

В.Н. Александров, Т.А. Камилова,  
Б.В. Мартынов, Л.И. Калюжная

## Клеточная терапия при ишемическом инсульте

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

**Резюме.** Ишемический инсульт может привести к необратимым неврологическим нарушениям и даже смерти. Однако не существует лечения, способного в полной мере восстановить утраченные функции. Новым подходом к данной проблеме является клеточная терапия. Исследования свидетельствуют о вовлечении стволовых клеток костного мозга в пластичность головного мозга в норме и при репаративной регенерации. Различные клетки костного мозга, такие как гемопоэтические стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, эндотелиальные клетки-предшественники и очень маленькие эмбрионально-подобные клетки, оказывают терапевтическое действие при инсульте. Все они рассмотрены в качестве потенциальных клеточных продуктов для репарации поврежденных участков головного мозга при ишемическом инсульте. Представлены возможные клеточные и молекулярные механизмы терапевтического действия различных популяций стволовых клеток/клеток-предшественников, в ишемизированном мозге. Не-нейрональные стволовые клетки, используемые для регенерации, могут оказывать «эффект свидетеля» – секретировать факторы роста и другие цитокины, способствующие неоваскуляризации поврежденных тканей и нейрогенезу, а также проявляющие противовоспалительный, антиапоптозный, антиоксидантный и другие эффекты, облегчающие репаративную регенерацию. Считается, что механизмы терапевтического эффекта трансплантации стволовых клеток костного мозга связаны не с непосредственным клеточным замещением тканевого дефекта и изменением его морфологии, а с так называемым эффектом свидетеля – паракринным влиянием трансплантированных клеток, обусловленным секрецией ростовых факторов и других цитокинов, обладающих иммуномодулирующим, нейропротективным, нейрогенным, ангиогенным и антиапоптотическим действием. Обсуждаются оптимальные сроки клеточной терапии, пути доставки и количество клеток в клеточном трансплантате.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, репаративная регенерация, нейрогенез, клеточная терапия, стволовые клетки, нейропротекция, цитокины, апоптоз.

**Патогенез ишемического инсульта.** В патогенезе ишемического инсульта (ИИ) выделяют три стадии: 1) острую (некроз и отек) – первые 24 ч, 2) подострую (инфильтрация клетками воспаления) – 2–7 дней и 3) хроническую (глиофиброз) – 2–8 недель [29]. В острой стадии вследствие гипоксемии и гипоэргоза клеток очага ишемии развивается глутаматная эксайтотоксичность – пусковой механизм некротической и апоптотической гибели нейронов. Формируются центральная зона инфаркта или «ядро ишемии», где 6–8 мин нейроны остаются жизнеспособными, и окружающая ее «ишемическая полутень» или пенумбра – зона, кровоснабжение которой ближайšie 3–6 ч (возможно, больше) выше критического порога необратимых изменений нейронов. Здесь в подострой стадии вследствие выхода лейкоцитов через поврежденный гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и трансмиграции по градиенту хемоаттрактантов развивается воспаление, способствующее развитию апоптоза нейронов [16], «созреванию» инфаркта в ближайšie 4 недели и прогрессированию болезни в целом [15]. Параллельно с альтерацией, экссудацией и миграцией лейкоцитов развивается пролиферация нейрональных стволовых клеток и клеток-предшественников (НСК/НКП) мозга и их миграция в ишемическое поражение для реконструкции нейрональной сети [23]. В ответ

на ишемию изменяется экспрессия и секреция цитокинов, нейротрансмиттеров, гормонов, компонентов межклеточного матрикса, инициирующих нейрогенез в нейрогенных зонах мозга [33, 38]. Во время миграции в зону инфаркта НСК и «молодые» нейроны формируют агрегаты в виде цепочки, двигаясь со скоростью 100 мкм/ч внутри глиальных трубок, образованных астроцитарными отростками. Они экспрессируют рецепторы белков, продуцируемых глией и эндотелиальными клетками периинфарктной зоны, а также матриксные металлопротеиназы, облегчающие миграцию. Хотя количество новых нейронов увеличивается после ИИ 30-кратно, они способны заместить только 0,2% погибших [3]. Большинство НСК и вновь образованных нейронов претерпевают апоптоз, не достигая терминальной дифференцировки, и не формируют функциональные связи [52], мигрируя в очаг ишемии. Таким образом, репаративная регенерация, активированная в ответ на ИИ, не достигает полного восстановления утраченной структуры и функции. Однако сам факт ее активности в течение нескольких недель после ИИ предполагает поиск путей управления репаративным нейрогенезом.

Основным источником СК для регенерации ЦНС является аутологичный и аллогенный костный мозг (КМ), который содержит фракции мезенхимальных

(МСК), гематопозитических (ГСК), эндотелиальных (ЭСК) – очень маленькие эмбрионально-подобные клетки (VSEL – very small embryonic like stem cells) и мононуклеарных клеток (МНК) [16].

*Нейрональные стволовые клетки (НСК)* – мультипотентные клетки-предшественники, способные дифференцироваться в нейрональные и глиальные предшественники электрофизиологически функциональные нейроны, астроциты, миелин-продуцирующие олигодендроциты, а также в эндотелиоцитоподобные клетки [35]. НСК, трансплантированные животным в модели ИИ, восстанавливают некоторые из утраченных функций мозга, хотя и не полностью. Имплантированные в мозг мыши клетки проявляют достаточную выживаемость, пролиферируют, мигрируют в очаг повреждения и дифференцируются в глиальные клетки и электрически активные нейроны, интегрированные в функциональную сеть коры [47]. Клетки трансплантата в отдельных наблюдениях активировали нейрогенез, стимулировали рост аксонов в поврежденной нервной ткани и всегда подавляли воспаление и формирование глиального рубца [5].

Тенденция к поддержанию низкодифференцированного фенотипа и низкая способность трансплантированных НСК дифференцироваться в нейроны в количестве, достаточном для полного восстановления утраченных структур и функций, свидетельствуют о существовании альтернативных механизмов терапевтического эффекта НСК/НКП [50]. Эти механизмы обусловлены паракринным влиянием трансплантированных клеток через ограничение воспаления в очаге ишемии и НСК-индуцированной репарацией ГЭБ [10, 34]. Другой механизм опосредует нейропротективный эффект через ангиогенное и антиапоптозное действие НСК, экспрессирующих VEGF (vascular endothelial growth factor) или антиапоптозный фактор Akt1 [27]. N. Horie и коллеги [22] полагают, что секреция VEGF может быть прогностическим маркером эффективности клеточного продукта. Структурной основой НСК-индуцированного функционального восстановления после ИИ может быть повышенная дендритная пластичность, так как длина дендритов кортикальных пирамидных клеток и количество точек ветвления после клеточной терапии увеличиваются. Хотя размер собственно ишемического повреждения после трансплантации НСК часто не изменяется, одновременно констатируют значительное уменьшение атрофии белого вещества и улучшение выполнения поведенческих тестов. После трансплантации у экспериментальных животных отмечают заметное восстановление аксонального переплетения из контрлатерального полушария и отрастание аксонов, коррелирующее с функциональным восстановлением. Прорастание аксонов после ИИ происходит по новому плану, по направлению к денервированным инсультам участкам. У животных с ИИ наблюдали такое прорастание в периинфарктной зоне, а также межполушарные отростки из интактной коры в поврежденное полушарие. Трансплантация НСК/НКП стимулирует это межполу-

шарное прорастание из коры в кортико-кортикальный, кортико-стриарный и кортико-таламический пути. Еще одним структурным эквивалентом нейропротективного эффекта трансплантированных НСК является редукция накопления амилоидного предшественника и ускоренная его элиминация [1].

*Мезенхимальные стволовые клетки (МСК)* представлены в негематопозитической фракции стволовых клеток костного мозга. Эти мультипотентные фибробластоподобные клетки способны дифференцироваться в клетки мезодермальных (адипоциты, хондро-, фибро-, остео- и миообласты) и эктодермальных (нейроны и астроциты) линий *in vitro* и *in vivo* [46]. При экспериментальном ИИ у крыс трансплантированные МСК могут мигрировать в поврежденную зону мозга, приживляться в месте повреждения, приобретать маркеры нейронов и астроцитов [39]. Аналогичные результаты получить у мышей не удалось [43].

В первом клиническом исследовании аутологичные МСК были введены пациентам с тяжелыми неврологическими дефектами после инфаркта в бассейне средней мозговой артерии. Пациенты отлично и без осложнений переносили трансплантацию в мозг [43] и внутривенно [20]. Получившие МСК лучше восстанавливались и в течение 5 последующих лет в этой группе не было летальных исходов, рецидивов болезни и тяжелых побочных эффектов [28].

Нейропротективный эффект МСК не всегда сочетается с уменьшением площади инфаркта мозга. Его наблюдали как при уменьшении зоны ИИ (иногда более чем втрое [24]), так и в отсутствие достоверного влияния трансплантации на ее размеры [51]. Поскольку лишь 0,01% [46] или даже 0,001% [45] трансплантированных МСК, введенных внутривенно крысам в модели ИИ, приживляются в ишемизированной коре и начинают экспрессировать маркеры нервных клеток и эндотелиоцитов, считается, что улучшение, наблюдаемое у модельных животных и пациентов с ИИ после введения МСК, не связано с дифференцировкой этих клеток в нейроны [9]. Нейропротективный эффект трансплантированных МСК связан скорее с секрецией ими цитокинов и нейротрофических факторов, в частности в VEGF, NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), bFGF/FGF-2 (basic fibroblast growth factor) и IGF-1 (insulin growth factor-1) [3], активирующих эндогенные репарационные механизмы [18, 30]. Действие этих цитокинов инициирует усиление метаболизма глюкозы [3], миграцию НСК из нейрогенных зон мозга в очаг ишемии [20], их выживаемость и дифференцировку в нейроны и астроциты [39]. Активируются синаптогенез, олигодендрогенез, астроцитогенез, ангиогенез, неоваскулогенез в поврежденной ткани [6], усиливается пролиферация эндогенных НСК [3], наблюдается ограничение апоптоза в пенумбре, увеличение плотности аксонов в периинфарктной коре с новыми синаптическими связями [21]. МСК стимулируют ремиелинизацию в демиелинированном участке и аксональную пластичность в ипсилатеральной и контрлатеральной коре

у крыс с инсультом [33], способствуют восстановлению целостности ГЭБ и ограничению отека [20]. Эти эффекты коррелируют со степенью восстановления неврологических и двигательных функций. Возможно, за нейропротекцию ответственно и взаимодействие МСК с иммунными клетками в отдаленных органах (легких, селезенке, печени, лимфоузлах и почках), модулирующее системный воспалительный ответ на повреждение [18].

*Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК)* – смешанная популяция мононуклеарных клеток КМ фенотипа CD34<sup>+</sup>. Инсульт сопровождается массивной мобилизацией ГСК, степень которой коррелирует с восстановлением неврологических функций, поэтому для трансплантации используют, как правило, ГСК, собранные после мобилизации с помощью фактора Г-КСФ. Повреждение ЦНС способствует мобилизации ГСК посредством усиления продукции цитокинов и привлечению ГСК в мозг. Основной механизм мобилизации ГСК – активация в ишемической ткани хемокина SDF-1 (**stromal derived factor-1**)/CXCL12, экспрессирующегося в КМ и других нишах СК (в том числе эндотелии мозга). Секрция SDF-1 астроцитами, нейронами и эндотелиоцитами ишемизированного мозга стимулирует миграцию ГСК из КМ в циркуляцию и привлечение их в место повреждения. Мобилизация СК КМ в мозг в острой фазе ИИ усиливаются, а в хронической фазе уменьшаются [6].

Появление ГСК в мозге не обязательно означает их участие в замещении поврежденной ткани мозга. Пластичность ГСК и способность дифференцироваться в НСК не подтвердились. Постулированная ранее трансдифференцировка ГСК (как и МСК) в НСК объясняется временным изменением фенотипа ГСК в поврежденном мозге, индуцированным экзосомами – мембранными фрагментами из нервной ткани, которые могут переносить рецепторы клеточной поверхности, РНК и другие молекулы на СК, используемые для регенерации [6]. Нейропротективный эффект ГСК, таким образом, не связан с трансдифференцировкой в нейроны и объясняется, вероятно, «эффектом свидетеля» – паракринным механизмом нейропротективного и иммуномодулирующего действия.

*Эндотелиальные клетки-предшественники (ЭКП)* – редкая (0,01% мононуклеаров) популяция циркулирующих гемопоэтических по происхождению клеток, экспрессирующих общие с ГСК маркеры (CD34 и CD133/AC133) и способных участвовать в неоваскуляризации ишемизированных органов. Однозначно интерпретируемых данных об использовании ЭКП для клеточной терапии инсульта в литературе очень мало. Тем не менее, результаты экспериментальных работ показывают, что при ИИ трансплантированные ЭКП участвуют в репарации сосудов, колонизируя поврежденный эндотелий, обнаруживаются во вновь сформированных сосудах ишемизированной зоны, оказывают не прямое противовоспалительное действие, восстанавливая поврежденный ГЭБ и защищая сосуды и мозг от иммунной атаки [26]. Транспланти-

рованные ЭКП секретируют нейропротективные и ангиогенные факторы (IGF-1, VEGF, GM-CSF, G-CSF, SDF-1 и NO), ингибируют апоптоз нейронов и индуцируют образование новых сосудов. При системной трансплантации мышам через час после экспериментального инсульта ЭКП определяются в ишемизированной ткани мозга уже через 24 ч. Через 3 дня после трансплантации отмечено значительное уменьшение зоны инфаркта, а через 4 недели – уменьшение атрофии коры и повышение плотности капилляров в периферической области, сопровождающееся улучшением нейромоторной функции [13].

*Клетки VSEL (very small embryonic-like stem cells)* относятся к негемопоэтической фракции примитивных плюрипотентных СК КМ и присутствуют во многих органах взрослого организма, в том числе в мозге [16]. Абсолютное число циркулирующих VSEL очень мало (1–2 клетки в 1 мл крови в состоянии покоя) и с возрастом становится еще меньше. Очень малый размер VSEL является важным преимуществом, так как помогает избежать риска клеточной эмболии, ассоциированного с клеточной терапией [6]. VSEL экспрессируют маркеры ГСК (CD34, CD133, CXCR4) и плюрипотентных СК (Oct-4, Nanog и SSEA). Уникальный набор генов, экспрессируемых VSEL, соответствует рост-репрессивной программе, но определенные условия культивирования стимулируют VSEL пролиферировать и дифференцироваться. Эпигенетическое репрограммирование генома поддерживает покоящееся состояние СК, защищая взрослый организм от преждевременного старения и канцерогенеза, но сигналы, поступающие из микросреды, могут стимулировать дифференцировку VSEL. Считается, что VSEL – резервный пул предшественников для тканеконмиттированных СК, в том числе НСК, так как они потенциально способны дифференцироваться в нейроны, олигодендроциты и микроглию и могут использоваться для трансплантации и регенерации поврежденной ЦНС [36].

*Мононуклеарные клетки (МНК) КМ* и периферической крови представляет собой гетерогенную фракцию СК и клеток-предшественников с фенотипом CD34<sup>+</sup>, которые секретируют множество цитокинов и ростовых факторов, участвующих в репарационных процессах. В этой связи представляет научно-практический интерес тот факт, что как в эксперименте, так и в клинике в условиях стресса, сопровождающего патологические состояния и болезни, в периферической крови повышается количество всех типов СК, причем в мононуклеарах крови усиливается экспрессия мРНК маркеров плюрипотентных СК. Максимальное повышение экспрессии маркеров СК у мышей отмечается в 1-й день, у человека через 3 дня после инсульта [36]. Миграция этих клеток в поврежденный головной мозг не исключена, ибо через 1 ч после внутривенной трансплантации МНК обнаруживаются в нескольких областях мозга, включая кортикальную перинфарктную зону, мозговую оболочку и периваскулярное пространство. Однако в последующие несколько часов их количество

снижается, а через 7 дней они полностью исчезают [7] вследствие, очевидно, низкой жизнеспособности в ишемизированной среде [48]. Несмотря на малочисленность и кратковременность присутствия трансплантированных МНК в ишемизированной зоне мозга, они оказывают длительный нейропротективный эффект, уменьшают объем инфарктной зоны, усиливают ангиогенез и повышают плотность сосудов, подавляют апоптоз и увеличивают количество нейронов в перифарктных областях мозга, улучшая сенсомоторную функцию после экспериментального инсульта [3]. Восстановление вызванного ИИ неврологического дефицита начинается через 3–7 дней после инъекции МНК, и терапевтический эффект сохраняется в течение всего периода наблюдения (30 дней). Нейропротективный эффект МНК, по-видимому, не связан с трансдифференцировкой и непосредственным замещением погибших клеток. Более вероятен паракринный механизм, не требующий межклеточного контакта. Реализуемый посредством секреции ростовых и противовоспалительных цитокинов FGF-2, BDNF, NGF, VEGF, BDNF, EGF (epidermal growth factor) эритропоэтин, интерлейкин-10 [7], последний относительно быстро обеспечивает усиление эндогенного нейрогенеза и защиту вновь образованных клеток от апоптоза, индуцированного ишемией. Иммуномодулирующее действие секретруемых МНК факторов заключается в подавлении гиперактивации астроцитов и микроглии перифокальной зоны. Полная ингибция активности микроглии нежелательна, так как последняя ограничивает ишемию, секретуруя противовоспалительные цитокины [44]. Наиболее значимое уменьшение области инфаркта и числа клеток с маркерами апоптоза и микроглиально-макрофагальной активации, а также увеличение выживаемости нейронов отмечалось у экспериментальных животных, получивших трансплантацию МНК в сочетании с инъекциями миноциклина (ингибитора микроглиальной активации, который модулирует, но не угнетает ее полностью). Нейропротекторное действие миноциклина при остром ИИ свидетельствует о том, что неконтролируемая реакция микроглии – не только значимый патологический фактор острого инсульта [15], но и фактор, ограничивающий терапевтический эффект трансплантированных клеток [37].

К преимуществам МНК, как клеточного продукта, относятся отсутствие необходимости культивирования, сопряженного с риском контаминации [15], их адгезивность и минимальный риск тромбоземболии, учитывая малый размер клетки (7 мкм) по сравнению, например, с МСК (12–18 мкм) [14]. Показана возможность получить аспират КМ животных и пациентов, выделить МНК в течение 3 часов и немедленно реинъецировать [7].

Терапия представленными выше клетками может осуществляться как самостоятельно, собственно клеточная терапия, так и в виде клеточной генотерапии и тканевой инженерии.

**Тактика трансплантации.** Проблема трансплантации СК в ишемизированный участок мозга включает

в себя вопросы о способе доставки, сроках доставки после начала ИИ и количестве клеток для трансплантации.

Определение оптимального пути доставки СК зависит от типа повреждения центральной нервной системы (ЦНС) (очаговое или многоочаговое). Особенности очагового повреждения ЦНС позволяют предположить, что наиболее подходящим способом может оказаться *интрацеребральная трансплантация* (ИЦТ) клеток непосредственно в место повреждения, а при нескольких областях поражения – системная интраваскулярная или интратекальная [6]. После ИЦТ НСК из всех источников приживляются в мозге и дифференцируются в нейроны, стимулируют рост аксонов, и между трансплантированными клетками и клетками ткани-мишени формируются синаптические контакты [47]. В хронической фазе инсульта локально трансплантированные НСК могут принимать участие в процессе ремоделирования поврежденной нервной ткани. В исследовании E.J. Smith и соавт. [40] ИЦТ НСК в течение 3 месяцев частично восстановила поведенческую дисфункцию. Клетки, трансплантированные в паренхиму, стимулируют восстановление сенсомоторной дисфункции, хотя объем повреждения после трансплантации не отличается от такового у контрольных животных. Улучшение обучения и памяти не доказано. Интрацеребровентрикулярная инъекция не привела ни к какому улучшению. ИЦТ СК не способствует выживаемости трансплантата, не пригодна для пациентов, которые находятся в клинически тяжелом состоянии. Метод требует точного введения клеток, так как рост нейритов наблюдается только в случае, когда между местом трансплантации и инфарктной зоной имеется сохранный нервная ткань [31], не позволяет осуществлять многократно доставку клеток, сопряжен с риском травмы тканей, воспалением, отеком и отторжением трансплантата. Обойти эти риски позволяет трансплантация клеток в ликвор и мозговой кровоток.

В экспериментальных моделях ИИ у грызунов *внутривенную инъекцию* (ВВИ) СК проводят обычно в хвостовую вену [31]. При ВВИ СК грызунам показана наибольшая выживаемость СК [6] и наиболее значимое улучшение выполнения поведенческих тестов, даже когда ВВИ выполнена через месяц после инсульта, и этот эффект сохраняется и через год [32]. Однако многие внутривенно трансплантированные клетки распределяются по всему организму, в частности, фиксируются в печени, селезенке, легких и почках, и лишь небольшая часть попадает в место повреждения [31]. Выживаемость трансплантированных клеток составляет 5–10%. Чтобы достичь таких же результатов, как при ИЦТ, требуется ВВИ большего числа клеток, что повышает риск эмболии. Снижение этого риска может быть достигнуто терапевтически более эффективной двойной инъекцией СК [41]. ВВИ СК – наименее инвазивный, легко осуществимый и безопасный подход к клеточной терапии ИИ, что является важным преимуществом перед вышеописанными способами трансплантации [31].

*Интраартериальная трансплантация (ИАТ) СК* приводит к немедленному появлению клеток в перинфарктной области и не влияет на гемодинамику и перфузию головного мозга. Однако вскоре после инъекции их количество экспоненциально снижается до минимума, так как ишемизированный мозг представляет собой токсичную для них среду [7]. Тем не менее, ИАТ предпочтительнее внутривенной, сопряженной с перераспределением клеток в печень, легкие, селезенку и риском клеточной эмболии [16]. Безопасность ИАТ можно повысить, используя бедренную артерию вместо сонной, а эффективность – комбинируя ее с технологией МРТ – УЗ (магнитно-резонансная томография – ультразвук), позволяющей обеспечить направленную миграцию трансплантированных клеток. Технология МРТ – УЗ концентрирует акустическую энергию на пятне диаметром в несколько миллиметров и обратимо увеличивает проницаемость ГЭБ для проникновения клеток из кровотока в нужный участок мозга [25]. Эффективность ИАТ/МРТ – УЗ дополнительно повышается вследствие возможности ее неоднократного использования [8].

*Инtrateкальная трансплантация (ИТТ) СК* – альтернативный эффективный и клинически приемлемый способ доставки СК при ИИ с помощью люмбальной пункции, которая является распространенным средством доставки химических агентов в спинномозговую жидкость (СМЖ) и хорошо переносится [49]. СМЖ обеспечивает канал распределения инъецированных клеток, благодаря которому СК мигрируют в пораженную зону. Значительное большее число трансплантированных клеток обнаружено в перинфарктной зоне после инtrateкальной инъекции по сравнению с внутривенной инъекцией. ИТТ повышает выживаемость трансплантированных СК, при этом наблюдается их дифференцировка в нервные фенотипы. По терапевтической эффективности относительно сенсорных функций ИТТ СК не уступает внутривенной и позволяет вдвое уменьшить клеточную дозу ( $5 \times 10^5$  вместо  $1 \times 10^6$  клеток) [31].

*Сроки трансплантации клеток* после начала ИИ предопределены степенью инвазивности способа, патогенезом ИИ и фенотипом трансплантируемых клеток. Через много месяцев или лет после перенесенного инсульта, когда ожидание спонтанного естественного восстановления необоснованно, считается оправданной интрапаренхимальная инъекция. НКП, трансплантированные в кору ишемизированного полушария через 7 дней после инсульта, проявляют хорошую выживаемость и через 5 недель после трансплантации мигрируют в место повреждения, оставаясь незрелыми [1]. НСК значительно усиливают восстановление сенсорных функций через неделю после трансплантации (т.е. раньше их эффекта на образование сосудов), которое совпадает с эффектами на воспаление и репарацию ГЭБ. Эти данные расширяют терапевтическое окно для использования НСК-терапии по сравнению с 6–72 ч для МСК. Через 3–4 недели после трансплантации,

проведенной позднее временного окна нейропротекции, получившие НСК крысы продемонстрировали улучшение сенсорного дефицита. Интраваскулярная трансплантация СК требует открытого ГЭБ и доступа в пенумбру, что ограничивает время терапии периодом, когда ГЭБ поврежден. В острой фазе ИИ она может ингибировать первый этап ишемического каскада и усилить эндогенные механизмы репарации мозга. ГЭБ открыт несколько недель после ишемии, что делает возможным вход экзогенных клеток в поврежденную ткань [6]. В поздней стадии ИИ глиальное рубцевание препятствует доставке СК в перинфарктные области [17]. Системное введение требует хемотаксического сигналинга между ишемическим мозгом и трансплантированными СК, что также делает его предпочтительным скорее в острой или подострой фазе инсульта, нежели в стабильной хронической фазе, когда активность хемокинов возвращается на обычный уровень. Поэтому важно идентифицировать оптимальный момент, когда следует начинать манипуляции по остановке механизма повреждения ГЭБ и сосудов мозга.

Хотя в острой фазе ИИ действуют факторы, снижающие выживаемость трансплантированных клеток, такие как воспаление [16], неправильная функциональная интеграция новых нейронов или недостаточная трофическая поддержка [4], многие авторы [6, 7] полагают, что лучшее время для начала терапии – острая и подострая стадии, мотивируя это наличием условий, необходимых для миграции трансплантированных клеток в очаг повреждения (открытый ГЭБ и острое воспаление, иницирующее миграцию). В этой связи СК следует трансплантировать в первые недели после инсульта, чтобы они попали в восприимчивую пластичную среду. Однако результаты экспериментов с маркерными генами аксонального роста и клинические данные указывают, что функциональное улучшение, обусловленное нейропластичностью, ограничено 1–4 неделями после инсульта, а у человека и более (месяцы) [12].

Относительно *оптимального количества клеток* для трансплантации консенсус также отсутствует. В первом клиническом исследовании эффективности и безопасности клеточной терапии пациентам с тяжелыми неврологическими дефектами после инфаркта в бассейне средней мозговой артерии были введены внутривенно МСК, полученные из аспиринов КМ через неделю после госпитализации. Клетки вводили дважды через 4–5 и 7–9 недель после начала ИИ в количестве  $5 \times 10^7$  клеток на инфузию. Пациенты, получившие трансплантацию МСК, лучше восстанавливались и в течение 5 последующих лет у них не было летальных исходов, рецидивов инсульта и тяжелых побочных эффектов [28]. Оптимальное число НСК для лечения инсульта неизвестно [11].

**Заключение.** Продемонстрирована клиническая эффективность клеточной терапии и описаны принципиальные механизмы улучшения сенсорных

функций. Более вероятен механизм паракринной нейропротекции и иммуномодулирующего действия, нежели клеточного замещения. Трансплантированные клетки независимо от их иммунофенотипа секретируют цитокины с нейропротективным, иммуномодулирующим и ангиогенным действием, активирующие эндогенные механизмы репаративной регенерации [4, 6, 19]. Хотя до сих пор остаются открытыми вопросы, связанные с выбором оптимального пути введения СК [42], оптимального их количества и сроков трансплантации, степенью риска клеточной эмболии [6] и ожидаемым клиническим эффектом [2], Федеральное агентство Соединенных Штатов Америки по контролю за лекарствами санкционировало клинические исследования по внутривенной трансплантации аутологичных МСК пациентам с острым инсультом (University of Texas at Houston) и стереотаксической трансплантации аллогенных МСК пациентам с ИИ (Stanford University) [6]. В стадии разработки находятся протоколы клинических исследований, часть из которых относится к восстановительному лечению инсульта, а другие специфичны для типа СК или способа их доставки.

### Литература

- Andres, R.H. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain / R.H. Andres, N. Horie, W. Slikker // *Brain*. – 2011. – Vol. 134, Pt. 6. – P. 1777–1789.
- Ankrum, J. Mesenchymal stem cell therapy: two steps forward, one step back / J. Ankrum, J.M. Karp // *Trends mol. med.* – 2010. – Vol. 16, № 5. – P. 203–209.
- Bao, X. Transplantation of Flk-1+ human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats / X. Bao, M. Feng, J. Wei // *Eur. j. neurosci.* – 2011. – Vol. 34, № 1. – P. 87–98.
- Bliss, T.M. Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke / T.M. Bliss [et al.] // *Neurobiol. dis.* – 2010. – Vol. 37, № 2. – P. 275–283.
- Bonnemain, V. Neural stem/progenitor cells as promising candidates for regenerative therapy of the central nervous system / V. Bonnamain, I. Neveu, P. Naveilhan // *Front. cell neurosci.* – 2012. – № 6. – P. 17.
- Borlongan, C.V. The great migration of bone marrow-derived stem cells toward the ischemic brain: Therapeutic implications for stroke and other neurological disorders / C.V. Borlongan // *Prog. neurobiol.* – 2011. – Vol. 95, № 2. – P. 213–228.
- Brenneman, M. Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats / M. Brenneman, S. Sharma, M. Harting // *J. cerebr. blood flow metab.* – 2010. – Vol. 30, № 1. – P. 140–149.
- Burgess, A. Targeted delivery of neural stem cells to the brain using MRI-guided focused ultrasound to disrupt the blood-brain barrier / A. Burgess, C.A. Ayala-Grosso, M. Ganguly // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6, Issue 11. – P. e27877.
- Burns, T.C. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review / T.C. Burns [et al.] // *J. comp. neurol.* – 2009. – Vol. 515, № 1. – P. 125–144.
- Cusimano, M. Transplanted neural stem/precursor cells instruct phagocytes and reduce secondary tissue damage in the injured spinal cord / M. Cusimano, D. Biziato, E. Brambilla // *Brain*. – 2012. – Vol. 35, Pt. 2. – P. 447–460.
- Delavaran, H. Proximity of brain infarcts to regions of endogenous neurogenesis and involvement of striatum in ischaemic stroke / H. Delavaran // *Eur. j. neurol.* – 2013. – Vol. 20, № 3. – P. 473–479.
- Dihne, M. Restoring neuronal function after stroke by cell replacement / M. Dihne, H.-P. Hartung, R.J. Seitz // *Stroke*. – 2011. – Vol. 42, № 8. – P. 2342–2350.
- Fan, Y. Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice / Y. Fan, F. Shen, T. Frenzel // *Ann. neurol.* – 2010. – Vol. 67, № 4. – P. 488–497.
- Fischer, U.M. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first pass effect / U.M. Fischer, M.T. Harting, F. Jimenez // *Stem cells dev.* – 2008. – Vol. 18, № 5. – P. 683–692.
- Franco, E.C.S. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia / E.C.S. Franco, M.M. Cardoso, A. Gouvkia // *Neurosci. res.* – 2012. – Vol. 732. – P. 122–132.
- Glover, L.E. A step-up approach for cell therapy in stroke: translational hurdles of bone marrow-derived stem cells / L.E. Glover, N. Tajiri, N.L. Weinbren // *Transl. stroke res.* – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 90–98.
- Gutierrez-Fernandez, M. Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats / M. Gutierrez-Fernandez [et al.] // *Neurosci.* – 2011. – Vol. 175. – P. 394–405.
- Gutiérrez-Fernández, M. Trophic factors and cell therapy to stimulate brain repair after ischemic stroke / M. Gutiérrez-Fernández, B. Fuentes, B. Rodríguez-Frutos // *J. cell mol. med.* – 2012. – Vol. 16, № 10. – P. 2280–2290.
- Hocking, A.M. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair / A.M. Hocking, N.S. Gibran // *Exp. cell res.* – 2010. – Vol. 316, № 14. – P. 2213–2219.
- Honmou, O. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke / O. Honmou, K. Houkin, T. Matsunaga // *Brain*. – 2011. – Vol. 134, Pt. 6. – P. 1790–1807.
- Honmou, O. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke / O. Honmou [et al.] // *Trends mol. med.* – 2012. – Vol. 185. – P. 292–297.
- Horie, N. Transplanted stem cell-secreted vascular endothelial growth factor effects poststroke recovery, inflammation, and vascular repair / N. Horie, M.P. Pereira, K. Niizuma // *Stem cells*. – 2011. – Vol. 29, № 2. – P. 274–285.
- Hou, S.W. Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain / S.W. Hou, Y.Q. Wang, M. Xu // *Stroke*. – 2008. – Vol. 39, № 10. – P. 2837–2844.
- Jang, D.-K. Motor-evoked potential confirmation of functional improvement by transplanted bone marrow mesenchymal stem cell in the ischemic rat brain / D.-K. Jang [et al.] // *J. biomed. biotechnol.* – 2011. – Vol. 2011. – Article ID 238409.
- Jordao, J.F. Antibodies targeted to the brain with image-guided focused ultrasound reduces amyloid-b plaque load in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease / J.F. Jordao, C.A. Ayala-Grosso, K. Markham // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 55. – P. e10549.
- Kaneko, Y. Cell therapy for stroke: emphasis on optimizing safety and efficacy profile of endothelial progenitor cells / Y. Kaneko, N. Tajiri, K. Shinozuka // *Curr. pharm. des.* – 2012. – Vol. 18, № 25. – P. 3731–3734.
- Lee, H.J. Human neural stem cells genetically modified to overexpress Akt1 provide neuroprotection and functional improvement in mouse stroke model / H.J. Lee [et al.] // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4, № 5. – P. e5586.
- Lee, J.S. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke / J.S. Lee, J.M. Hong, G.J. Moon // *Stem cells*. – 2010. – Vol. 28, № 6. – P. 1099–1106.
- Lee, M.-C. Stem cell dynamics in an experimental model of stroke / M.-C. Lee [et al.] // *Chonnam med. j.* – 2011. – Vol. 47, № 2. – P. 90–98.

30. Li, J. Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebral ischemic injury and upregulates interleukin-10 expression in *Macaca fascicularis* / J. Li, H. Zhu, Y. Liu // *Brain Res.* – 2010. – Vol. 1334, № 1. – P. 65–72.
31. Lim, J.Y. Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia / J.Y. Lim, C.H. Jeong, J.A. Jun // *Stem cell res. ther.* – 2011. – Vol. 2, № 5. – P. 38.
32. Lindvall, O. Stem cell research in stroke. How far from the clinic? / O. Lindvall, Z. Kokaia // *Stroke.* – 2011. – Vol. 42, № 8. – P. 2369–2375.
33. Liu, Z. Bone marrow stromal cells enhance inter- and intracortical axonal connections after ischemic stroke in adult rats / Z. Liu [et al.] // *J. cereb. blood flow metab.* – 2010. – Vol. 30, № 7. – P. 1288–1295.
34. Michel-Monigadon, D. Minocycline promotes long-term survival of neuronal transplant in the brain by inhibiting late microglial activation and T cell recruitment / D. Michel-Monigadon, V. Nerriere-Daguin, X. Leveque // *Transplantation.* – 2010. – Vol. 89, № 7. – P. 816–823.
35. Nakayama, D. Injury-induced neural stem/progenitor cells in post-stroke human cerebral cortex / D. Nakayama, T. Matsuyama, H. Ishibashi-Ueda // *Eur. j neurosci.* – 2010. – Vol. 31, № 1. – P. 90–98.
36. Ratajczak, J. Stem cells for neural regeneration – a potential application of very small embryonic-like stem cells / J. Ratajczak, E. Zuba-Surma, E. Paczkowska // *J. physiol. pharmacol.* – 2011. – Vol. 62, № 1. – P. 3–12.
37. Sakata, H. Minocycline-preconditioned neural stem cells enhance neuroprotection after ischemic stroke in rats / H. Sakata, K. Niizuma, H. Yoshioka // *J. Neurosci.* – 2012. – Vol. 32, № 10. – P. 3462–3473.
38. Sawamoto, K. Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain / K. Sawamoto, Y. Hirota, C. Alfaro-Cervello // *J. comp. neurol.* – 2011. – Vol. 519, № 4. – P. 690–713.
39. Shen, L.H. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke / L.H. Shen, Y. Li, J. Chen // *J. cereb. blood flow metab.* – 2007. – Vol. 27, № 1. – P. 6–13.
40. Smith, E.J. Implantation site and lesion topology determine efficacy of a human neural stem cell line in a rat model of chronic stroke / E.J. Smith, R.P. Stroemer, N. Gorenkova // *Stem cells.* – 2012. – Vol. 30, № 4. – P. 785–796.
41. Song, M. Effects of duplicate administration of human neural stem cell after focal cerebral ischemia in the rat / M. Song, Y.-J. Kim, Y.-H. Kim // *Int. j. neurosci.* – 2011. – Vol. 121, № 8. – P. 457–461.
42. Steiner, B. Systemically administered human bone marrow-derived mesenchymal stem home into peripheral organs but do not induce neuroprotective effects in the MCAo-mouse model for cerebral ischemia / B. Steiner [et al.] // *Neurosci. lett.* – 2012. – Vol. 513, № 1. – P. 25–30.
43. Suarez-Monteagudo, C. Autologous bone marrow stem cell neurotransplantation in stroke patients / C. Suarez-Monteagudo [et al.] // *Restor. neurol. neurosci.* – 2009. – Vol. 27, № 3. – P. 151–161.
44. Thored, P. Longterm accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke / P. Thored [et al.] // *Glia.* – 2009. – Vol. 57, № 8. – P. 835–849.
45. Walker, P.A. Progenitor cells as remote “bioreactors”: Neuroprotection via modulation of the systemic inflammatory response / P.A. Walker, P.A. Letourneau, S. Bedi // *World j. stem cells.* – 2011. – Vol. 26, № 3 (2). – P. 9–18.
46. Wei, L. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats / L. Wei, J.L. Fraser, Z.-Y. Lu // *Neurobiol. dis.* – 2012. – Vol. 46, № 3. – P. 635–645.
47. Yagi, H. Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing / H. Yagi, A. Soto-Gutierrez, B. Parekadan // *Cell transplant.* – 2010. – Vol. 19, № 6. – P. 667–679.
48. Yang, B. Therapeutic time window and dose response of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke / B. Yang, R. Strong, S. Sharma // *J. neurosci. res.* – 2011. – Vol. 89, № 6. – P. 833–839.
49. Yang, W.Z. Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions / W.Z. Yang, Y. Zhang, F. Wu // *J. transl. med.* – 2010. – № 8. – P. 75–80.
50. Yu, H. Combined transplantation of neural stem cells and collagen type I promote functional recovery after cerebral ischemia in rats / H. Yu, B. Cao, M. Feng // *Anat. rec.* – 2010. – Vol. 293, № 5. – P. 911–917.
51. Zhang, L. Delayed administration of human umbilical tissue-derived cells improved neurological functional recovery in a rodent model of focal ischemia / L. Zhang, J.Y. Li, Z.G. Zhang // *Stroke.* – 2011. – Vol. 42, № 5. – P. 1437–1444.
52. Zhuang, P. Direct stimulation of adult neural stem/progenitor cells in vitro and neurogenesis in vivo by salvianolic acid B / P. Zhuang, Y. Zhang, G. Cui // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7, Issue 4. – P. e35636.

V.N. Alexandrov, T.A. Kamilova, B.V. Martynov, L.I. Kalyuzhnaya

### Cell therapy in ischemic stroke

**Abstract.** *Ischemic stroke can cause permanent neurological damage and even death. However, there is no treatment that can fully restore lost functions. A new approach to this problem is cell therapy. Research suggests the involvement of bone marrow stem cells in the plasticity of the brain in normal and reparative regeneration. Various cells of the bone marrow such as hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, endothelial progenitor cells and very small embryonic-like cells exert a therapeutic effect in stroke. All of them are considered as potential cell products for the repair of the damaged areas of the brain at ischemic stroke. We showed the possible cellular and molecular mechanisms of therapeutic action of different populations of stem / progenitor cells in the ischemic brain. Non-neuronal stem cells used for regeneration may provide «bystander effect» – secrete growth factors and other cytokines to promote neovascularization of damaged tissues and neurogenesis and exhibiting anti-inflammatory, anti-apoptotic, antioxidant, and other effects to facilitate reparative regeneration. It is believed that the mechanisms of the therapeutic effect of transplantation of bone marrow stem cells are not associated with immediate cell replacement tissue defect and change its morphology and the so-called bystander effect – paracrine effect of transplanted cells, due to the secretion of growth factors and other cytokines having immunomodulatory, neuroprotective, neurogenic, angiogenic, and antiapoptotic effect. We discuss the optimal timing of cell therapy, route of delivery and the number of cells in the cell transplant.*

**Key words:** *stroke, cellular therapy, regenerative medicine, stem cells, brain, neuroprotection, cells delivery, neurogenesis, cytokines, apoptosis.*

Контактный телефон: +7-921-637-46-51; e-mail: kamilovaspb@mail.ru