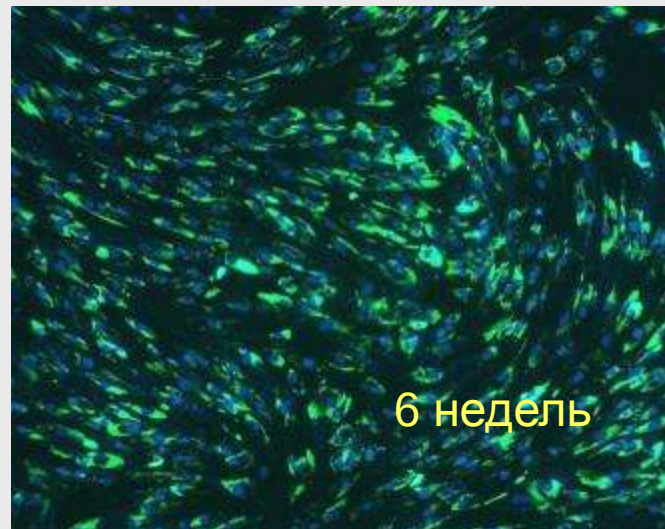
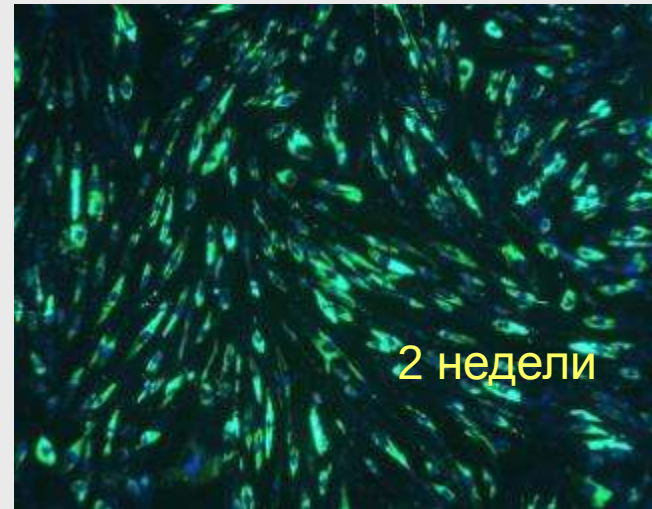
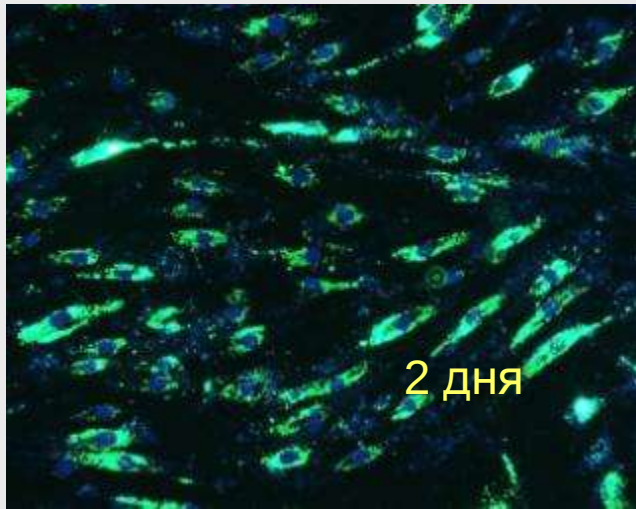
Клетки амниона через неделю после индукции дифференцировки.

Экспрессия GFAP

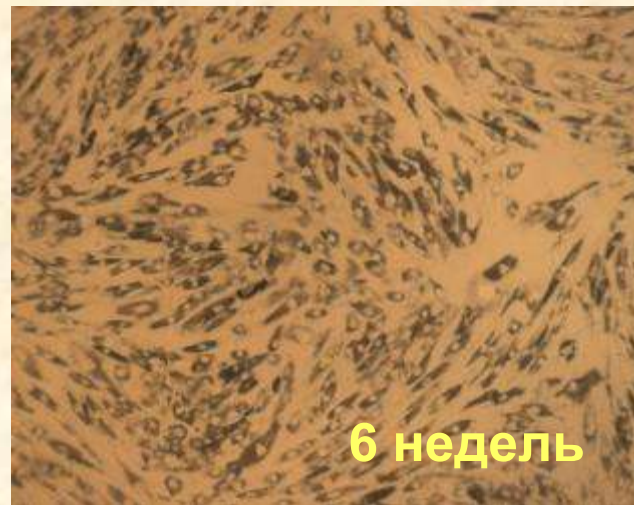
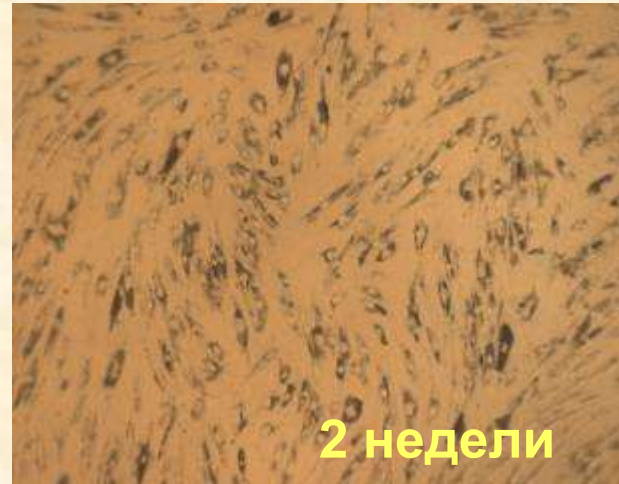
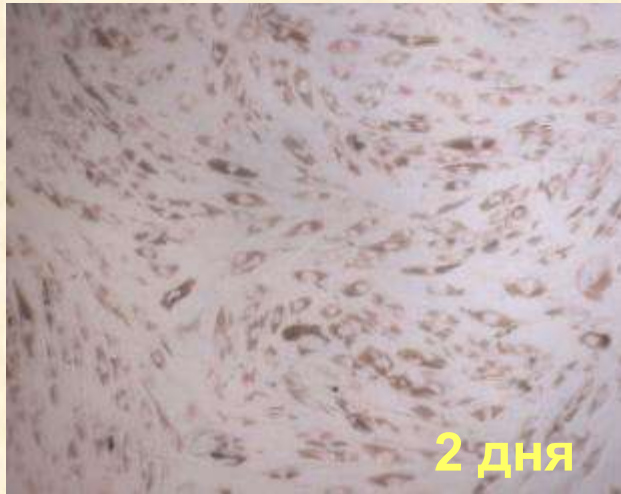


Контрольные клетки (культивирование в стандартных условиях).

Магнитное мечение культуры МСК плаценты человека частицами SF green

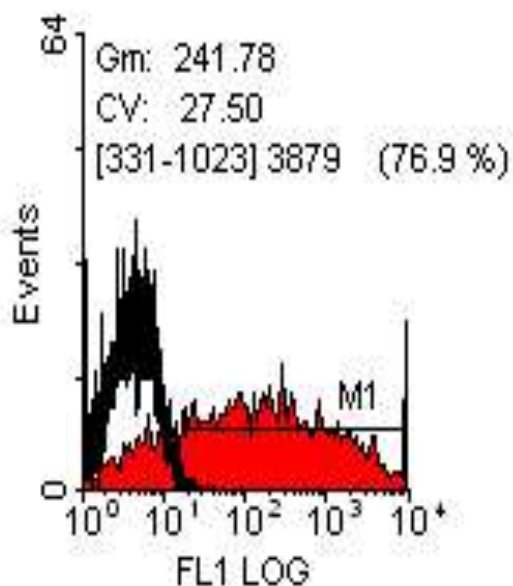


Магнитное мечение культуры МСК плаценты человека частицами SF light

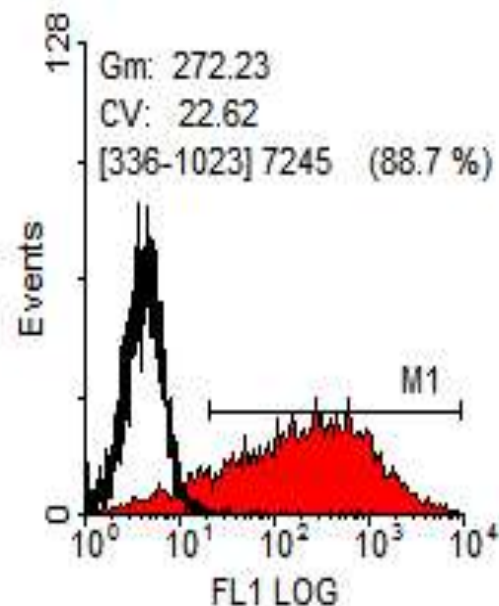


Мечение МСК микрочастицами.

А

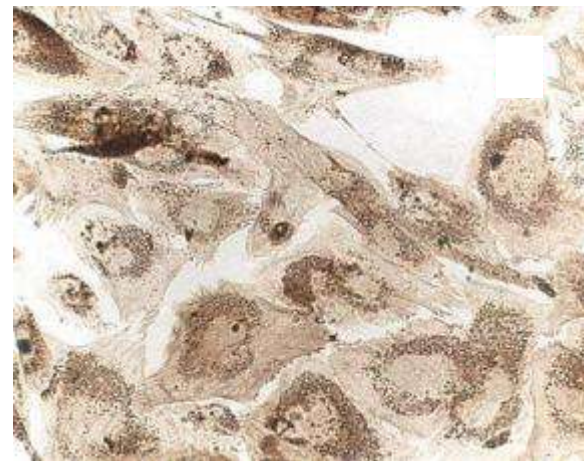
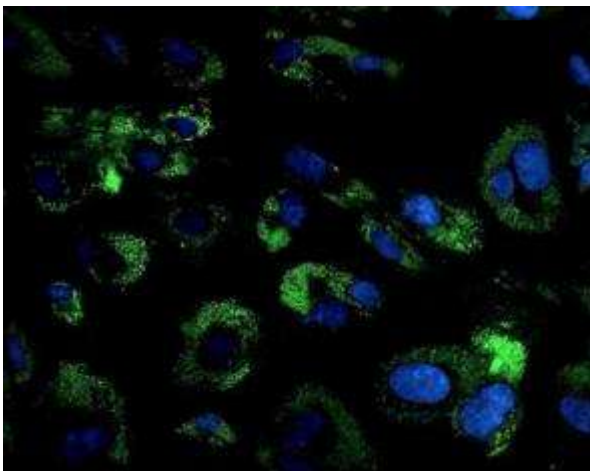
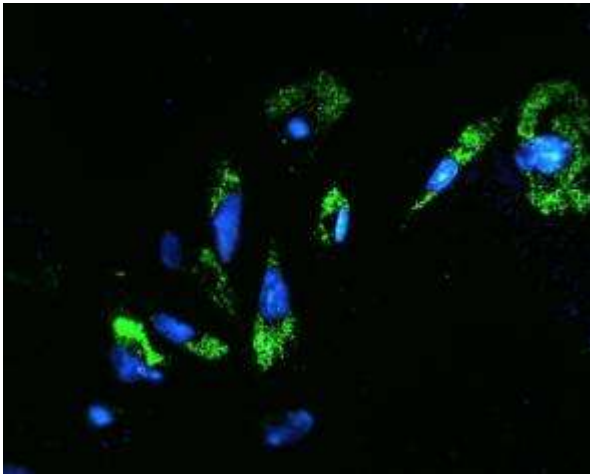


Б

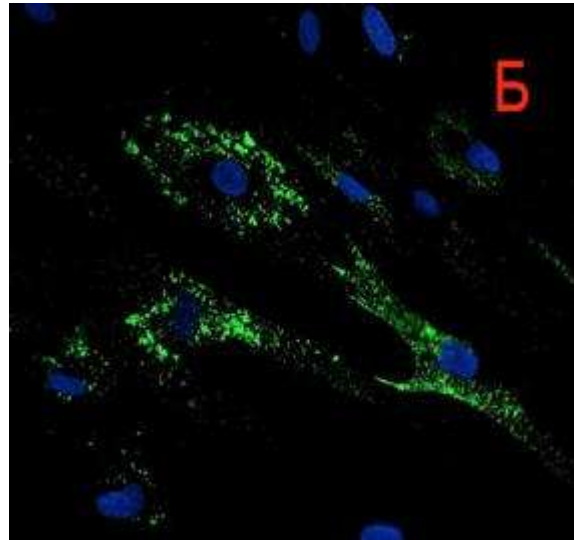


Цитофлуориметрический анализ эффективности загрузки МСК флуоресцентными (А) и магнитными (Б) микрочастицами.

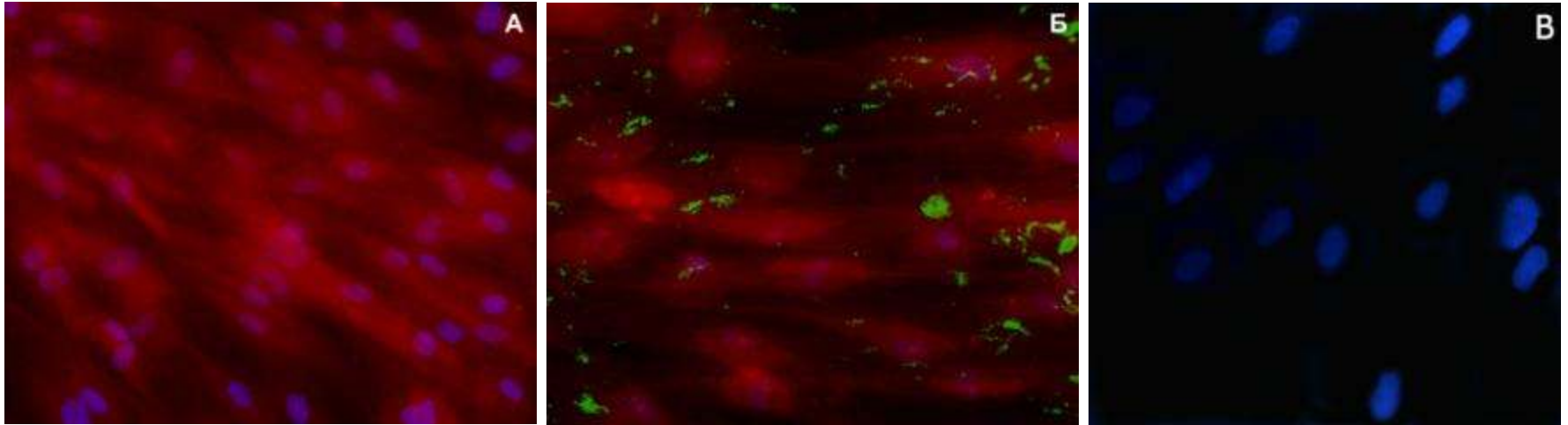
Экспрессия CD90 (верхние панели) и CD54 (нижние панели)
в клетках, содержащих микрочастицы магнитные частицы.
Слева представлены поля флуоресцентного микроскопа,
справа — светового.



Документированная экспрессией остеонектина остеогенная дифференцировка клеток, меченых магнитными микрочастицами FC03 (0.51мкм). А – окраска пероксидазой; Б – флуоресценция; В – контроль, клетки, не подвергшиеся воздействию дифференцировочной среды.

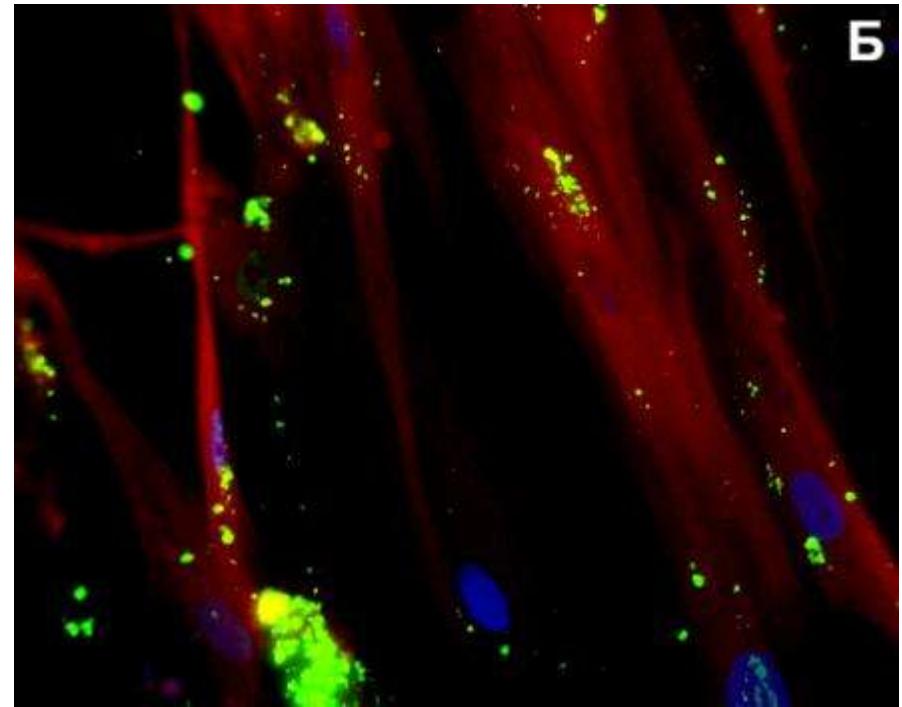
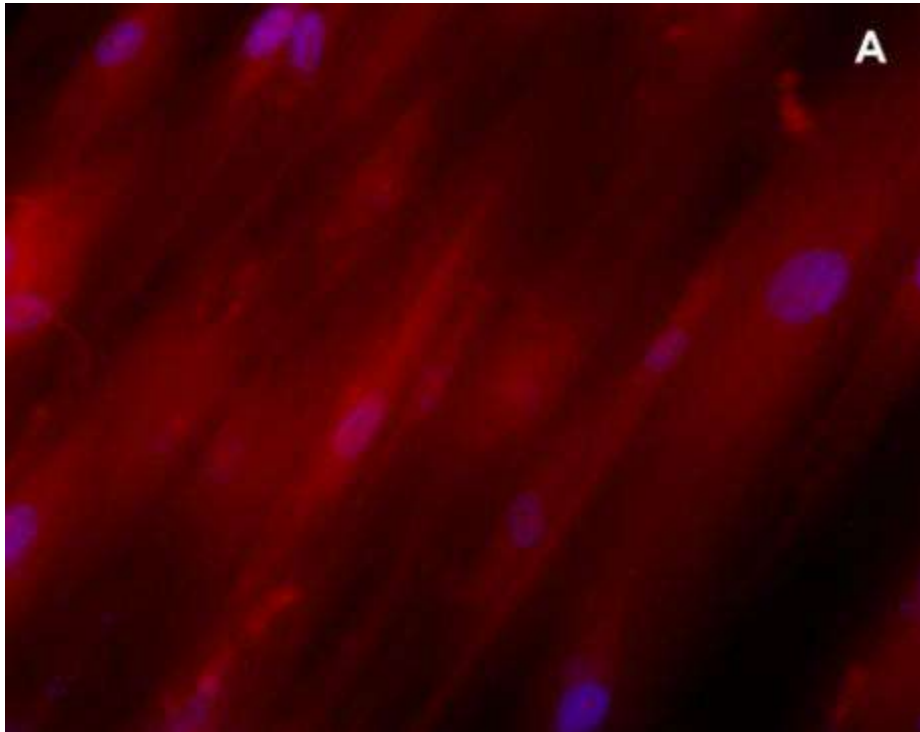


Экспрессия нейрон-специфичной энолазы (NSE) в МСК через 4 недели после индукции дифференцировки



А – дифференцировка МСК в отсутствие частиц, Б – дифференцировка МСК, загруженных частицами, В – контрольные клетки, не индуцированные к дифференцировке.

**Экспрессия глиального
фибрилярного кислого белка (GFAP)
в МСК через 4 недели после индукции
дифференцировки.**



А – дифференцировка незагруженных
МСК, Б – дифференцировка МСК,
загруженных магнитными
флюоресцирующими частицами.

Оборудование МРТ

BRUKER BioSpec 7.0 T (Германия).



Оценка неврологического статуса –
модифицированная шкала mNSS (*modified Neurological Severity Score, J.Chen с соавт., 2001*)

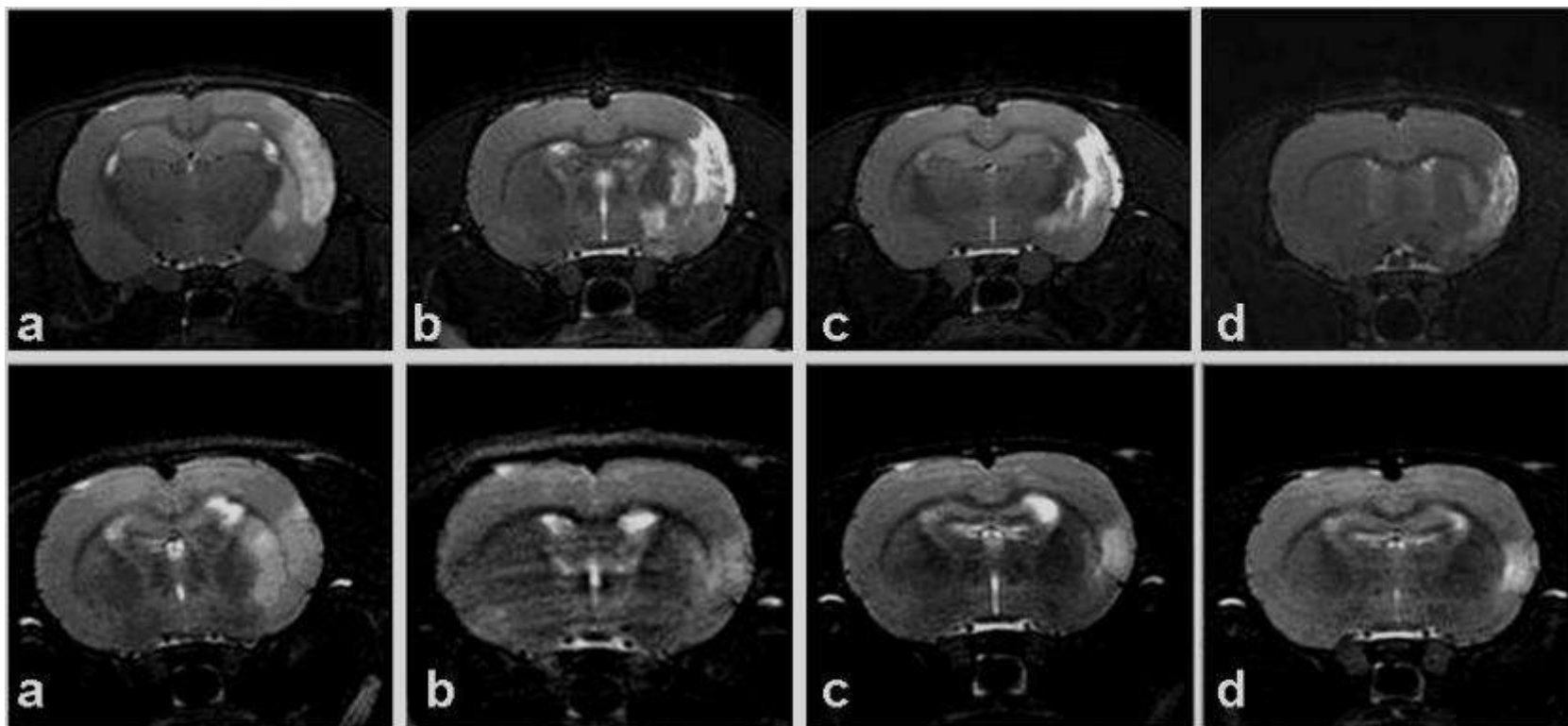
*Поведенческие тесты для оценки интегративной
деятельности мозга*

**Тест «Открытое
поле»**



**Тест «Крестообразный
лабиринт»**

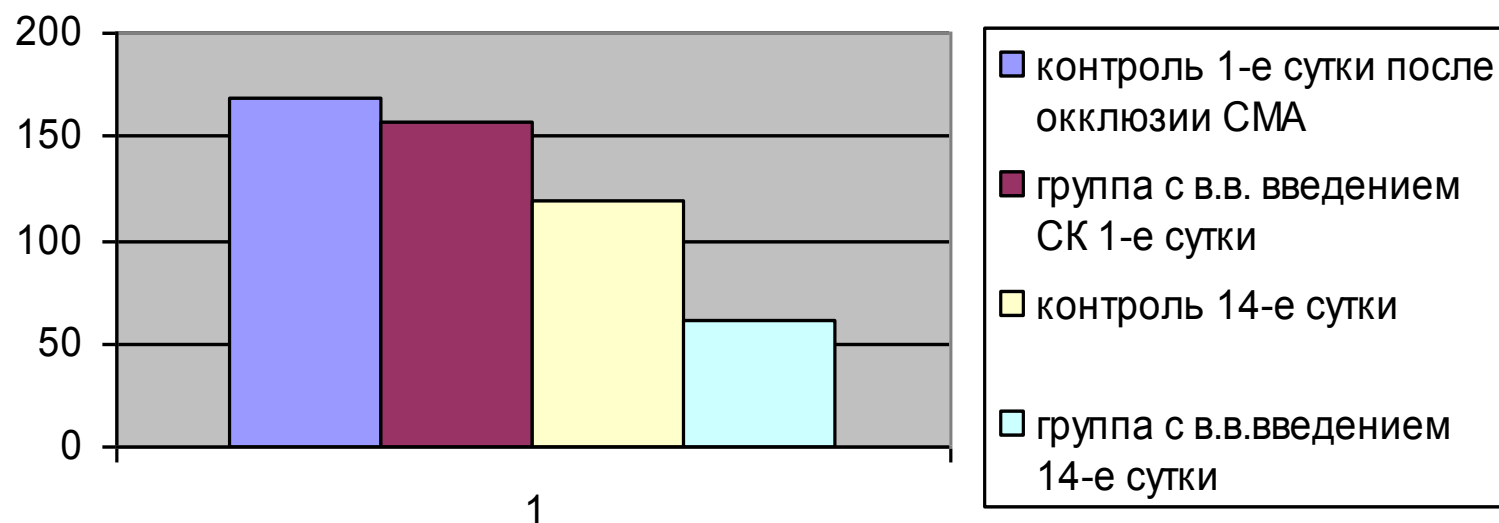




МР T2-взвешенные изображения зон ишемии в мозге 2 крыс после ОСМА. Верхние панели – ОСМА без трансплантации МСК. Нижние панели – ОСМА плюс трансплантация МСК. Изображения получены через 1 (а), 7 (в), 14 (с) и 30 (d) дней после операции

Динамика объема очага ишемического поражения мозга при введении стволовых клеток

динамика очага поражения по данным МРТ на 14-е сутки

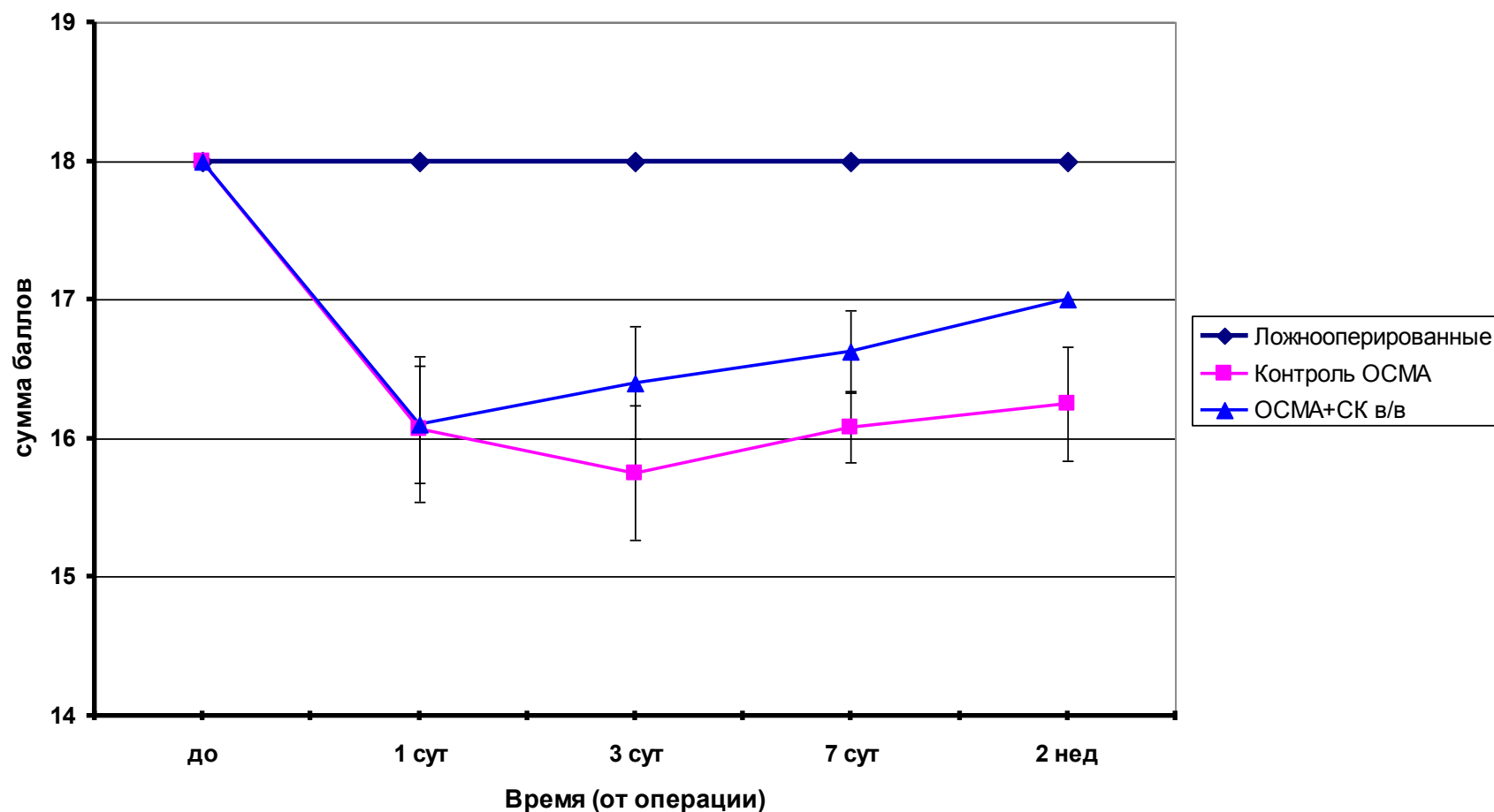


Трансплантация МСК приводит к более быстрому уменьшению объема зоны поражения после ОСМА

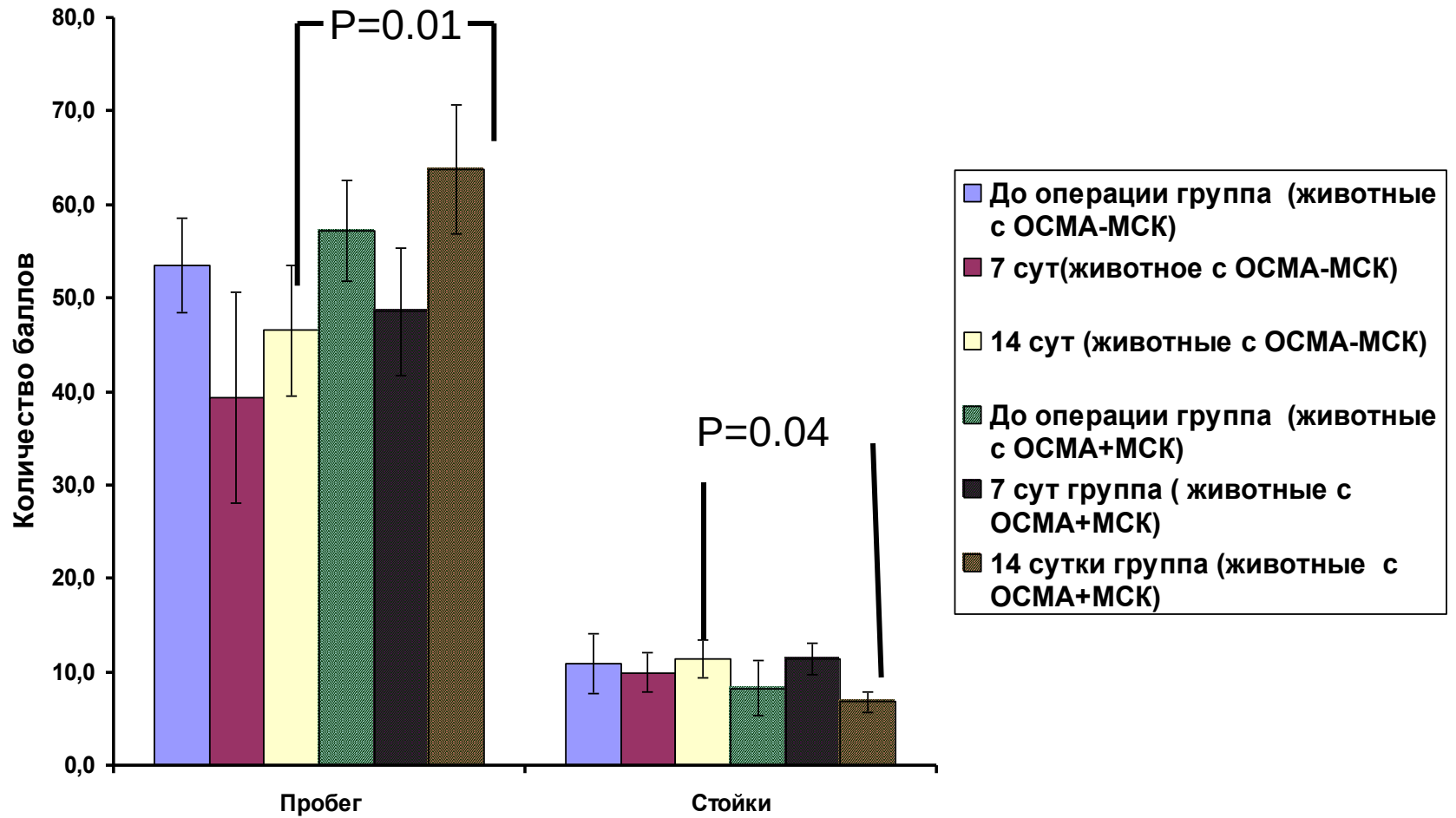
Группа	Режим MPT	Объем зоны ишемии (мм ³) спустя разные сроки после окклюзии средней мозговой артерии			
		1 день	7 дней	14 дней	30 дней
ОСМА	T2-WI (RARE)	190 _± 33	124 _± 19	75 _± 11*	64 _± 12*
ОСМА + МСК из плаценты человека	T2-WI (RARE)	172 _± 36	112 _± 24	38 _± 7*	23 _± 3*

Влияние в/в введения МСК на Neurological Severity Score крыс с ишемическим инсультом (окклюзия СМА)

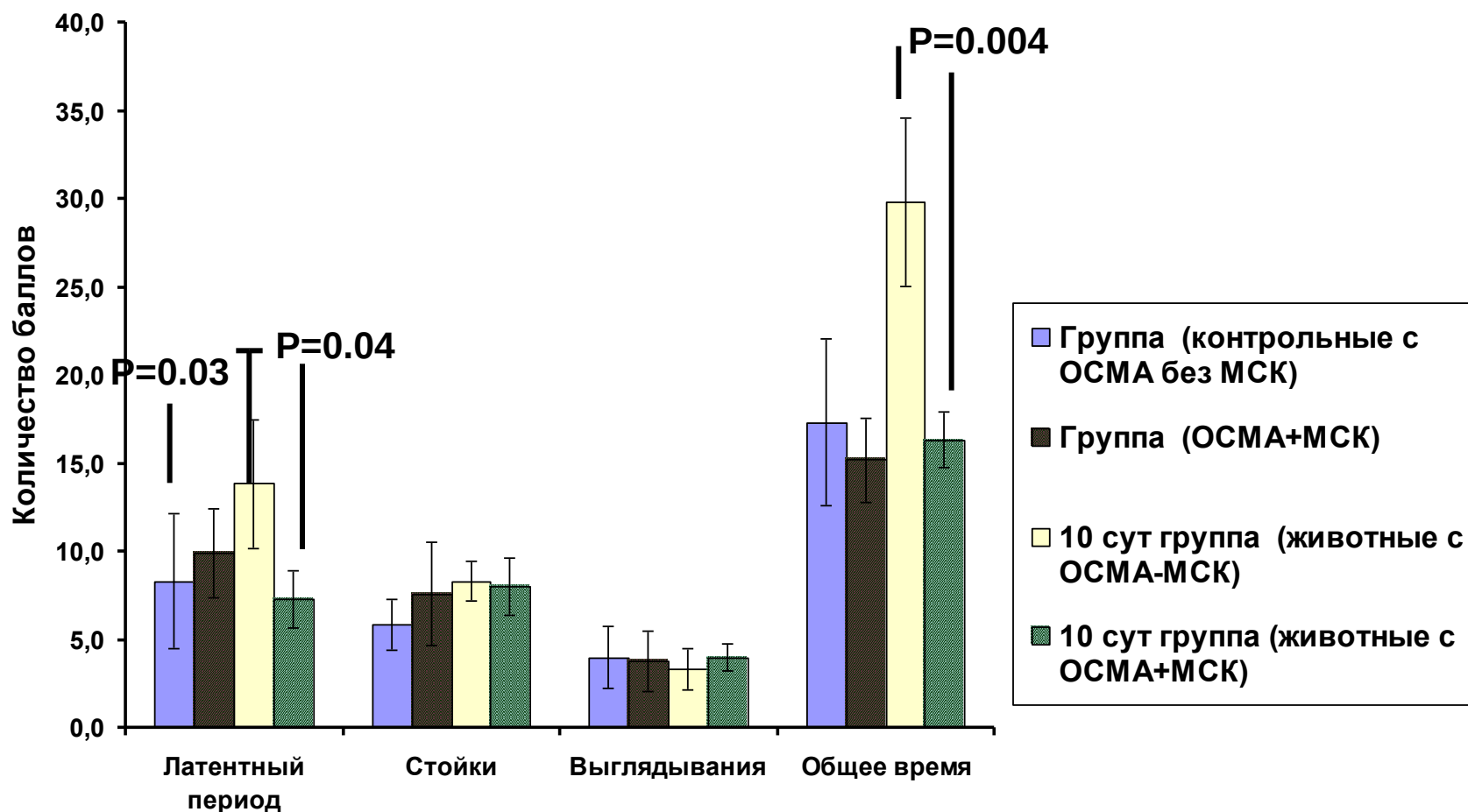
Неврологический статус



Тест "Открытое поле"

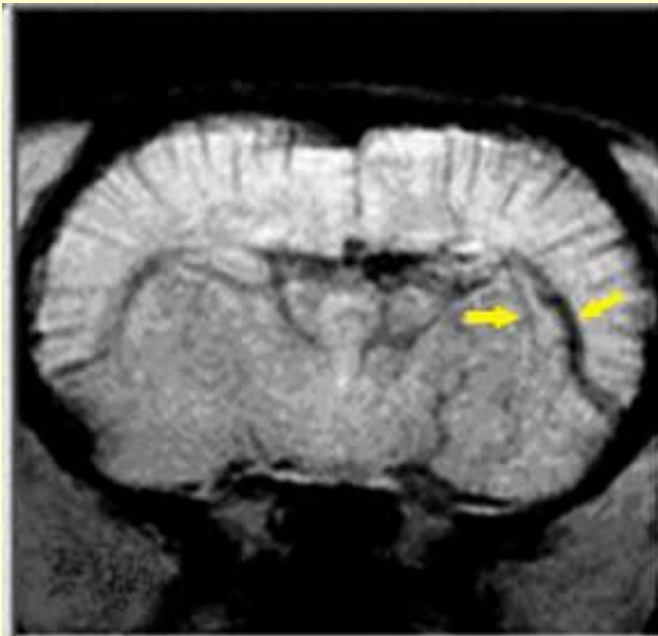


Тест "Крестообразный лабиринт"

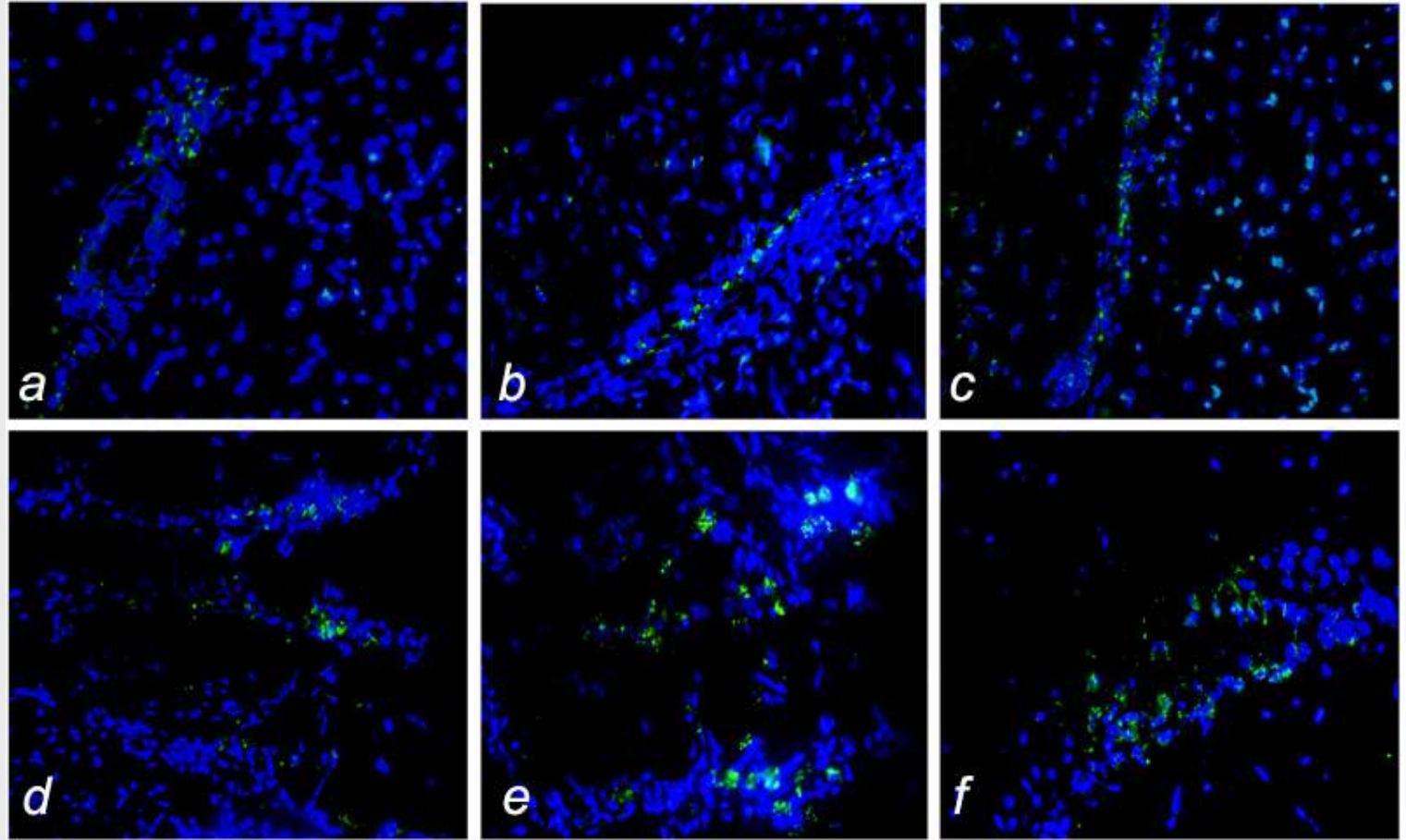


Меченые МСК клетки визуализируются in vivo вокруг зоны ишемии.

2 недели после операции



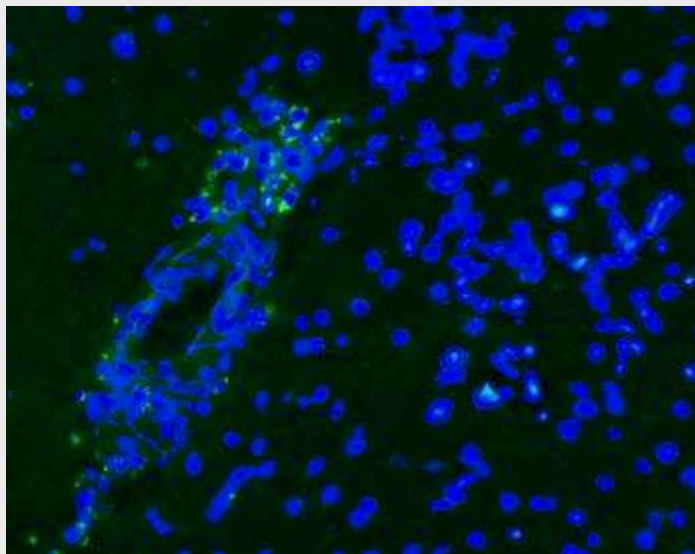
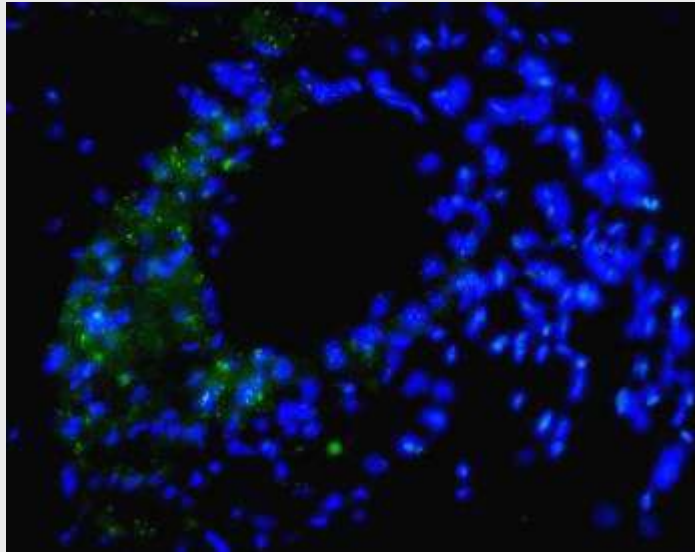
Tracks of MSC labeled with magnetic microparticles in the ischemic hemisphere (arrows). T2*-weighted images were obtained using a gradient echo pulse sequence (SNAP) with the following parameters: TR = 113 ms, TE = 13 ms, cross-sectional thickness 1 mm, field of view 4.0 x 4.0 cm, matrix size 256 x 256, resolution 0.156 x 0.156 mm/pixel.



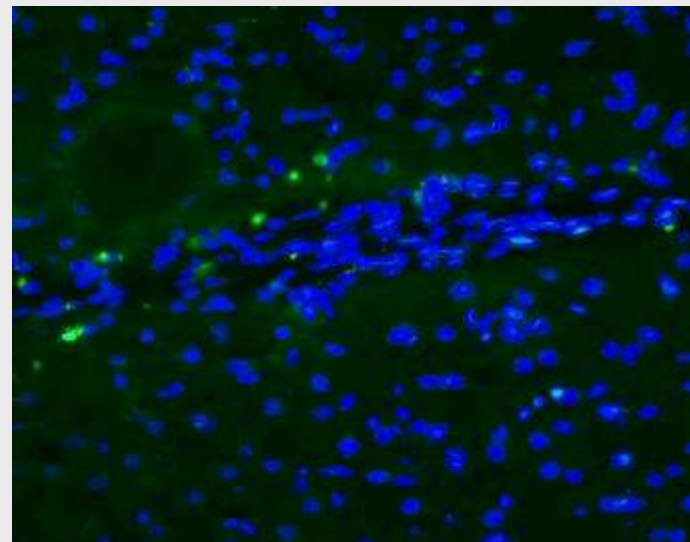
Накопление введенных внутривенно меченых МСК в ткани мозга крыс, перенесших операцию ОСМА. а – 7 дней после ОСМА, меченые МСК рядом с сосудом; «треки» из меченых МСК в ишемизированном (b) и контралатеральном полушарии (c), 2 недели после ОСМА; d, e - накопление трансплантированных клеток в зоне ишемии, 3 недели после ОСМА; f- накопление трансплантированных клеток в гиппокампе, 3 недели после ОСМА.

**Модель ОСМА. 7 дней после
внутривенного введения МСК,
меченых магнитными
частицами.**

**Часть метки сосредоточена вокруг
сосудов**

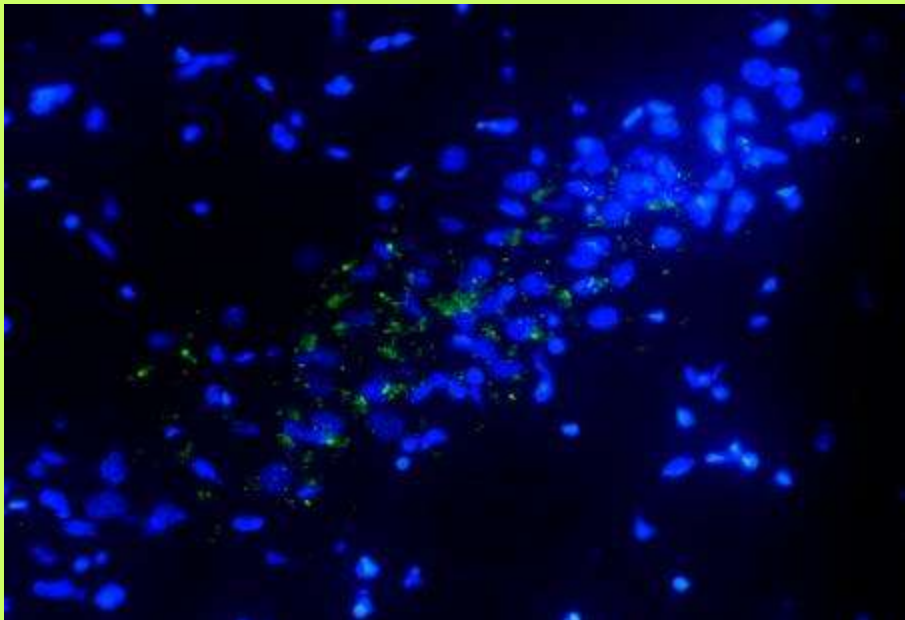
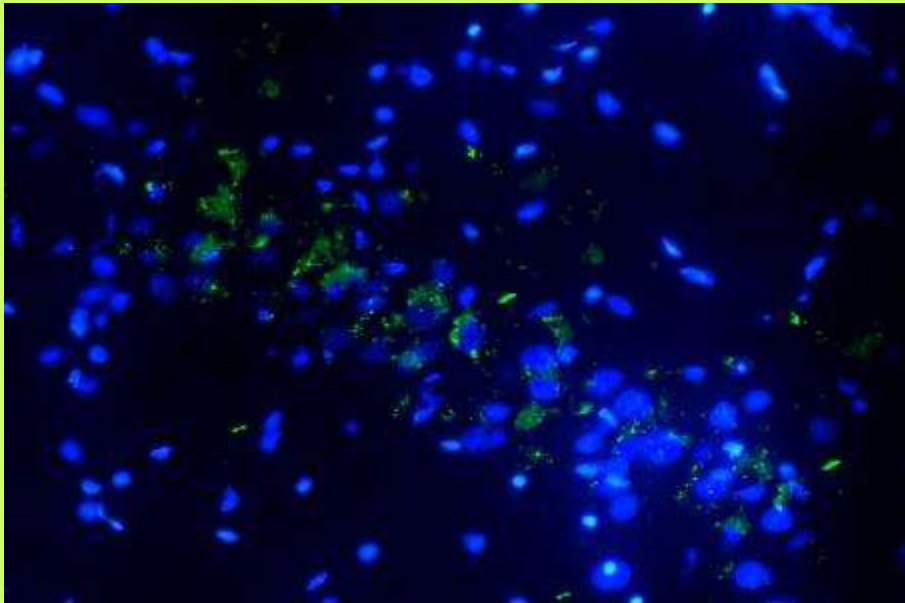


Ишемизированное полушарие

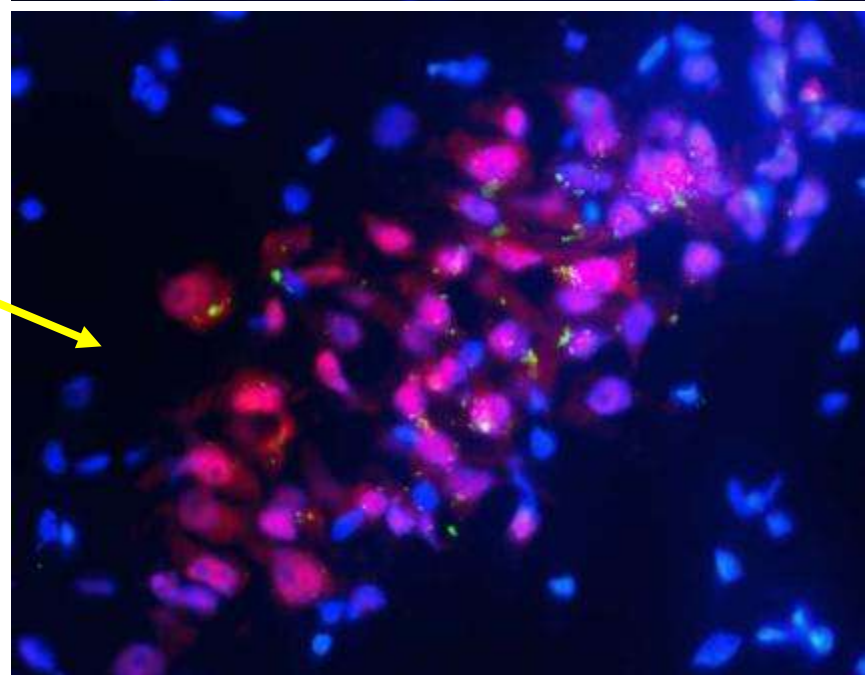
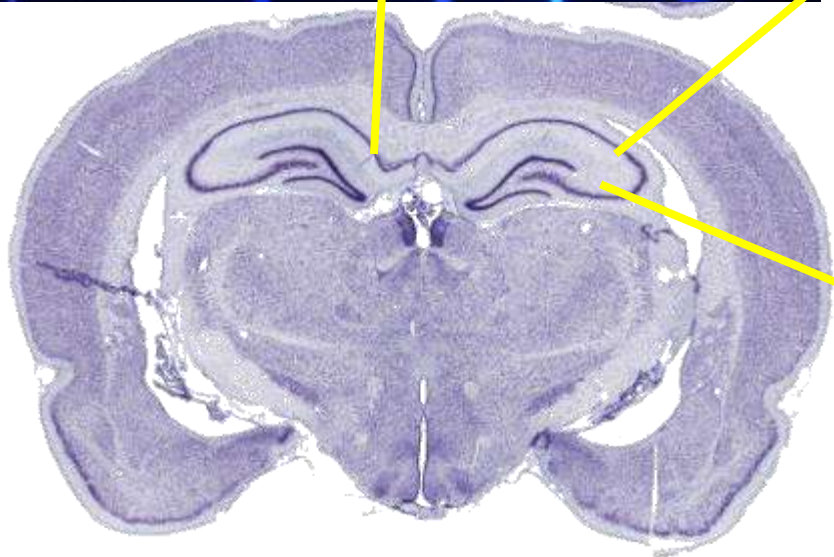
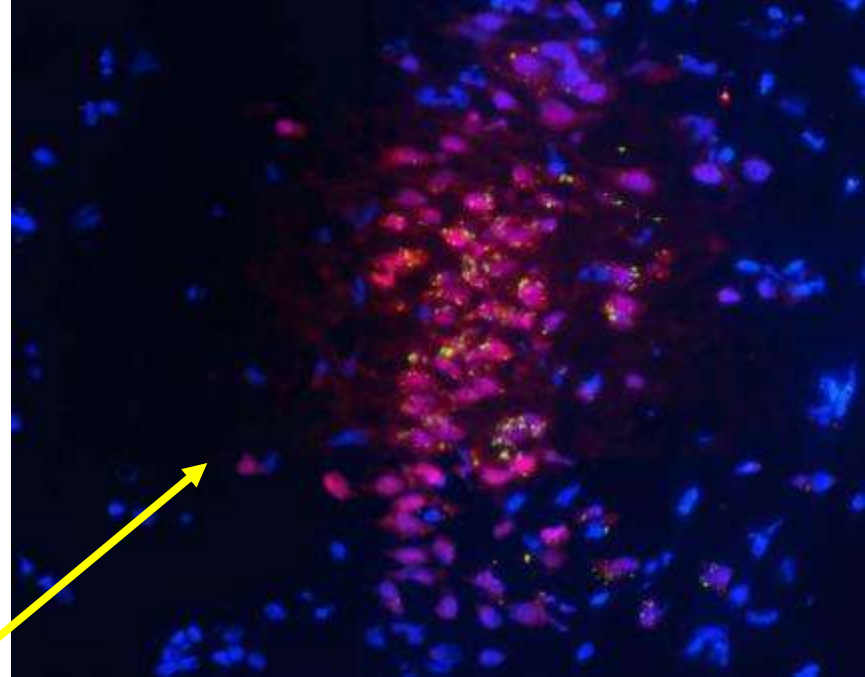
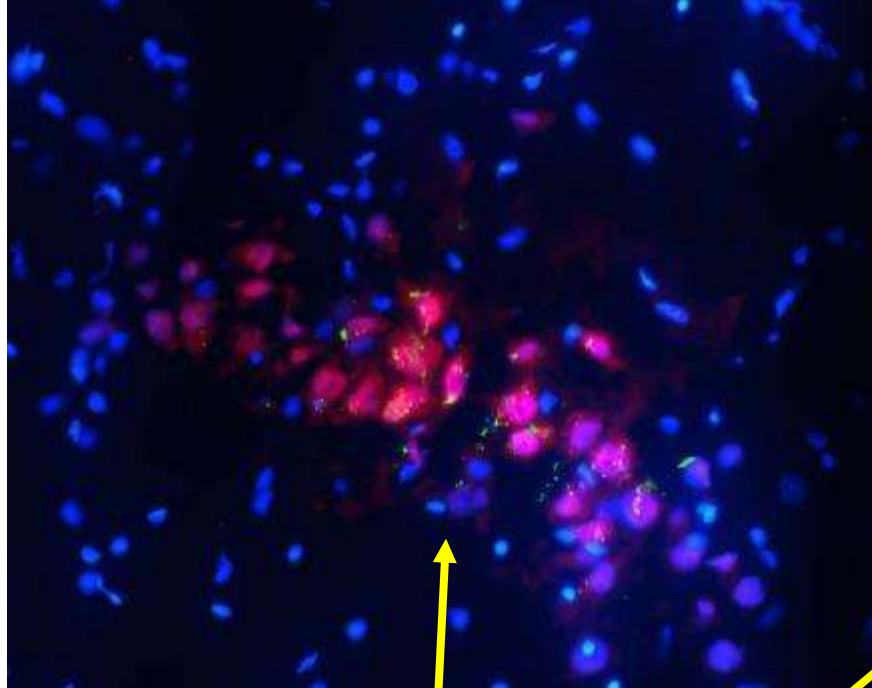


Контралатеральное полушарие

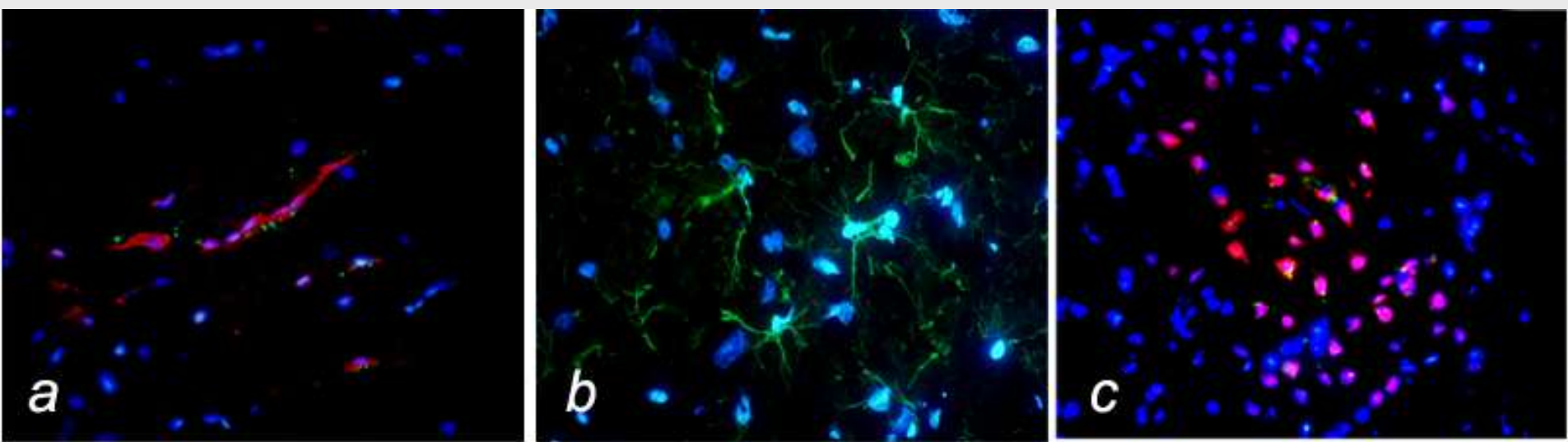
Эндоваскулярная модель
инсульта
внутривенное введение
меченых магнитными
микрочастицами МСК
14 суток



меченые клетки в
субвентрикулярном
пространстве

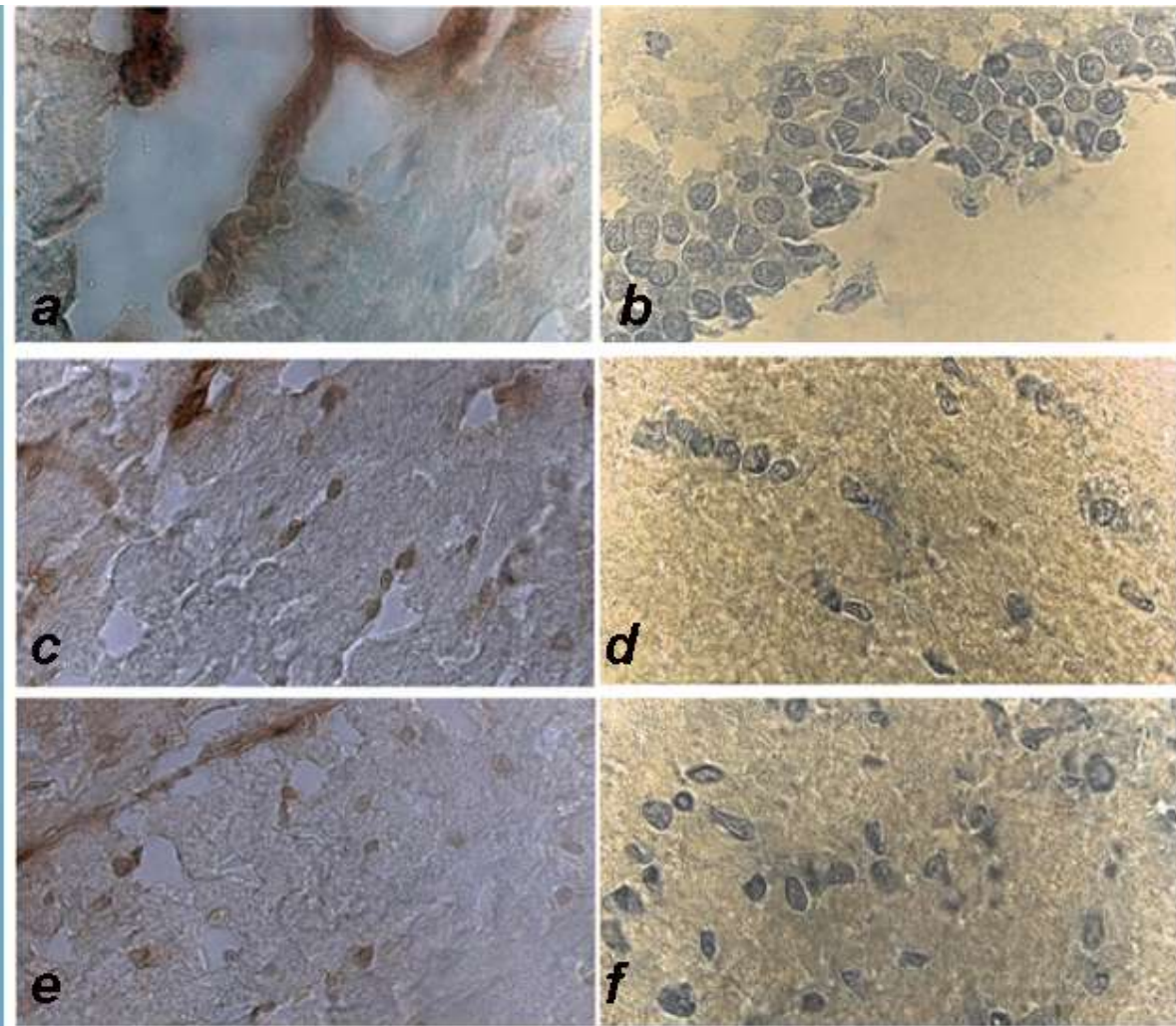


Накопление клеток в зоне гиппокампа



Переживание и дифференцировка трансплантированных МСК в зоне инфаркта мозга. Левая панель – экспрессия человеческого глиального фибриллярного кислого белка трансплантированными клетками через 45 дней после трансплантации. Средняя панель – окрашивание астроцитов того же локуса антителом против крысиного фибриллярного кислого белка. Правая панель – экспрессия NeuN в зоне ишемии, выявляемая антителом против человеческого NeuN. 64 дня после ОСМА.

Влияние трансплантированных МСК на пролиферацию, миграцию и хоуминг нейральных СК субвентрикулярной зоны пораженного полушария крысы, перенесшей ОСМА. Левые панели – крыса, которой не вводили клетки через 3 недели после операции. Правые панели – крыса, которой трансплантировали МСК через 3 недели после операции. Окраска антителами против маркера пролиферации Ki67.



Субвентрикулярная зона – а, b.

**Пространство между субвентрикулярной зоной и зоной инфаркта – с, d.
«Треки».**

Зона инфаркта – е, f.

Выводы

- Трансплантация МСК, выделенных из плаценты и пуповины человека крысам с экспериментальным ишемическим инсультом облегчала неврологическую симптоматику и нормализовала поведенческие реакции животных.
 - Эффекты МСК определенно не могут быть объяснены непосредственным замещением погибших нервных и глиальных клеток.
 - Благоприятное влияние трансплантированных МСК на неврологическую симптоматику и поведенческие реакции крыс с экспериментальным инсультом опосредованы их хоумингом в перивентрикулярном пространстве боковых желудочков и в зубчатой извилине гиппокампа и активацией находящихся там собственных стволовых и прогениторных клеток мозга и миграцией последних к очагу ишемии.