

К.Н. Золотко  
А.Н. Сукач

Институт проблем  
криобиологии и  
криомедицины НАН  
Украины, Харьков.

Надійшла: 21.08.2018  
Прийнята: 11.09.2018

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2018.3.79-84>

УДК 611.018.82.085.23-089:57.086.13+611.013.395]:616.831-005.1

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ АГРЕГАТОВ НЕЙРАЛЬНЫХ КЛЕТОК СОВМЕСТНО С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОГО КРОВОИЗЛИЯНИЯ У КРЫС

© Morphologia. – 2018. – Т. 12, № 3. – С. 79-84.

© К.Н. Золотко (ORCID 0000-0002-2211-6798), А.Н. Сукач (ORCID 0000-0002-7838-7319)

✉ [kyrylozo@gmail.com](mailto:kyrylozo@gmail.com)

**Zolotko K.N., Sukach A.N. Investigation of neural cells cryopreserved aggregates transplantation efficiency separately and together with mesenchymal stem cells for the treatment of intracerebral hemorrhage in rats.**

**ABSTRACT. Background.** The Intracerebral haemorrhage is accompanied by severe complications and high mortality. There are currently no effective methods of treating this disease. **Objective.** to study the therapeutic efficiency of transplantation of cryopreserved neural cells in three-dimensional aggregates in combination with mesenchymal stem cells at the course of the pathological process in rats after intracerebral haemorrhage. **Methods:** isolation and cultivation of cells, cryopreservation, stereotaxis, transplantation, morphometry. **Results.** Experimental animals were injected with aggregates of neural cells, and aggregates together with mesenchymal stem cells. Control animals were injected with DMEM/F12. It has been established that intraventricular administration of cryopreserved aggregates of neural cells together with mesenchymal stem cells to rats with intracerebral hemorrhage significantly reduces the number of leukocytes starting from 6 days after transplantation in comparison with control. In the same experimental group the relative amount of neutrophils significantly decreased by 23.9%, and the relative amount of lymphocytes increased by 25.6% compared to the control on 1-st day after transplantation. In the group of neural cells aggregates transplantation the area of glial scars decreased by 34.9% compared to the control, and the ratio of the injured striatum diameter to the healthy one increased by 33.9%. **Conclusion.** The results of the study show that transplantation of neural cells aggregates together with mesenchymal stem cells is more effective in reducing inflammation in intracerebral haemorrhage, while the administration of aggregates of neural cells alone is more effective in the long term.

**Key words:** intracerebral haemorrhage, rats, aggregates of neural cells, mesenchymal stem cells, cellular therapy, leukocytes, morphometry.

### Citation:

Zolotko KN, Sukach AN. [Investigation of neural cells cryopreserved aggregates transplantation efficiency separately and together with mesenchymal stem cells for the treatment of intracerebral hemorrhage in rats].

Morphologia. 2018;12(3):79-84. Russian. DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2018.3.79-84>.

### Введение

Интрацеребральное кровоизлияние (ИК), которое является причиной 15% всех инсультов, сопровождается тяжелыми осложнениями и высокой смертностью. Эффективных методов лечения этого заболевания в настоящее время не существует. Поэтому актуальным является создание принципиально новых методов лечения, направленных на снижение проявлений ИК [1]. Широкие перспективы создания новых протоколов лечения нейродегенеративных заболеваний

появились после открытия стволовых клеток и развития методов клеточной терапии [2, 3, 4]. Так как нейральные стволовые клетки могут служить источником нейронов, клеток глии и биологически активных факторов [5], а мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают выраженным иммуномодулирующим и противовоспалительным действием [4, 5], их использование открывает большие перспективы в разработке новых подходов лечения воспалительно-дегенеративных заболеваний нервной системы.

При этом многими исследователями было показано большую эффективность использования стволовых клеток в составе трехмерных структур [6, 7].

**Цель работы** – изучение терапевтической эффективности криоконсервированных нейральных клеток в составе трехмерных агрегатов в комбинации с МСК на течение патологического процесса у животных после интрацеребрального кровоизлияния.

#### **Материалы и методы**

Эксперименты были проведены на 23 белых беспородных крысах-самцах массой 250–350 г, в возрасте 11-13 месяцев. Моделирование ИК проводили согласно ранее описанному методу [8]. После внутривентрикулярной анестезии пропофолом (20 мг/кг) и сетазином (20 мг/кг), крысам интрацеребровентрикулярно стереотаксически (координаты от брегмы: переднезадняя – 0,2 мм, медиолатеральная с левой стороны – 3,0 мм), используя иглу диаметром 0,47 мм медленно на глубину 6,0 мм вводили 0.2 ЕД коллагеназы IV («Sigma-Aldrich», США) в 1 мкл физиологического раствора. Через 5 мин после введения иглу извлекали и на рану накладывали швы.

Клетки выделяли из печени и головного мозга плодов крыс 15-16 дней гестации. Для этого ткань печени и головного мозга извлекали, промывали стерильной солевой средой, инкубировали на протяжении 5 мин при 37° С в 0,25% растворе трипсина, переносили в среду DMEM/F12, обогащенную 10% сыворотки и механически дезагрегировали на единичные клетки при помощи вибрации [9]. Полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновый фильтр и отмывали от трипсина центрифугированием при 150 g на протяжении 5 мин. Осадок клеток ресуспендировали в среде DMEM/F12 содержащей 10% сыворотки.

Для формирования агрегатов свежеизолированные нейральные клетки (НК) культивировали на протяжении 4 часов в 24-х луночном планшете в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/лунку в среде DMEM/F12 (Sigma, США), обогащенной 10% сыворотки. В течение первого часа культивирования через каждые 15 мин осевшие на дно НК суспендировали до образования агрегатов. Образовавшиеся в одной лунке агрегаты собирали и криоконсервировали.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) получали в процессе культивирования клеток печени в 24-луночных планшетах ( $5 \times 10^5$  клеток/лунку) в обогащенной среде DMEM/F12 в присутствии 10% сыворотки в CO<sub>2</sub> инкубаторе. Среду заменяли каждые 4 суток. По достижению 80% confluentного роста, клетки пересевали. Клетки, полученные после третьего посева, снимали и криоконсервировали.

Агрегаты НК и МСК криоконсервировали под защитой 10% ДМСО, который удаляли после

оттаивания.

Количество трансплантируемых клеток было определено в результате анализа результатов предварительно проведенных исследований [3,10,11,12].

Клетки вводили на вторые сутки после формирования ИК в боковой желудочек мозга стереотаксически (координаты от брегмы: переднезадняя – 0,9 мм, медиолатеральная – 1,4 мм) на глубину 3,4 мм.

Животные были разделены на 3 группы. Крысам первой опытной группы (n = 7) на 1-е сутки после формирования ИК трансплантировали криоконсервированные агрегаты нейральных клеток (АНК), образовавшиеся в одной лунке 24-луночного планшета в процессе культивирования НК в 30 мкл DMEM/F12. Крысам второй опытной группы (n = 7) для трансплантации использовали сочетание криоконсервированных АНК (образовавшихся в процессе культивирования НК в 1 лунке) в 30 мкл среды DMEM/F12 и  $1 \times 10^6$  МСК в 15 мкл среды DMEM/F12. Животным контрольной группы (n = 9) вводили 30 мкл среды DMEM/F12.

Подсчет общего количества НК, МСК и лейкоцитов проводили в камере Горяева по стандартной методике. Количество лейкоцитов подсчитывали до моделирования ИК, в день трансплантации, а также в 1-е, 6-е и 13-е сутки после введения клеток и DMEM/F12. Относительное содержание нейтрофилов и лимфоцитов подсчитывали в те же временные промежутки в мазках крови, фиксированных по Маю-Грюнвальду и окрашенных по Романовскому.

Головной мозг, полученный после выведения крыс из эксперимента, фиксировали в 10% формалине. Для выявления нейронов, микропрепараты окрашивали по Нисслю.

Морфометрические исследования проводились с использованием программы AxioVision.

Статистический анализ результатов проводился с помощью программы SPSS. Использовали тесты Краскла-Уоллиса и Манна-Уитни при уровне значимости  $\alpha < 0,05$ .

Эксперименты проводили в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№3447-IV от 21.02.2006 г.) при соблюдении требований по биоэтике Комитета Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков), согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

#### **Результаты и их обсуждение**

Проведенные исследования показали, что на 6-е и 13-е сутки после трансплантации количество лейкоцитов во 2-й опытной группе крыс (рис.1) достоверно уменьшалось на 24,6% и 27,1% по сравнению с контролем соответствен-

но, что свидетельствовало об уменьшении интенсивности воспалительного процесса.

Кроме того, наблюдалась тенденция к понижению количества лейкоцитов в обеих опытных группах на 1-е сутки, а в 1-й группе также на 6-е и 13-е сутки после трансплантации клеток.

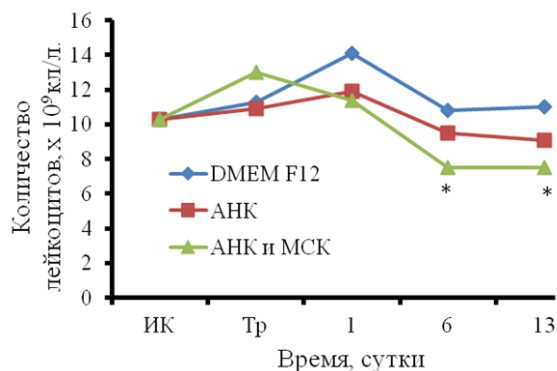


Рис. 1. Оценка влияния трансплантации криоконсервированных АНК и АНК совместно с МСК на содержание общего количества лейкоцитов у животных исследуемых групп с ИК.

Примечание. \*  $P < 0,05$ ; ИК – моделирование интрацеребрального кровоизлияния; Тр. – трансплантация криоконсервированных клеток (через 1 сутки после ИК).

При подсчете относительного количества нейтрофилов и лимфоцитов (рис. 2-3) было обнаружено статистически значимое повышение количества нейтрофилов (рис. 2) и понижение количества лимфоцитов в крови крыс (рис. 3) на 1 сутки после ИК во всех группах животных. Через 1-е сутки после введения клеток во 2-й опытной группе наблюдалось достоверное снижение (на 23,9%) относительного количества нейтрофилов по сравнению с животными контрольной группы (рис. 2), что свидетельствует о подавлении воспалительного процесса у животных, которым проводили трансплантацию АНК с МСК.

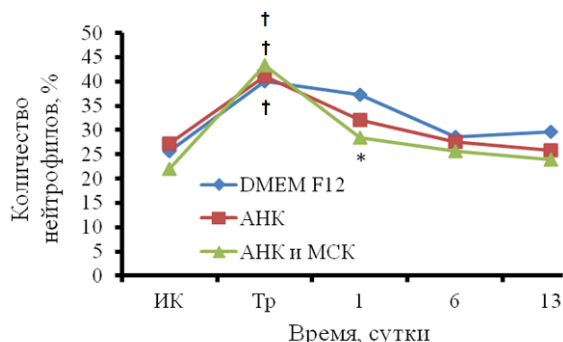


Рис. 2. Оценка влияния трансплантации криоконсервированных АНК и АНК совместно с МСК на количество нейтрофилов в крови (в процентах от общего количества лейкоцитов).

Примечание. \*  $P < 0,01$  (по сравнению с контрольной группой (DMEM/F12)); †  $P < 0,01$  (по сравнению с состоянием до ИК); ИК – моделирование интрацеребрального кровоизлияния; Тр. – трансплантация криоконсервированных клеток (через 1 сутки после ИК).

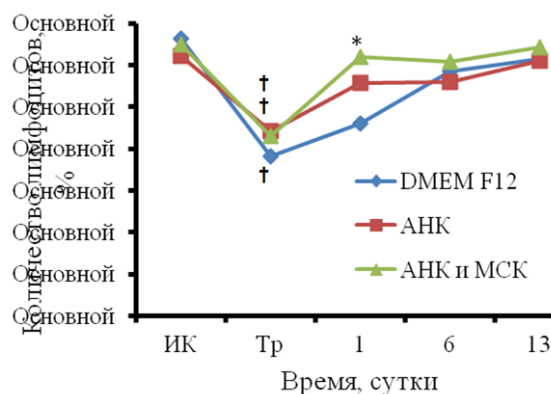


Рис. 3. Оценка влияния трансплантации криоконсервированных АНК и АНК совместно с МСК на количество лимфоцитов в крови (в процентах от общего количества лейкоцитов).

Примечание. \*  $P < 0,01$  (по сравнению с контрольной группой (DMEMF12)); †  $P < 0,01$  (по сравнению с состоянием до ИК); ИК – моделирование интрацеребрального кровоизлияния; Тр. – трансплантация криоконсервированных клеток (через 1 сутки после ИК).

В 1-й опытной группе наблюдалась тенденция к понижению относительного количества нейтрофилов (рис. 2). На 1-е сутки после трансплантации наблюдалось достоверное повышение относительного содержания лимфоцитов во 2-й группе животных на 25,6% по сравнению с контролем, что может быть связано с уменьшением уровня апоптоза этих клеток, вызванного повышением симпатической стимуляции [13].

В результате ИК в стриатуме животных образуются глиальные рубцы, максимальная площадь которых в серии срезов отражает объем поврежденного участка мозга, что, в свою очередь, коррелирует со степенью неврологических нарушений [14].

При измерении площади глиальных рубцов в микропрепаратах (рис. 4) было обнаружено, что у животных первой экспериментальной группы (трансплантация АНК) средняя площадь рубцов была достоверно меньше (на 34%), чем в группе контроля (рис. 5), что свидетельствует о более благоприятном протекании патологического процесса у животных.

Измерение соотношения между диаметрами стриатумов (расстояние между серединой фронтальной проекции бокового желудочка и мозолистым телом) (рис. 4 Г) на стороне ИК и на противоположной интактной стороне, показало достоверное его увеличение в 1-й группе на 34% по сравнению с контролем (рис. 6).



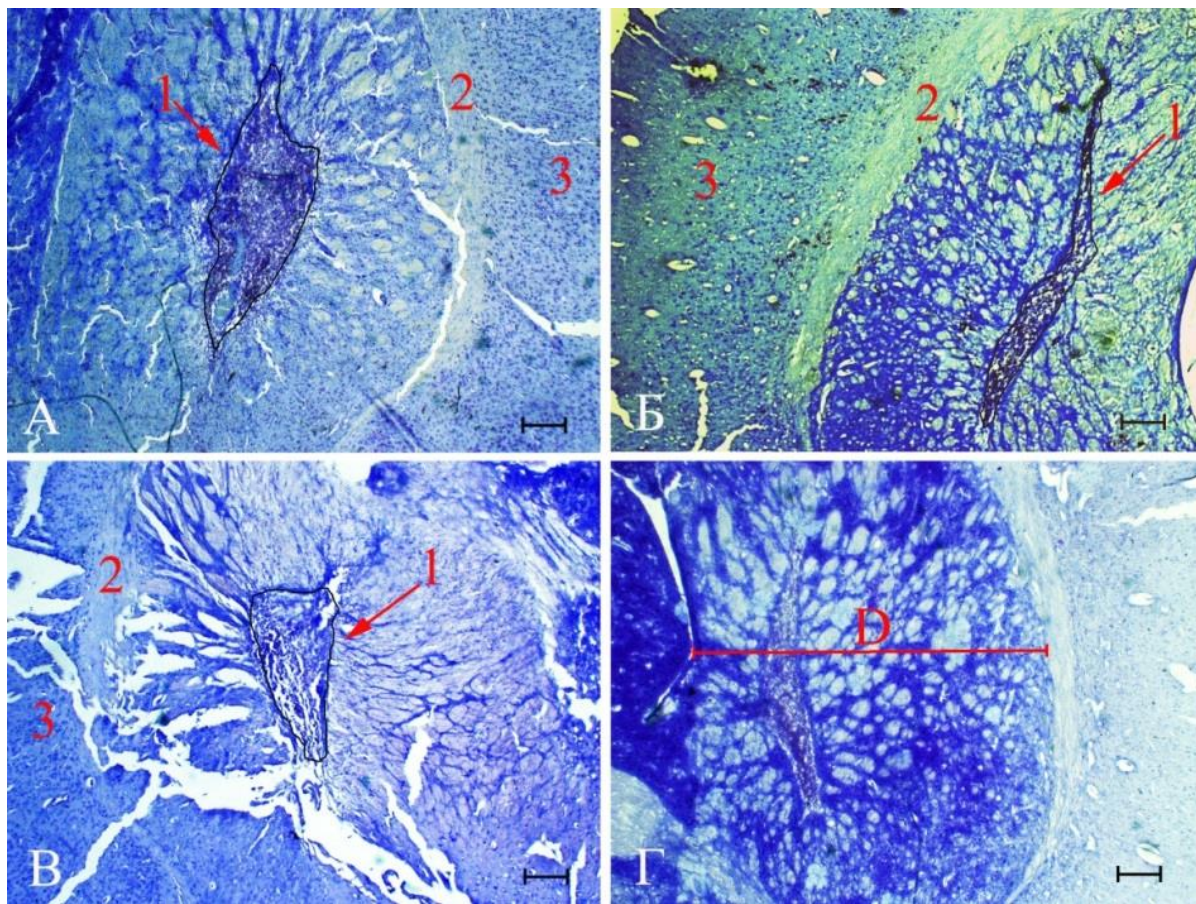


Рис. 4. Микрофотографии глиальных рубцов ткани стриатума у крыс на 42 день после ИК. А – введение DMEM/F12; Б – трансплантация АНК; В – трансплантация АНК с МСК. 1 – глиальный рубец (выделен черной линией); 2 – мозолистое тело; 3 – кора больших полушарий. Г – диаметр стриатума. Масштабный отрезок на А, Б, В, Г – 200 мкм.

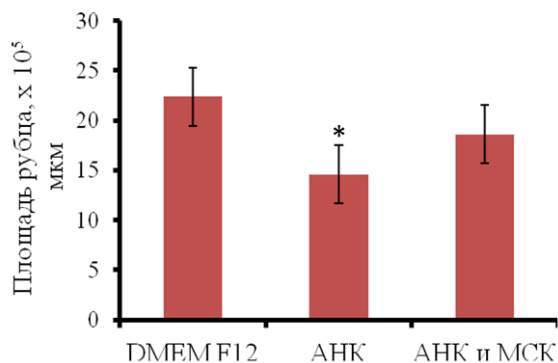


Рис. 5. Средняя площадь глиального рубца в стриатуме крыс на 42 день после ИК. Примечание. \* P < 0,05;

Такие изменения свидетельствуют о меньшей потере ткани стриатума, что, возможно, происходит за счет более интенсивных регенеративных процессов у крыс 1-й опытной группы по сравнению с контрольными животными. Кроме того отмечалась также тенденция к увеличению данного показателя во 2-й группе животных (рис. 6).

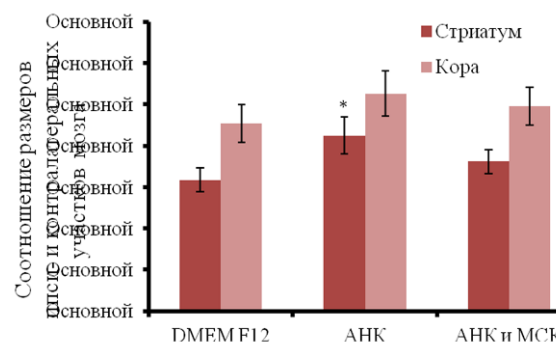


Рис. 6. Оценка влияния трансплантации криоконсервированных АНК и АНК в комбинации с МСК на соотношение средних диаметров стриатума и коры обоих полушарий крыс исследуемых групп.

Примечание. \* P < 0,05

При определении соотношения между толщиной коры пораженного и здорового полушарий было выявлено тенденцию к увеличению этого показателя у животных 1-й опытной группы по сравнению с контрольными (рис. 6). Это, возможно, свидетельствует об участии коры мозга в компенсаторных процессах.

## Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что трансплантация АНК в комбинации с МСК является более эффективной для снижения воспаления при ИК, в то время как введение АНК без МСК явилось более эффективным в долгосрочной перспективе.

## Перспективы дальнейших исследований

Исходя из полученных данных, для повышения терапевтического эффекта целесообразно проводить многократную трансплантацию: вначале АНК в комбинации с МСК для минимизации воспалительного процесса, а затем, не менее, чем через 6 суток – АНК без МСК.

## Литературные источники References

1. Elliott J, Martin S. The acute management of intracerebral hemorrhage: a clinical review. *International Anesthesia Research Society*. 2010;110(5):1419-27. doi:10.1213/ANE.0b013e3181d568c8.
2. Petrenko AYU, Hunov EN, authors; Ivanov EM, editor. *Stvolovye kletki. Svoistva i perspektivy klinicheskogo primeneniya*. [The properties and perspectives of the stem cell's clinical use]. Lugansk: Press-ekspress; 2011. 365 p. Russian.
3. Cordeiro MF, Horn AP. Stem cell therapy in intracerebral hemorrhage rat model. *World J Stem Cells*. 2015;7(3):618–29.
4. Detante O, Jaillard A, Moisan A, Favre MA. Bioterapias in stroke. *Revue Neurologique*. 2014;170:779–98.
5. Hosseini S, Samimi N, Farahmandinia M, Shakibajahromi B, Sarvestani FS, Sani M. The preventive effects of neural stem cells and mesenchymal stem cells intra-ventricular injection on brain stroke in rats. *N Am J Med Sci*. 2015;7(9):390-6.
6. Sukach AN, Lebedinsky AS, Otchenashko OV, Petrenko AYU. [Rat fetal cryopreserved neural cells transplantation consisting of aggregate suspension into rats with spinal cord lesion]. *Klitynna ta organa transplantologia*. 2016;4(1):253-5. Russian.
7. Emmerta MY, Hitchcock RW, Hoerstrup SP. Cell therapy, 3D culture systems and tissue engineering for cardiac regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014;69-70:254-69.
8. Sang YaH, Liang YuX, Liu LG, Ellis- Behnke RG, Wu WT, So KF, Cheung TF. A rat model of intracerebral hemorrhage permitting hematoma aspiration plus intralesional injection. *Exp Anim*. 2013;62(1):63–9.
9. Petrenko AYU, Sukach AN. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration. *Analytical Biochem*. 1991;194(2):326-9.
10. Ben-Hur T, Idelson M, Khaner H. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neuronal progenitors improves behavioral deficit in parkinsonian rats. *Stem Cells*. 2004;22:1246–55.
11. Fukunaga A, Uchida K, Hara K. Differentiation and angiogenesis of central nervous system stem cells implanted with mesenchyme into ischemic rat brain. *Cell Transplantation*. 1999;8:435–41.
12. Jeong SW, Chu K, Jung KH. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2003;34:2258–63.
13. Pagram H, Bivard A, Lincz LF, Levi C. Immunity and stroke, the hurdles of stroke research translation. *International Journal of Stroke*. 2017;12(2):123-31. doi:10.1177/1747493016676622.
14. Beray-Berthat V, Delifer C, Besson VC, Girgis H, Coqueran B, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Margail I. Long-term histological and behavioral characterization of a collagenase-induced model of intracerebral haemorrhage in rats. *J Neurosci Methods*. 2010;191:180–90.

**Золотько К.Н., Сукач А.Н. Исследование эффективности трансплантации криоконсервированных агрегатов нейральных клеток отдельно и совместно с мезенхимальными стволовыми клетками для лечения интрацеребрального кровоизлияния у крыс.**

**РЕФЕРАТ.** Интрацеребральное кровоизлияние сопровождается тяжелыми осложнениями и высокой смертностью. Эффективных методов лечения этого заболевания в настоящее время не существует. **Цель работы:** изучение терапевтической эффективности трансплантации криоконсервированных нейральных клеток в составе трехмерных агрегатов в комбинации с мезенхимальными стволовыми клетками на течение патологического процесса у крыс после интрацеребрального кровоизлияния. **Методы.** Выделение и культивирование клеток, криоконсервирование, стереотаксис, трансплантация, морфометрия. Экспериментальным животным вводили агрегаты нейральных клеток, и агрегаты совместно с мезенхимальными стволовыми клетками. Контрольным животным вводили среду DMEM/F12. Установлено, что внутрижелудочковое введение криоконсервированных агрегатов нейральных клеток совместно с мезенхимальными стволовыми клетками крысам с интрацеребральным кровоизлиянием достоверно уменьшает количество лейкоцитов, начиная с 6 суток после трансплантации по сравнению с контрольными животными. В той же опытной группе на 1 сутки после трансплантации относительное количество нейтрофилов досто-

верно уменьшалось на 23,9%, а относительное количество лимфоцитов увеличивалось на 25,6% по сравнению с контролем. После трансплантации агрегатов нейральных клеток площадь глиальных рубцов уменьшилась на 34,9% по сравнению с контролем, а соотношения диаметров поврежденного стриатума к здоровому увеличилось на 33,9%. Результаты исследования свидетельствуют о том, что трансплантация агрегатов нейральных клеток совместно с мезенхимальными стволовыми клетками более эффективна для снижения воспаления при интрацеребральном кровоизлиянии, в то время как введение только агрегатов нейральных клеток более эффективно в долгосрочной перспективе.

**Ключевые слова:** интрацеребральное кровоизлияние, крысы, агрегаты нейральных клеток, мезенхимальные стволовые клетки, клеточная терапия, лейкоциты, морфометрия.

**Золотько К.М., Сукач О.М. Дослідження ефективності трансплантації кріоконсервованих агрегатів нейтральних клітин окремо і спільно з мезенхімальними стовбуровими клітинами для лікування інтрацеребрального крововиливу у щурів.**

**РЕФЕРАТ.** Интрацеребральный крововилив супроводжується важкими ускладненнями і високою смертністю. Ефективних методів лікування цього захворювання на даний час не існує. **Мета** роботи: вивчення терапевтичної ефективності трансплантації кріоконсервованих нейральних клітин в складі тривимірних агрегатів в комбінації з мезенхімальними стовбуровими клітинами на перебіг патологічного процесу у щурів після інтрацеребрального крововиливу. **Методи:** виділення і культивування клітин, кріоконсервування, стереотаксис, трансплантація, морфометрія. Експериментальним тваринам вводили агрегати нейральних клітин, і агрегати спільно з мезенхімальними стовбуровими клітинами. Контрольним тваринам вводили середу DMEM/F12. **Результати.** Встановлено, що внутрішньошлуночкове введення кріоконсервованих агрегатів нейральних клітин спільно з мезенхімальними стовбуровими клітинами щурам з інтрацеребральним крововиливом вірогідно зменшує кількість лейкоцитів, починаючи з 6 доби після трансплантації, в порівнянні з контрольними тваринами. У тій же дослідній групі на 1 добу після трансплантації відносна кількість нейтрофілів достовірно зменшувалася на 23,9%, а відносна кількість лімфоцитів збільшувалась на 25,6% в порівнянні з контролем. Після трансплантації агрегатів нейральних клітин площа гліальних рубців зменшилася на 34,9% у порівнянні з контролем, а співвідношення діаметрів пошкодженого смугастого тіла до здорового збільшилося на 33,9%. Результати проведеного дослідження свідчать про те, що трансплантація агрегатів нейральних клітин спільно з мезенхімальними стовбуровими клітинами більш ефективна для зниження запалення при інтрацеребральному крововиливі, в той час як введення одних лише агрегатів нейральних клітин більш ефективно у довгостроковій перспективі.

**Ключові слова:** інтрацеребральний крововилив, щури, агрегати нейральних клітин, мезенхімальні стовбурові клітини, клітинна терапія, лейкоцити, морфометрія.