



DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-319-330

EDN: BKZHLL

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Влияние глиальных клеток-предшественников на восстановление сенсомоторного дефицита у крыс после травмы головного мозга

А.К. Судьина¹  , М.Э. Иванов² , А.М. Юрин² , А.В. Макаров³ , Т.Х. Фатхудинов⁴ ,
Д.В. Гольдштейн¹ , Д.И. Салихова⁴ 

¹Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова, г. Москва, Российская Федерация

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Российская Федерация

³Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова,
г. Москва, Российская Федерация

⁴НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», г. Москва,
Российская Федерация
 nastyasudina@gmail.com

Аннотация. *Актуальность.* Поиск новых методов эффективной терапии черепно-мозговой травмы является одной из важных задач современной биомедицины. Одним из многообещающих подходов лечения черепно-мозговой травмы является клеточная терапия. Целью работы является исследование терапевтического эффекта глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, на экспериментальной модели черепно-мозговой травмы. *Материалы и методы.* Моделирование черепно-мозговой травмы проводили на самцах половозрелых крыс линии Wistar. Терапевтической группе однократно вводили $750 \cdot 10^3$ кл/мл глиальных клеток-предшественников объемом 1 мл, группе контроля вводили 1 мл фосфатно-солевого буфера. Введение проводили внутриартериально через 24 часа после травмы. Для анализа терапевтической эффективности проводили МРТ-исследование на 14 сутки, а также тест «Постановка конечности на опору» на 1, 3, 7 и 14 сутки. Клетки глиальных клеток-предшественников окрашивали липофильным красителем РКН26 (Sigma, США), вводили 1 мл крысам с черепно-мозговой травмой ($750 \cdot 10^3$ клеток/мл), затем проводили гистологическое исследование на 1, 3 и 7 сутки после введения с целью оценки миграции и распространения клеток в тканях головного мозга животных. Измерения объема очага травмы и подсчет количества РКН26-окрашенных клеток проводили с использованием программы ImageJ (Wayne Rasband, Национальный институт психического здоровья, Бетесда, Мэриленд, США). Для статистической обработки использовали программу GraphPad Prism 8.2.0 (GraphPad Software, Inc., США). *Результаты и обсуждение.* Введение ГКП приводило к снижению объема очага. По сравнению с контрольной группой наблюдалось существенное уменьшение сенсомоторного дефицита на 3, 7 и 14 сутки после травмы. Внутриартериальное введение приводило к успешной доставке глиальных клеток-предшественников в ткани головного мозга. На 1 сутки после введения в коре головного мозга, гиппокампе и стриатуме выявлялись клетки. На 3 и 7 сутки после введения клетки не обнаруживались. *Выводы.* Внутриартериальное

© Судьина А.К., Иванов М.Э., Юрин А.М., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В., Салихова Д.И., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

введение глиальных клеток-предшественников приводит к эффективной миграции клеток в ткани головного мозга. Клеточная терапия глиальными клетками-предшественниками способствует процессам нейровосстановления после черепно-мозговой травмы. Данная терапия является многообещающим методом лечения черепно-мозговой травмы.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, клеточная терапия, глиальные клетки-предшественники, ИПСК

Информация о финансировании. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № КБК 075 0110 47 1 S7 24600 621) по теме “Разработка новых лекарственных средств для терапии неврологических заболеваний”.

Вклад авторов. Концепция и дизайн исследования — Д.И. Салихова, Т.Х. Фатхудинов, Д.В. Гольдштейн; эксперимент — А.К. Судьина, М.Э. Иванов, А.М. Юрин; подготовка текста статьи — А.К. Судьина; научное редактирование текста — Д.И. Салихова; анализ и дополнение текста статьи — А.В. Макаров. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с руководящими принципами хельсинкской декларации и директивой 2010/63/ЕС о защите животных, используемых в научных целях, Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года и были одобрены этическим комитетом Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына (Протокол № 38(14)).

Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию — неприменимо.

Поступила 07.02.2024. Принята 11.03.2024.

Для цитирования: Судьина А.К., Иванов М.Э., Юрин А.М., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В., Салихова Д.И. Влияние глиальных клеток-предшественников на восстановление сенсомоторного дефицита у крыс после травмы головного мозга // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 3. С. 319–330. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-319-330. EDN: BKZHLL.

Influence of glial progenitor cells on the restoration of sensorimotor deficits in rats after traumatic brain injury

Anastasiia K. Sudina¹  , Mikhail E. Ivanov² , Alexander M. Yurin² , Andrey V. Makarov³ , Timur Kh. Fatkhudinov⁴ , Dmitry V. Goldstein¹ , Diana I. Salikhova⁴ 

¹Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

⁴Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI «Petrovsky National Research Centre of Surgery», Moscow, Russian Federation

 nastyasudina@gmail.com

Abstract. Relevance. The search for new methods of effective therapy for traumatic brain injury is one of the important tasks of modern biomedicine. One promising approach for treating traumatic brain injury is cell therapy. The aim of the work is to study the therapeutic effect of glial progenitor cells derived from induced pluripotent stromal cells in an experimental

model of traumatic brain injury. *Materials and Methods*. Modeling of traumatic brain injury was carried out on mature male Wistar rats. The therapeutic group was administered a single dose of $750 \cdot 10^3$ cells/ml glial progenitor cells with a volume of 1 ml, and the control group — 1 ml of phosphate-buffered saline. Administration was carried out intra-arterially 24 hours after injury. To analyze the therapeutic effectiveness, an MRI study was performed on the 14th day, as well as a limb-placing test on the 1st, 3rd, 7th and 14th days. Histological examination was carried out on days 1, 3 and 7 after administration to assess the migration and distribution of stained cells (concentration $750 \cdot 10^3$ cells/ml) by lipophilic dye PKH26 (Sigma, USA) at the rat's brain tissues after traumatic brain injury. Measurements of injury volume and counts of PKH26-stained cells were performed using ImageJ software (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). The statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 8.2.0 program (GraphPad Software, Inc., USA). *Results and Discussion*. Administration of GPCs led to decreasing the damage volume. Significant decrease in sensorimotor deficit was observed on days 3, 7 and 14 after injury compared with the control group. Intra-arterial administration resulted in successful delivery of glial progenitor cells to brain tissue. Cells were detected in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum on day 1, and were not observed on days 3 and 7 after administration. *Conclusion*. Intra-arterial administration of GPCs leads to efficient migration of cells into brain tissue. Glial progenitor cells therapy promotes neurorecovery processes after traumatic brain injury. This therapy is a promising treatment for traumatic brain injury.

Keywords: traumatic brain injury, cell therapy, glial progenitor cells, iPSCs

Funding. The work was financial supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (project No. KBK 075 0110 47 1 S7 24600 621) on the topic “Development of new drugs for the treatment of neurological diseases”.

Author contributions. Concept and design of the study — Diana I. Salikhova, Timur Kh. Fatkhudinov, Dmitry V. Goldstein; experiment — Anastasiia K. Sudina, Mikhail E. Ivanov, Alexander M. Yurin; preparation of the article text — Anastasiia K. Sudina; scientific editing of the text — Diana I. Salikhova; analysis and addition of the article text — Andrey V. Makarov. All authors made a significant contribution to the development of the concept and manuscript writing, read and approved the final version before publication.

Conflicts of interest statement. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. All animal experiments were carried out in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki and Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes of the European Parliament and the Council of the European Union of 22 September 2010 and were approved by the ethics committee of the Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI «Petrovsky National Research Centre of Surgery» (Protocol No. 38(14)).

Acknowledgments — not applicable.

Consent for publication — not applicable.

Received 07.02.2024 Accepted 11.03.2024.

For citation: Sudina AK, Ivanov ME, Yurin AM, Makarov AV, Fatkhudinov TKh, Goldstein DV, Salikhova DI. Influence of glial progenitor cells on the restoration of sensorimotor deficits in rats after traumatic brain injury. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(3):319—330. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-319-330. EDN: BKZHLL.

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) — это заболевание, характеризующееся структурным или функциональным нарушением мозговой ткани, возникающим в результате механического воздействия, и приводящее к серьезным физическим, когнитивным и эмоциональным расстройствам. По разным оценкам

ежегодно во всем мире от случаев ЧМТ страдают от 27 до 69 миллионов человек [1–4]. Патофизиология ЧМТ является комплексным процессом, который включает в себя не только первичное механическое повреждение, но и широкий спектр вторичных патологических реакций. Первичная стадия ЧМТ характеризуется физическим повреждением головного мозга

и сопровождается некрозом нервной и сосудистой тканей. Вторичные патофизиологические процессы включают в себя отёк мозга, оксидативный стресс и растяжение аксонов, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и эксайтотоксической гибели нейронов [5, 6].

Помимо перечисленных процессов, в ЦНС после ЧМТ также происходит инициация воспалительных и иммунных реакций, что способствует нарушению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), усилению травмы и в дальнейшем может привести к когнитивным дисфункциям [7]. Несмотря на интенсивные исследования в данной области, эффективной терапии ЧМТ до сих пор не существует в силу сложности патомеханизма заболевания и его гетерогенности. Большинство терапий в настоящее время направлены на снижение вторичного травматизма. Трансплантация стволовых клеток различного типа является одним из перспективных методов терапии ЧМТ, направленных на регенерацию и восстановление поврежденных тканей. Трансплантированные клетки способны либо непосредственно интегрироваться в поврежденные ткани и замещать погибшие нейроны, либо восстанавливать пораженные участки ткани, продуцируя биологически активные молекулы: цитокины, ростовые факторы, нейротрофические факторы.

Глиальные клетки-предшественники (ГКП) формируются из нейральных стволовых клеток субвентрикулярной зоны желудочков и зубчатой извилины гиппокампа и широко распространяются по всей ЦНС, проникая как в серое, так и в белое вещество [8, 9]. Глиальные клетки выполняют множество важнейших функций в центральной нервной системе. Они обеспечивают механическую поддержку нейронов и снабжают их необходимыми веществами, включая глюкозу и другие метаболиты, участвуют в процессах регенерации и восстановления нервной ткани после травм, в формировании и реорганизации синапсов, влияя на процессы памяти и обучения. При этом астроциты, один из типов глиальных клеток, регулируют ионный состав внеклеточной среды, удаляют излишки ионов и нейротрансмиттеров, а также поддерживают гомеостаз мозга. Развитие технологии получения

индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) позволяет получить различные типы клеток, происходящих из трех зародышевых листов, на разных стадиях дифференцировки, в том числе глиальные клетки-предшественники, которые в дальнейшем можно использовать для клеточной терапии [10]. Хотя применение ГКП для терапии черепно-мозговых травм пока не изучено, есть литературные данные об их использовании при лечении инсульта белого вещества головного мозга с положительным эффектом [11, 12].

На сегодняшний день существует несколько способов доставки биомедицинских клеточных продуктов. Процедура интерцеребрального введения стволовых клеток обычно требует хирургического вмешательства, которое может быть связано с риском осложнений, таких как инфекции или повреждения тканей, хотя при данном способе введения трансплантат достигает мозга без преодоления гематоэнцефалического барьера, что позволяет стволовым клеткам воздействовать непосредственно на поврежденные участки мозга [13]. Внутривенное введение стволовых клеток является распространённым малоинвазивным способом доставки и не требует сложных манипуляций, но при этом этот способ малоэффективен при терапии неврологических заболеваний, так как стволовые клетки захватываются такими органами, как печень и селезенка, прежде чем они достигнут целевых тканей [14]. Внутриаартериальная инфузия стволовых клеток обеспечивает более целенаправленную доставку и может обойти значительный легочный эффект первого прохождения, наблюдаемый при внутривенной инфузии.

Данное исследование направлено на изучение терапевтического эффекта при внутриаартериальном введении ГКП, полученных из ИПСК, на модели черепно-мозговой травмы.

Материалы и методы

Клеточная культура

Глиальные клетки-предшественники были получены ранее путём поэтапной дифференцировки

индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека [15,16]. Кратко, для получения ИПСК использовали набор для репрограммирования CTS CytoTune-iPS 2.1 Sendai (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США), затем проводили дифференцировку в нейральные стволовые клетки (НСК) с последующим получением глиальной линии. В ходе дифференцировки в глиальные клетки-предшественники НСК приобрели веретенообразную морфологию с неровным контуром и крупными овальными ядрами, а также экспрессировали белки S100B и GFAP. ГКП культивировали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 1 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco, США), 1 мМ глутамина («ПанЭко», Россия), 1 % N-2 («ПанЭко», Россия), 50 ед/мл пеницилин-стрептомицин («ПанЭко», Россия), 20 нг/мл EGF (Peprotech, США), 20 нг/мл CNTF (Peprotech, США) при 37 °С, 5 % CO₂ во влажной атмосфере. В качестве подложки использовали матригель (Corning, США) [16].

Лабораторные животные

Эксперимент проводили на половозрелых самцах крыс линии Wistar весом 300–400 граммов (n = 14) для изучения терапевтической эффективности и (n = 6) для изучения распределения клеток. Животных содержали при соблюдении цикла освещения день-ночь при постоянно поддерживаемой температуре воздуха 24 °С. После моделирования ЧМТ животных держали отдельно в течение 2 недель.

Описание экспериментальной модели черепно-мозговой травмы

Все операции проводили под ингаляционным наркозом с использованием изофлюрана в концентрации 3 % на воздушной смеси на этапе введения и 1,5–2,5 % на этапе поддержания анестезии. Перед моделированием область операции предварительно обезболивали с помощью инфльтрационной анестезии лидокаином.

Для создания модели травмы применяли метод дозированного контузионного повреждения открытого мозга [17]. Животным выщипывали участок кожи

на голове и фиксировали голову в стереотаксической рамке. Затем выполняли срединный продольный разрез, и с помощью фрезы диаметром 5 мм в черепе просверливали отверстие над левым полушарием в области локализации сенсомоторной коры по координатам 2,5 мм латеральнее и 1,5 мм каудальнее брегмы. Устройство для нанесения травмы располагали над твердой мозговой оболочкой так, чтобы боёк находился на глубине 3 мм ниже костей черепа. В отверстие в черепе над твердой мозговой оболочкой помещали цилиндрический боёк. Для нанесения травмы на боёк сбрасывали груз массой 50 г с высоты 10 см. После раны дезинфицировали и ушивали простым узловым швом. Животное перемещали в теплую клетку с поддержанием температуры тела, регулируемым с помощью инфракрасной лампы и термостата.

Протокол экспериментального исследования

Через 24 часа после моделирования ЧМТ животных случайным образом разделяли на 2 группы: 1-я — крысы с ЧМТ (n = 7 для оценки терапевтической эффективности и 6 для изучения распределения клеток), которым вводили внутриаартериально (в/а) 1 мл фосфатно-солевого буфера, группа контроля (ЧМТ); 2-я — крысы с ЧМТ (n = 7 для оценки терапевтической эффективности и 6 для изучения распределения клеток), которым в/а вводили 1 мл ГКП с концентрацией $750 \cdot 10^3$ клеток/мл, терапевтическая группа (ЧМТ+ГКП). Клетки вводили в правую общую сонную артерию в течение 40 секунд, как описано ранее [18]. Срок наблюдения составил 2 недели. До операции, на 1, 3, 7 и 14 сутки после моделирования ЧМТ проводили оценку неврологического статуса (n = 7). Для оценки объема очага повреждения на 14 сутки животным проводили МРТ диагностику (n = 7).

Оценка терапевтической эффективности

Для оценки терапевтической эффективности использовали данные МРТ и неврологического статуса животных. На 14-е сутки проводили МРТ-исследование на аппарате BioSpec 70/30 (Bruker, Германия) с индукцией магнитного поля 7 Тл и градиентной

системой 105 мТл/м. Животных вводили в состояние наркоза с помощью изофлюрана, смешанного с воздухом в концентрации 3 %. Во время исследования поддерживали концентрацию 1,5–2,5 %. Затем животных помещали в устройство позиционирования, оснащённое системами стереотаксиса и терморегуляции. В ходе МРТ-исследования были получены T2-взвешенные изображения (T2ВИ) высокого разрешения для оценки объема повреждения. Объем очага травмы мозга был измерен с помощью программного пакета ImageJ (Wayne Rasband, Национальный институт психического здоровья, Бетесда, Мэриленд, США) по T2-взвешенным изображениям. Зону повреждения обводили вручную: учитывали гипointенсивные участки изображения, отражающие отсутствие ткани вследствие травмы и гиперинтенсивные участки изображения, отражающие некроз в области травмы. Объем зоны травмы рассчитывался по формуле:

$$V = (S1 + \dots + Sn) * (h + d),$$

где S1 — площадь первого среза, Sn — площадь среза n (мм²), h — толщина среза (мм), d — межсрезовый промежуток (мм). Для оценки сенсомоторного восстановления конечностей крыс (неврологического статуса) использовали тест «Постановка конечности на опору» с использованием оборудования «НПК Открытая Наука» (Россия) по методике [19]. Этот тест состоит из семи испытаний, направленных на определение уровня восстановления чувствительности и двигательной функции передних и задних конечностей в ответ на тактильные и проприоцептивные стимулы. Оценку качества выполнения теста проводили по трехбалльной шкале, где 2 означало полное выполнение испытания, 1 — выполнение с задержкой более 2 секунд и/или не полное выполнение, 0 — невыполнение теста. Баллы, полученные по результатам семи испытаний, суммируются.

Мечение ГКП флуоресцентным красителем

Для оценки миграции и распространения ГКП по тканям головного мозга клетки маркировали липофильным красителем PKH26 (Sigma, США). Вкратце, клеточную суспензию инкубировали в 1 мл реагента-разбавителя С. Далее смешивали с равным

объемом раствора для мечения (4 нМ PKH26) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Процесс окрашивания прекращали добавлением 2 мл фетальной бычьей сыворотки. Клетки дважды промывали раствором Хенкса («ПанЭко», Россия) и ресуспендировали в физиологическом растворе с фосфатным буфером («ПанЭко», Россия). Клеточную суспензию 750×10^3 клеток/мл вводили в/а животным и проводили гистологическое исследование на 1, 3 и 7 сутки.

Гистологическое исследование

Животных выводили из эксперимента на 1, 3 и 7 сутки после введения ГКП. После эвтаназии летальной дозой изофлюрана проводили декапитацию, мозг извлекали и фиксировали в 10 % формалине 24 часа. Затем извлеченный мозг инкубировали в 30 % растворе сахарозы в течение суток. Полученные образцы тканей заключали в среду PolyFreeze Tissue Freezing Medium (Sigma, США) и замораживали на -20 °С. Далее готовили криосрезы толщиной 4–5 мкм на криостате Leica CM1950 (Leica Microsystems, Германия). Подготовленные образцы инкубировали в фосфатно-солевом буфере с 0,5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США) и 1 % бычьим сывороточным альбумином («ПанЭко», Россия) в течение часа и проводили окрашивание первичными антителами против anti-Mitochondria Human (1:100, ab92824) (Abcam, UK) в течение ночи при $+4$ °С. После проводили отмывку первичных антител и проводили окрашивание вторичными антителами Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 555 (1:600, A-21422) (ThermoFisher, США) в течение 60 минут в темноте при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали раствором DAPI 1 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере. Изображения очага травмы, гиппокампа и стриатума получали с использованием люминесцентного инвертированного микроскопа Axio Observer.D1 с камерой AxioCam HRc (Carl Zeiss, Германия), объективами HC PL Apo VC $20 \times / 0,75$ и HC PL Apo 40x/1,10 W (Leica Microsystems, Германия). Количественную оценку клеток проводили с помощью программы ImageJ

(Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Среднюю плотность оценивали путем подсчета положительно окрашенных клеток, которые затем нормализовали на квадратный мм среза, количество изображений для каждой зоны головного мозга $n = 10$.

Статистический анализ

Статистический анализ данных проведен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.2.0 (GraphPad Software, Inc., США). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Сравнение данных МРТ проводили с помощью t-теста. Данные теста «Постановка конечности на опору» анализировали с помощью непараметрического

критерия Крускала-Уоллиса (ANOVA on ranks). Полученные данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение для МРТ и в виде медиан и квартилей для теста «Постановка конечности на опору». При $p < 0,05$ различия считали статистически достоверными.

Результаты и обсуждение

Оценка объема очага повреждения

ЧМТ приводила к обширным повреждениям мозга в области сенсомоторной коры (рис. 1). Для оценки объема повреждения проводили МРТ исследование на 14 сутки после моделирования. Клеточная терапия приводила к снижению объема повреждения в 1,5 раза (таблица 1).

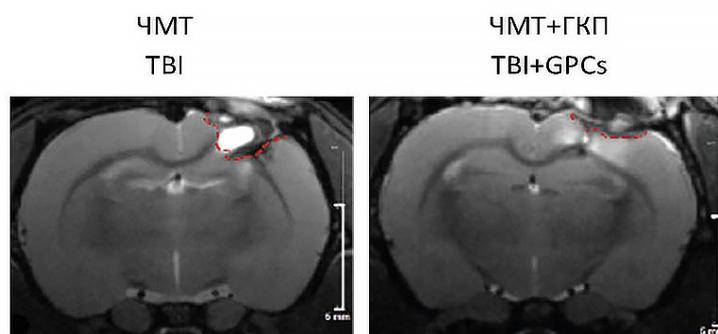


Рис. 1. Репрезентативные МРТ-изображения объема повреждения при моделировании ЧМТ на 14 сутки эксперимента

Примечание: Красной пунктирной линией обозначена зона повреждения. ЧМТ — группа контроля, ЧМТ+ГКП — терапевтическая группа. Масштабная линейка: 5 мм.

Fig. 1. Representative MRI images of the damage volume during modeling of TBI on the 14th day of the experiment. The red dotted line indicates the damaged area

Note: TBI is the control group, TBI+GPCs is the therapeutic group. Scale bar: 5 mm.

Таблица 1
Сравнение объема повреждений у контрольной и терапевтической группы

Параметры	Объем повреждения, (мм ³), 14 сутки
ЧМТ	54,9 \pm 15,8
ЧМТ+ГКП	36,6 \pm 7,6*

Примечание: Данные проанализированы с использованием t-теста и представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение (* — $p < 0,05$). ЧМТ — группа контроля, ЧМТ + ГКП — терапевтическая группа.

Table 1
Comparison of damage volume between control and treatment groups

Parameters	Damage volume, (mm ³), 14 day
TBI	54,9 \pm 15,8
TBI+GPCs	36,6 \pm 7,6*

Note: Data were analyzed using t-test and presented as mean \pm standard deviation (* — $p < 0.05$). TBI is the control group, TBI + GPCs is the therapeutic group.

Оценка неврологического статуса

ЧМТ вызывала сенсомоторный дефицит, выявляемый тестом «Постановка конечности на опору». Животные до моделирования травмы набирали в этом тесте 14 баллов, тогда как на 1 сутки у животных в обеих группах неврологический статус снижался и статистически значимо не отличался.

Однократное введение ГКП способствовало уменьшению выраженности сенсомоторного дефицита, начиная с 3 суток эксперимента, и продолжалось на протяжении всего исследуемого периода. На 3, 7 и 14 сутки баллы у животных с терапией были в 2 раза выше, чем в группе контроля (таблица 2).

Таблица 2

Влияние ГКП на неврологический статус животных

Сутки Группа	0 (до ЧМТ)	1 (после ЧМТ)	3 (после ЧМТ)	7 (после ЧМТ)	14 (после ЧМТ)
ЧМТ (баллы)	14,0 (Q25 = 13,0–Q75 = 14,0)	1,5 (Q25 = 1–Q75 = 2)	2,0 (Q25 = 1,75–Q75 = 3,25)	5,0 (Q25 = 2,75–Q75 = 9,25)	8,0 (Q25 = 3–Q75 = 8)
ЧМТ+ГПК (баллы)	13,0 (Q25 = 12–Q75 = 14)	2,0 (Q25 = 1–Q75 = 3)	7,0 (Q25 = 4,5–Q75=9)*	10,0 (Q25=8–Q75=13)*	10,0 (Q25=9–Q75=11)*

Примечание: Результаты теста «Постановка конечности на опору»: данные проанализированы с помощью непараметрического критерия Крускала-Уоллиса (ANOVA on ranks) и представлены в виде медиан и квартилей (* – $p < 0,05$). ЧМТ – группа контроля, ЧМТ+ГПК – терапевтическая группа.

Table 2

Effect of GPCs on the neurological status of animals

Day Group	0 (before TBI)	1 (after TBI)	3 (after TBI)	7 (after TBI)	14 (after TBI)
TBI (points)	14,0 (Q25 = 13,0–Q75 = 14,0)	1,5 (Q25 = 1–Q75 = 2)	2,0 (Q25 = 1,75–Q75 = 3,25)	5,0 (Q25 = 2,75–Q75 = 9,25)	8,0 (Q25 = 3–Q75 = 8)
TBI+GPCs (points)	13,0 (Q25 = 12–Q75 = 14)	2,0 (Q25 = 1–Q75 = 3)	7,0 (Q25 = 4,5–Q75 = 9)*	10,0 (Q25 = 8–Q75 = 13)*	10,0 (Q25 = 9–Q75 = 11)*

Note: Results of the limb placement test: the data were analyzed using the nonparametric Kruskal – Wallis test (ANOVA on ranks) and are presented as medians and quartiles; (* – $p < 0,05$). TBI is the control group, TBI+GPCs is the therapeutic group.

Миграция ГКП в тканях головного мозга

После инъекции в правую сонную общую артерию на 1 сутки на гистологических срезах тканей головного мозга были выявлены ГКП с помощью метки липофильным красителем РКН26 в сочетании с иммуногистохимическим окрашиванием антителами против митохондрий человека (рис. 2Б). Клетки распределялись в ипсилатеральном полушарии:

большинство клеток располагалось в моторной коре — непосредственно в области травмы, а также вокруг нее; гиппокампе и в стриатуме (рис. 2А). Наибольшее количество клеток было выявлено в области травмы — $363,5 \pm 42,82$ клетки/мм², в области гиппокампа — $163,3 \pm 50,8$ клеток/мм² и стриатума — $163,2 \pm 68,09$ клеток/мм². На 3 и 7 сутки ГКП в тканях головного мозга крыс ГКП не обнаружены.

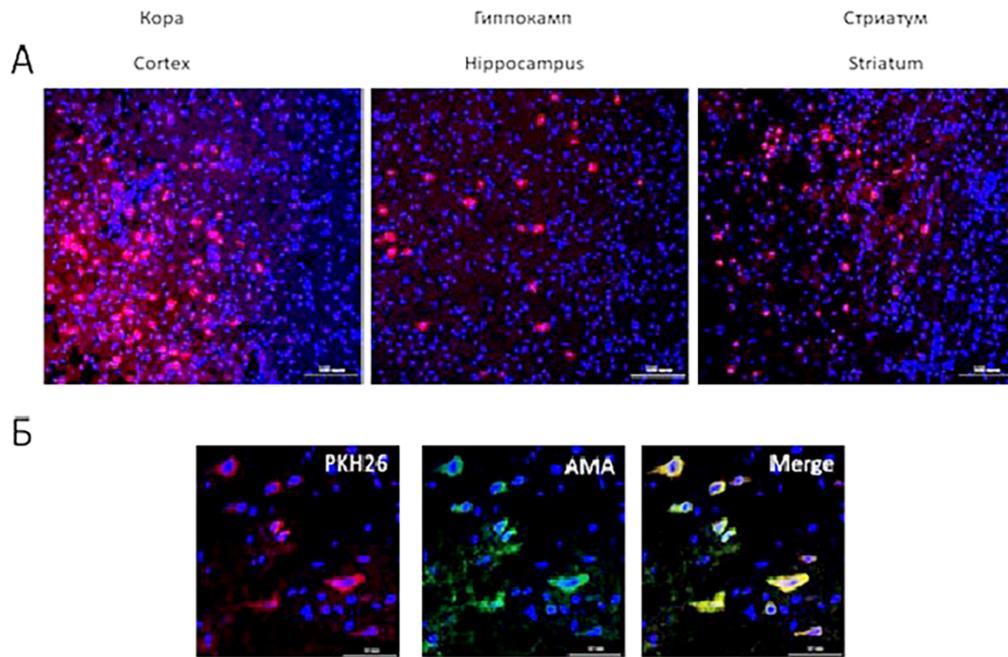


Рис. 2. Гистологическое исследование миграции ГКП в головном мозге

Примечание: А. ГКП выявляются в тканях головного мозга крысы на 1 сутки после внутриартериального введения в ипсилатеральном полушарии в зоне коры, гиппокампа и стриатума. ГКП окрашены PKH26 (красный) и ядра клеток (синий). Масштабная линейка: 100 мкм. Б. Трансплантированные клетки окрашены PKH26 (красный) и anti-Mitochondria Human (AMA) (зеленый). Масштабная линейка: 50 мкм.

Fig. 2. Histological study of GPCs migration in the brain

Note: A. GPCs are detected in rat brain tissue on day 1 after intra-arterial administration in the ipsilateral hemisphere in the zone of the cortex, hippocampus, and striatum. GPCs are stained with PKH26 (red) and cell nuclei (blue). Scale bar: 100 μ m. B. Transplanted cells were stained with PKH26 (red) and anti-Mitochondria Human (AMA) (green). Scale bar: 50 μ m.

Клеточная терапия ЧМТ представляет собой перспективный метод лечения, направленный на восстановление поврежденной нервной ткани и улучшение функциональных исходов у пациентов. ЧМТ характеризуется сложной патофизиологией, включающей первичные повреждения, связанные с непосредственным физическим воздействием на нервную ткань, и вторичные процессы, такие как воспаление и нейродегенерация, которые развиваются в течение длительного времени после травмы.

В то время как клеточная терапия в острой фазе ЧМТ затруднена из-за выраженных патологических изменений в нервной ткани, отсроченное введение стволовых/прогениторных клеток (через 24 часа и более после травмы) кажется более подходящим способом терапии ввиду приближенности

к клинической практике. В этот период основные некротические процессы уже завершены, и клетки могут оказать терапевтический эффект на восстановительные процессы. В данной работе было проведено внутриартериальное введение ГКП, полученных из ИПСК, через 24 часа после моделирования ЧМТ. Исследование показало, что введение ГКП улучшало неврологический статус животных после ЧМТ. При этом данная терапия статистически достоверно снижала объем повреждения сенсомоторной коры.

Очевидно, что данный эффект обусловлен быстрой и эффективной доставкой ГКП в ткань поврежденного полушария и их накоплением в зоне травмы, что было показано при гистологическом исследовании через сутки после в/а введения. При этом известно, что глиальные клетки способны се-

кретировать широкий спектр биологически активных веществ, обладающих нейропротективными свойствами. В проведенных ранее исследованиях было показано, что ГКП, полученные из ИПСК, секретируют белки, регулирующие апоптоз (белок теплового шока 70 кДа 4 (HSPA4), гремлин (GREM1)), обладающие противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами (антитромбин III, галектин-1 (LGALS1)), повышающие выживаемость нейронов в условиях окислительного стресса (пероксиредоксин-1 (PRDX1)), а также нейротрофины (нейротрофический фактор мозга (BDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), фактор роста нервов (NGF)) [16, 20]. Скорее всего положительные эффекты ГКП связаны с паракринным действием этих соединений, так как на 3 сутки эксперимента происходила полная элиминация трансплантированных клеток без интеграции в ткани реципиента. Возможно, еще одним механизмом терапевтического действия может быть юстакринное взаимодействие ГКП с клетками головного мозга [21, 22].

Одним из наиболее изученных типов клеточной терапии для ЧМТ является использование мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК). Они также способны секретировать широкий спектр биологически активных веществ, обладающих иммуномодулирующими и нейротрофическими свойствами. Исследования на животных моделях показали, что внутривенное или в/а введение ММСК через 24 часа после ЧМТ способствует улучшению неврологических функций и уменьшению воспалительных процессов [23–25]. Причем метод в/а обеспечивал более эффективную доставку клеток в поврежденную область мозга и способствовал более выраженному терапевтическому эффекту [26, 27]. При этом не все исследования показывали выраженное уменьшение объема очага повреждения [25]. В некоторых клинических испытаниях на людях также применяются ММСК для лечения ЧМТ. Например, введение ММСК пациентам с тяжелыми травмами мозга показывает потенциальные улучшения в неврологическом статусе и когнитивных функциях [28, 29]. Еще одним

типом клеток, используемым для терапии ЧМТ, являются нейральные стволовые клетки (НСК). В отличие от МСК, они могут дифференцироваться в нейроны, астроциты и олигодендроциты, что делает этот тип клеток более подходящим для терапии неврологических заболеваний. Введение НСК животным с ЧМТ оказывает положительное влияние на функционирование головного мозга и приводит к уменьшению объема повреждения [30–32]. Ранние фазы клинических испытаний НСК для оценки их безопасности и эффективности при лечении ЧМТ показали положительные тенденции в восстановлении неврологических функций [28, 33–35].

Клинические исследования клеточной терапии для ЧМТ находятся на ранних стадиях, однако предварительные результаты дают надежду на то, что этот метод может значительно улучшить исходы лечения. Применение клеточной терапии в рамках трансляционной медицины потенциально способно повысить выживаемость и качество жизни пациентов с ЧМТ, обеспечивая новые возможности для нейропротекции и регенерации нервной ткани.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют, что клеточная терапия с использованием ГКП, полученных из ИПСК, является многообещающим методом лечения ЧМТ. Направленное введение ГКП в мозг при помощи внутриартериального введения в каротидные артерии приводило к эффективной миграции клеток в ткани головного мозга. Клеточная терапия ГКП способствовало процессам нейровосстановления и уменьшению объема очага повреждения у животных с ЧМТ. Предположительно, терапевтические эффекты ГКП основаны на механизме паракринного действия секретируемых ими факторов. Использование такого подхода в области трансляционной медицины может значительно увеличить выживаемость и улучшить реабилитацию пациентов после черепно-мозговой травмы, однако требуется более детальное изучение механизмов терапевтического действия ГКП.

References/Библиографический список

- James SL, Theadom A, Ellenbogen RG, Bannick MS, Montjoy-Venning W, Lucchesi LR et al. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*. 2019;18(1):56–87. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30415-0
- Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung YC, Punchak M, Agrawal A, Adeleye AO, Shrivastava MG, Rubiano AM, Rosenfeld JV, Park KB. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*. 2019;130(4):1080–1097. doi: 10.3171/2017.10.JNS17352
- Zhou Y, Shao A, Xu W, Wu H, Deng Y. Advance of Stem Cell Treatment for Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019;13:301. doi: 10.3389/fncel.2019.00301
- Shevelev OA, Smolensky AV, Petrova MV, Mengistu EM, Mengitsu AA, Vatsik-Gorodetskaya MV, Khanakhmedova UG, Menzhurenkova DN, Vesnin SG, Goryanin II. Diagnostics and prevention of sports-related traumatic brain injury complication. *RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(2):254–264. doi: 10.22363/2313-0245-2023-27-2-254-264
- Wolf JA, Stys PK, Lusardi T, Meaney D, Smith DH. Traumatic Axonal Injury Induces Calcium Influx Modulated by Tetrodotoxin-Sensitive Sodium Channels. *The Journal of Neuroscience*. 2001;21(6):1923–1930. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-06-01923.2001
- Barkhoudarian G, Hovda DA, Giza CC. The Molecular Pathophysiology of Concussive Brain Injury — an Update. *Physical medicine and rehabilitation of North America*. 2016;27(2):373–393. doi: 10.1016/j.pmr.2016.01.003
- Jackson ML, Srivastava AK, Cox CS. Preclinical progenitor cell therapy in traumatic brain injury: a meta-analysis. *The Journal of Surgical Research*. 2017;214:38–48. doi: 10.1016/j.jss.2017.02.078
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*. 1998;4(11):1313–1317. doi: 10.1038/3305
- Gould E, Gross CG. Neurogenesis in Adult Mammals: Some Progress and Problems. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22(3):619–623. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-03-00619.2002
- Goldman SA, Nedergaard M, Windrem MS. Glial progenitor cell-based treatment and modeling of neurological disease. *Science*. 2012;338(6106):491–495. doi: 10.1126/science.1218071.
- Llorente IL, Xie Y, Hatanaka EA, Cinkompumin J, Miller DR, Lin Y, Lowry WE, Carmichael ST. Patient-derived glial enriched progenitors repair functional deficits due to white matter stroke and vascular dementia in rodents. *Science translational medicine*. 2021;13(590):1–18. doi: 10.1126/scitranslmed.aaz6747
- Porambo M, Phillips AW, Marx J, Ternes K, Arauz E, Pletnikov M, Wilson MA, Rothstein JD, Johnston MV, Fatemi A. Transplanted glial restricted precursor cells improve neurobehavioral and neuropathological outcomes in a mouse model of neonatal white matter injury despite limited cell survival. *Glia*. 2015;63(3):452–465. doi: 10.1002/glia.22764
- Muir KW, Bulters D, Willmot M, Sprigg N, Dixit A, Ward N, Tyrrell P, Majid A, Dunn L, Bath P, Howell J, Stroemer P, Pollock K, Sinden J. Intracerebral implantation of human neural stem cells and motor recovery after stroke: multicentre prospective single-arm study (PISCES-2). *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2020;91(4):396–401. doi: 10.1136/jnnp-2019-322515
- Cherkashova E, Namestnikova D, Leonov G, Gubskiy I, Sukhinich K, Melnikov P, Chekhonin V, Yarygin K, Goldshtein D, Salikhova D. Comparative study of the efficacy of intra-arterial and intravenous transplantation of human induced pluripotent stem cells-derived neural progenitor cells in experimental stroke. *Peer J*. 2023;11:16358. doi: 10.7717/peerj.16358
- Namestnikova DD, Gubskiy IL, Salikhova DI, Leonov GE, Sukhinich KK, Melnikov PA, Vishnevskiy DA, Cherkasova EA, Gabashvili AN, Bukharova TB, Burunova VV, Fatkhudinov TKh, Chekhonin VP, Gubsky LV, Kiselev SL, Goldstein DV, Yarygin KN. Therapeutic efficacy of intra-arterial administration of induced pluripotent stem cells-derived neural progenitor cells in acute experimental ischemic stroke in rats. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019;21(1):153–164. doi:10.15825/1995-1191-2019-1-153-164 (In Russian). [Namestnikova D.D., Gubskiy I.L., Salikhova D.I., Leonov G.E., Sukhinich K.K., Melnikov P.A., Vishnevskiy D.A., Cherkashova E.A., Gabashvili A.N., Bukharova T.B., Burunova V.V., Fatkhudinov T.Kh., Chekhonin V.P., Gubskiy L.V., Kiselev S.L., Goldshtein D.V., Yarygin K.N. Терапевтическая эффективность введения нейтральных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, при остром экспериментальном ишемическом инсульте у крыс // Регенеративная медицина и клеточные технологии. 2019. Т. 21, вып. 1. С. 153–164].
- Salikhova D, Bukharova T, Cherkashova E, Namestnikova D, Leonov G, Nikitina M, Gubskiy I, Akopyan G, Elchaninov A, Midiber K, Bulatenko N, Mokrousova V, Makarov A, Yarygin K, Chekhonin V, Mikhaleva L, Fatkhudinov T, Goldshtein D. Therapeutic Effects of hiPSC-Derived Glial and Neuronal Progenitor Cells-Conditioned Medium in Experimental Ischemic Stroke in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4694. doi: 10.3390/ijms22094694
- Ma X, Aravind A, Pfister BJ, Chandra N, Haorah J. Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Molecular Neurobiology*. 2019;56(8):5332–5345. doi: 10.1007/s12035-018-1454-5
- Chua JY, Pendharkar A V, Wang N, Choi R, Andres RH, Gaeta X, Zhang J, Moseley ME, Guzman R. Intra-Arterial Injection of Neural Stem Cells using a Microneedle Technique does not Cause Microembolic Strokes. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2011;31(5):1263–1271. doi: 10.1038/jcbfm.2010.213
- Ryck MD, Reempts, Borgers M, Wauquier A, Janssen A. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. *Stroke*. 1989;20(10):1383–1390. doi:10.1161/01.str.20.10.1383
- Salikhova DI, Golovicheva VV, Fatkhudinov TK, Shevtsova YA. Therapeutic Efficiency of Proteins Secreted by Glial Progenitor Cells in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(15):12341. doi:10.3390/ijms241512341
- Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *The Lancet: Neurology*. 2002;1(2):92–100. doi.org/10.1016/S1474-4422(02)00040-6
- Harrell CR, Volarevic A, Volaveric V. Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells on Cognitive Deficits. *Handbook of Stem Cell Therapy*. 2022;413–436. doi.org/10.1007/978-981-19-2655-6_15
- Lu D, Li Y, Wang L, Chen J, Mahmood A, Chopp M. Intraarterial Administration of Marrow Stromal Cells in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*. 2004;18(8):813–819. doi: 10.1089/089771501316919175
- Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*. 2003;53(3):697–703. doi: 10.1227/01.neu.0000079333.61863.a
- Silachev DN, Plotnikov EYu, Babenko VA, Danilina TI, Zorova LD, Pevzner IB, Zorov DB, Sukhikh GT. Intra-Arterial

- Administration of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Promotes Functional Recovery of the Brain After Traumatic Brain Injury. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2015;159(4):528–533. doi: 10.1007/s10517-015-3009-3 (In Russian). [Силачѳв Д.Н., Плотников Е.Ю., Бабенко В.А., Данилина Д.И., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Зоров Д.Б., Сухих Г.Т. Внутриаpтериальное Введение Мультипотентных Мезенхимных Стромальных Клеток Усиливает Функциональное Восстановление Головного Мозга После Черепно Мозговой Травмы // Клеточные Технологии В Биологии И Медицине. 2015. № . 2. С. 71–77.]
26. Harting M, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, Cox CS. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*. 2009;110(6):1189–1197. doi: 10.3171/2008.9.JNS08158
27. Lundberg J, Södersten E, Sundström E, Le Blanc K, Andersson T, Hermanson O, Holmin S. Targeted intra-arterial transplantation of stem cells to the injured CNS is more effective than intravenous administration: engraftment is dependent on cell type and adhesion molecule expression. *Cell Transplantation*. 2012;21(1):333–43. doi: 10.3727/096368911X576036
28. Bonilla C, Zurita M. Cell-based therapies for traumatic brain injury: therapeutic treatments and clinical trials. *Biomedicines*. 2021;9(6):669. doi: 10.3390/biomedicines9060669
29. Carbonara M, Fossi F, Zoerle T, Ortolano F, Moro F, Pischiutta F, Rainer ER, Stocchetti N. Neuroprotection in traumatic brain injury: Mesenchymal stromal cells can potentially overcome some limitations of previous clinical trials. *Frontiers in Neurology*. 2018;24:9:885. doi: 10.3389/fneur.2018.00885
30. Riess P, Zhang C, Saatman KE, Laurer HL, Longhi LG, Raghupathi R, Lenzlinger PM, Lifshitz J, Boockvar J, Neugebauer E, Snyder EY, McIntosh TK. Transplanted neural stem cells survive, differentiate, and improve neurological motor function after experimental traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2002;51(4):1043–1052. doi: 10.1097/00006123-200210000-00035
31. Shindo T, Matsumoto Y, Wang Q, Nobuyuki K, Tamiya T, Nagao S. Differences in the neuronal survival, neuronal differentiation and neurological improvement after transplantation of neural stem cells between mild and severe experimental traumatic brain injury. *The journal of medical investigation: JMI*. 2006;53(1–2):42–51. doi: 10.2152/jmi.53.42
32. Xiong LL, Hu Y, Zhang P, Zhang Z, Li LH, Gao GD, Zhou XF, Wang TH. Neural Stem Cell Transplantation Promotes Functional Recovery from Traumatic Brain Injury via Brain Derived Neurotrophic Factor-Mediated Neuroplasticity. *Molecular Neurobiology*. 2018;55(3):2696–2711. doi: 10.1007/s12035-017-0551-1
33. Saboori M, Riazi A, Taji M, Yadegafar G. Traumatic Brain Injury and Stem Cell Treatments: A Review of Recent 10 Years Clinical Trials. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2024;239:108219. doi: 10.1016/j.clineuro.2024.108219
34. Cox CS, Juranek J, Bedi S. Clinical trials in traumatic brain injury: cellular therapy and outcome measures. *Transfusion*. 2019;59:858–868. doi: 10.1111/trf.14834
35. Schepici G, Silvestro S, Bramanti P, Mazzon E. Traumatic brain injury and stem cells: An overview of clinical trials, the current treatments and future therapeutic approaches. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56(3):137. doi: 10.3390/medicina56030137

Ответственный за переписку: Судьина Анастасия Константиновна — младший научный сотрудник, лаборатория генетики стволовых клеток, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова», Российская Федерация, 115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1. E-mail: nastyasudina@gmail.com

Судьина А.К. SPIN 5225-7878; ORCID 0000-0003-3531-7684

Иванов М.Э. SPIN 8333-9897; ORCID 0000-0002-5010-3919

Юрин А.М. ORCID 0009-0000-9909-0971

Макаров А.В. SPIN 3534-3764; ORCID 0000-0002-5847-567X

Фатхудинов Т.Х. SPIN 7919-8430; ORCID 0000-0002-6498-5764

Гольдштейн Д.В. SPIN 7714-9099; ORCID 0000-0003-2438-1605

Салихова Д.И. SPIN 1436-5027; ORCID 0000-0001-7842-7635

Corresponding author: Sudina Anastasiia Konstantinovna — junior researcher, stem cell genetics laboratory, Research Centre for Medical Genetics, 115522, Moskvorechie str., 1, Moscow, Russian Federation. E-mail: nastyasudina@gmail.com

Sudina A.K. ORCID 0000-0003-3531-7684

Ivanov M.E. ORCID 0000-0002-5010-3919

Yurin A.M. ORCID 0009-0000-9909-0971

Makarov A.V. ORCID 0000-0002-5847-567X

Fatkhudinov T.H. ORCID 0000-0002-6498-5764

Goldstein D.V. ORCID 0000-0003-2438-1605

Salikhova D.I. ORCID 0000-0001-7842-7635