

**ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЦУПИКОВ ОЛЕГ МИХАЙЛОВИЧ

УДК 616-089.843:591.398:611.018.82:616-089.811

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПРОЦЕСИ
РЕГЕНЕРАЦІЇ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО
УШКОДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ**

14.03.04 – патологічна фізіологія
22 – охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____ О. М. Цупиков

Науковий консультант: Скибо Галина Григорівна,
доктор медичних наук,
професор

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Цуриков О. М. Вплив трансплантації стовбурових клітин на процеси регенерації нервової тканини після ішемічного ушкодження головного мозку. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.04 «Патологічна фізіологія» (222 – Медицина). – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2018.

У дисертаційній роботі представлені результати морфофункціональних досліджень впливу трансплантації стовбурових клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини головного мозку та поведінкові феномени на різних моделях ішемічного ушкодження головного мозку як у дорослих, так і у новонароджених тварин.

У роботі були використані експериментальні моделі ішемічного ушкодження головного мозку: глобальна короткотривала ішемія, фокальна, гіпоксично-ішемічне ушкодження головного мозку новонароджених щурів, *in vivo* модель перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ). Була створена *in vitro* модель ПВЛ з використанням органотипової культури зрізів головного мозку 7-денних мишей лінії FVB.

Для дослідження впливу трансплантації стовбурових клітин на процеси регенерації нервової тканини після ішемічного ушкодження головного мозку були використані клітини різного генезу: нейральні прогеніторні клітини (НПК), мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК), індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК) людини.

Для надекспресії НПК фактора росту фібробластів-2 (FGF-2) або індуктора екстрацелюлярних матричних металопротеїназ (EMMPRIN) використовували трансфекцію культури клітин лентивірусними векторами.

Для морфологічної характеристики нервової тканини були застосовані методи імуноцитохімії на світловому та електронно-мікроскопічному рівнях.

Дослідження поведінкових реакцій тварин здійснювали з використанням таких тестів: "водний лабіринт Морріса" (оцінка просторової пам'яті) і тест "діставання і виймання їжі" (оцінка кортикоспинальної функції). Отримані результати були оброблені методами варіаційної статистики. Різницю між показниками визначали за допомогою *t*-тесту Стюдента (різниця вважалась достовірною при $P < 0,05$).

Продемонстровано, що трансплантовані фетальні GFP-позитивні НПК здатні мігрувати в ушкоджені ділянки зони CA1 гіпокампа, диференціюватися як в астроцити, так і в зрілі нейрони, які утворюють синаптичні контакти з нейронами реципієнта. Показано, що ішемічне ушкодження гіпокампа викликає порушення когнітивних функцій (просторової пам'яті), а трансплантація НПК сприяє відновленню просторової пам'яті у тварин після ішемічного ушкодження мозку.

На *in vivo* моделі перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) продемонстровано, що трансплантація ММСК сприяє відновленню кортикоспинальної функції у тварин після ПВЛ, зменшує деградацію основного білка мієліну та гальмує розвиток астро- та мікрогліозу.

Для з'ясування патогенетичних механізмів ПВЛ, а також для дослідження шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології створено нову експериментальну *in vitro* модель цієї патології на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

На створеній нами *in vitro* моделі ПВЛ уперше показано, що ММСК в умовах їх безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку мають нейропротекторний вплив на нервову тканину, зменшуючи реактивний астро- та мікрогліоз та збільшуючи кількість Рір-імунопозитивних олігодендроцитів.

Уперше показано, що трансформації НПК у напрямку надекспресії FGF-2 сприяє їх тісному контакту з судинною мережею та формуванню навколосудинних BrdU-позитивних спіралеподібних проліферативних кластерів та утворенню пулу незрілих DCX-позитивних нейронів у відповідь на ішемічне ушкодження мозку.

Уперше продемонстровано, що НПК, які надекспресують EMMPRIN, мігрують у пошкоджену соматосенсорну кору далі порівняно із контрольними НПК та утворюють популяцію нейральних прогеніторів у пошкодженій ділянці кори.

З використанням імуно-електронно-мікроскопічного аналізу вперше показано, що GFP-негативні аксони реципієнта формують синаптичні контакти на GFP-позитивних трансплантованих нейронах, утворених з іПСК людини, і більшість з цих контактів мають ультраструктурні характеристики збуджувальних глутаматергічних синапсів. Уперше продемонстровано, що трансплантовані нейрони, утворені з іПСК людини, які були локалізовані в соматосенсорній корі поруч із зоною ішемічного пошкодження, отримують прямі синаптичні входи від значної кількості нейронів з іпси- та контралатеральної кори і різних ядер таламуса. Було виявлено, що трансплантовані нейрони отримують аферентні входи з тих же ділянок, що й ендогенні нейрони з тією ж локалізацією в інтактному мозку.

Результати дослідження мають передусім фундаментальне значення, оскільки помітно розширюють існуючі уявлення про клітинні механізми нейропротекторної дії трансплантованих стовбурових клітин

при ішемічних ушкодженнях головного мозку та особливості поведінки цих клітин в організмі.

Використання GFP-мічених трансплантованих клітин дає можливість тривало простежувати їх міграцію, інтеграцію та диференціювання в тканинах реципієнта.

Практичне значення отриманих результатів полягає в знаходженні нових підходів для лікування ішемічних уражень головного мозку та обґрунтуванні застосування методів клітинної терапії із використання стовбурових клітин при цій патології.

Розроблену у дисертаційній роботі нову експериментальну *in vitro* модель перивентрикулярної лейкомаляції, яка є однією з причин розвитку дитячого церебрального паралічу, можна використовувати під час дослідження патогенетичних механізмів розвитку ПВЛ, а також шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології, зокрема перспективних фармакологічних агентів та трансплантації стовбурових клітин.

Отримані дані дають нове розуміння взаємозв'язку між трансплантованими НПК, що надекспресують FGF-2, та судинами реципієнта. Створення штучної ектопічної нейрогенної ніші має практичне значення для подолання низького регенеративного потенціалу кори головного мозку завдяки підтримці міграційного та проліферативного стану НПК і за рахунок збільшення пулу незрілих нейронів, необхідних для регенерації мозку.

Перспективним джерелом донорського матеріалу при аутологічній трансплантації є індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК). Було продемонстровано значний потенціал цих НПК у відновленні пошкодженої ділянки соматосенсорної кори після ішемічного ушкодження, що може стати майбутнім перспективним терапевтичним підходом у лікуванні наслідків ішемічного інсульту.

Результати дисертаційної роботи впроваджені в матеріали науково-методичних рекомендацій кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця та Центру молекулярних і клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могилянська академія».

Ключові слова: стовбурові клітини, трансплантація, ішемія, регенерація, FGF-2, EMMPRIN, електронна мікроскопія, поведінкові розлади.

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Поддубна АО, Цупиков ОМ, Петренко ОЮ, Оченашко ОВ, Півнева ТА, Скібо ГГ. Реакція гліальних клітин гіпокампа на нейротрансплантацію при експериментальній ішемії мозку. Здоб клін експ мед. 2007; 2:121–4. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).*
2. Jenny B, Kanemitsu M, Tsupykov O, Potter G, Salmon P, Zraggen E, Gascon E, Skibo G, Dayer A, Kiss J. FGF-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential. Stem cells. 2009;27(6):1309–17. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
3. Tsupykov OM, Pivneva TA, Poddubna AO, Kyryk VM, Kuchuk OV, Butenko GM, Skibo GG. Migration and differentiation of fetal neural progenitor cells in the brain of ischemic animals. Int J Phys Pathophysiol. 2010;1(1):25–35. *(Особисто дисертантом проведені*

- експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
4. Кучук ОВ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ. Культивирование и направленная остеогенная дифференцировка мультипотентных стромальных клеток костного мозга в культуре микромассы. Пробл остеолог. 2010;13(4):36–41. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*
 5. Garashchuk OV, Tsupykov OM, Tsymbaliuk VI. Impact of late transplantation of fetal neural tissue on hippocampal cytoarchitectonics in remote period after transient global cerebral ischemia in rats. Int J Phys Pathophysiol. 2012;3(1):39–52. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*
 6. Tsupykov OM, Poddubnaya AO, Smozhanyk KG, Kyryk VM, Kuchuk OV, Butenko GM, Semenova EA, Pivneva TA, Skibo GG. Integration of grafted neural progenitor cells in host hippocampal circuitry after ischemic injury. Neurofiziologiya. 2011;43(4):372–5. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
 7. Tsupykov O, Kyryk V, Smozhanik E, Rybachuk O, Butenko G, Pivneva T, Skibo G. Long-term fate of grafted hippocampal neural progenitor cells following ischemic injury. J Neurosci Res. 2014;92(8):964–74. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
 8. Tsupykov OM. A protocol for isolation of fetal neural progenitor cells from mouse hippocampus. Cell Organ Transplant. 2014;2(2):155–7.

- (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
9. Tsupykov OM, Kyryk VM, Ustymenko AM, Yatsenko KV, Butenko GM, Skibo GG. Effect of transplantation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia. *Cell Organ Transplant.* 2015;3(1):68–73. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
 10. Tsupykov O. Neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Cell Organ Transplant.* 2015;3(2):190–4. *(Особисто дисертантом проведені дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
 11. Tsupykov O. Ultrastructural analysis of murine hippocampal neural progenitor cells in culture. *Microsc Res Tech.* 2015;78(2):128–133. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
 12. Tsupykov O, Kanemitsu M, Smozhanik E, Skibo G, Dayer A, Kiss JZ. Relationship of grafted FGF-2 overexpressing neural stem/progenitor cells with the vasculature in the cerebral cortex. *Cell Transplant.* 2016;25(7):1359–69. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
 13. Tsupykov O, Ustymenko A, Kyryk V, Smozhanik E, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. Ultrastructural study of mouse adipose-derived stromal cells induced towards osteogenic direction. *Microsc Res Tech.* 2016;79(6):557–64. *(Особисто дисертантом проведені*

- експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
14. Tsupykov OM, Lushnikova IV, Nikandrova YA, Yatsenko KV, Ustymenko AM, Kyryk VM, Butenko GM, Skibo GG. A novel model of periventricular leukomalacia on mouse organotypic brain slice culture. *Cell Organ Transplant*. 2016;4(2):188–193. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*
 15. Tornero D, Tsupykov O, Granmo M, Rodriguez C, Grønning-Hansen M, Thelin J, Smozhanik E, Laterza C, Wattananit S, Ge R, Tatarishvili J, Grealish S, Brüstle O, Skibo G, Parmar M, Schouenborg J, Lindvall O, Kokaia Z. Synaptic inputs from stroke-injured brain to grafted human stem cell-derived neurons activated by sensory stimuli. *Brain*. 2017;140(3):692–706. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*
 16. Tsupykov OM, Lushnikova IV, Ustymenko AM, Kyryk VM, Nikandrova YA, Patseva MA, Yatsenko KV, Butenko GM, Skibo GG. Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model in vitro. *Cell Organ Transplant*. 2017;5(1):28–32. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
 17. Цупиков О, Кирик В, Яценко К, Бутенко Г, Скибо Г. Вплив трансплантованих нейральних прогеніторів на проліферацію клітин гіпокампа після ішемічного ушкодження мозку. *ScienceRise. Medical Science*. 2017;14(6):32–6. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*

18. Kanemitsu M, Tsupuykov O, Potter G, Boitard M, Salmon P, Zraggen E, Gascon E, Skibo G, Dayer AG, Kiss JZ. EMMPRIN overexpression in SVZ neural progenitor cells increases their migration towards ischemic cortex. *Exp Neurol.* 2017;297:14–24. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
19. Цупиков О, Кирик В, Бутенко Г, Скибо Г. Стимуляція ендогенного нейрогенеза в гіпокампі після ішемічного пошкодження мозку з допомогою екзогенних нейральних прогеніторів. *Неврол Нейрохірург Вост Європа.* 2017;7(3):457–63. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
20. Цупиков О, Кирик В, Яценко К, Бутенко Г, Скибо Г. Ефективність використання зеленого флуоресцентного білка як маркера для ідентифікації трансплантованих нейральних прогеніторних клітин у нервовій тканині мишей. *Укр неврол жур.* 2017;44(3):51–7. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
21. Tsupuykov O, Lushnikova I, Ustymenko A, Kyryk V, Nikandrova Y, Patseva M, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. The effects of multipotent mesenchymal stromal cells on mouse brain slices at their co-culture in an in vitro model of periventricular leukomalacia. *Фізіол журн.* 2017;63(5):3–12. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ:

22. Poddubnaya A, Tsupukov O, Pivneva T. Neurotransplantation ameliorates hippocampal cells structure after ischemic injury. The 44th International Conference of the Slovak Anatomical Society «Morphology 2007», Bratislava. Acta histochem. 2009;111:456. *Публікація тез.*
23. Цупиков ОМ, Поддубна АО, Півнева ТА, Скибо ГГ. Вплив нейротрансплантації на стан гліальних клітин гіпокампа після ішемії-реперфузії мозку. Наук конф з міжн участю «Високогірна гіпоксія і геном», Терскол. Фізіол жур. 2008;54(4):93. *Публікація тез.*
24. Tsupukov O, Poddubna A, Kyryk V, Kuchuk O, Butenko G, Skibo G, Pivneva T. The fate of neural progenitor cells after transplantation into ischemic brain. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease Glia, Paris. Glia. 2009;57(S13):74. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
25. Tsupukov O, Poddubna A, Ochenashko O, Petrenko A, Kyryk V, Kuchuk O, Butenko G, Skibo G, Pivneva T. Grafting of fetal neural progenitor cells into the adult ischemic brain. 7th FENS Forum, Amsterdam. FENS Abstr book. 2010;5:016.31. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
26. Лабунець ІФ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ, Кучук ОВ, Півнева ТА, Скибо ГГ, Бутенко ГМ. Вплив нейротрансплантації на функціональну активність епіфіза та тимуса при ішемічному пошкодженні головного мозку. Наук практ конф з міжн участю «Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи», Київ. Журн Акад мед наук України. 2010;16:100–1. *Публікація тез.*
27. Васильєв РГ, Кучук ОВ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ. Перспективи застосування в регенеративній медицині тривимірних

- трансплантатів, заселених мультипотентними стромальними клітинами кісткового мозку. Матеріали конференції «Актуальні питання геронтології та геріатрії», Київ. 2011:8–9. *Публікація тез.*
28. Tsuprykov O, Pivneva T, Poddubna A, Kyryk V, Kuchuk O, Skibo G. Hippocampal-derived neural progenitor cells establish synaptic junctions after grafting into the adult ischemic brain. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence. 2011: D141. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
 29. Скибо ГГ, Никоненко ИР, Коваленко ТН, Осадченко ИА, Лушникова ИВ, Пивнева ТА, Цупиков ОМ, Пацева МА, Сможаник ЕГ, Никоненко АГ. Синаптическая пластичность мезга. Научные труды III съезда физиологов СНГ, Ялта. 2011:50–1. *Публікація тез.*
 30. Tsuprykov O, Poddubna A, Smozhanyk E, Kyryk V, Kuchuk O, Pivneva T, Skibo G, Butenko G. The grafted fetal neural progenitor cells can integrate in the adult hippocampal tissue after ischemic injury. Abstracts of the World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig. 2011:163. *Публікація тез.*
 31. Tsuprykov O, Kanemitsu M, Pivneva T, Skibo G, Dayer AG, Kiss JZ. Ectopic niche formation by grafted FGF-2 overexpressing neural stem/progenitors in the cerebral cortex. Abstracts of the SFN, Washington. 2011;129.05/A18:20. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
 32. Tsuprykov O, Smozhanik E, Rybachuk O, Kyryk V, Kuchuk O, Patseva M, Butenko G, Skibo G, Pivneva T. Synapse formation between the grafted neural progenitor cells and host hippocampal neurons after ischemic injury. 8 th FENS meeting, Barselona. FENS Forum Programme Book. 2012:300. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
 33. Цупиков О.М. Экспериментальные подходы к изучению терапевтического потенциала стволовых клеток при перинатальной

- патології ЦНС. Збірник тез наук практ конф з міжнар участю «Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неонатології та дитячій неврології», Київ. 2013:29. *Публікація тез, доповідь.*
- 34.Цупиков ОМ, Кирик ВМ, Мамчур АА, Устименко АМ, Яценко КВ, Бутенко ГМ, Скибо ГГ. Трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини при перинатальній патології ЦНС. Збірник тез наук практ конф з міжнар участю «Трансплантація – сьогодення, минуле та майбутнє», Київ. 2014:37. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
- 35.Tsupykov O, Kyryk V, Pivneva T, Butenko G, Skibo G. Neural stem cells transplantation promote the spatial learning recovery after ischemic brain injury. 1st International Symposium on Mechanisms Underlying Memory Storage and Pathological Learning, Montpellier. Abstract book. 2015:29. *Публікація тез.*

SUMMARY

Tsupykov O. M. Effect of stem cell transplantation on the processes of nervous tissue regeneration after ischemic brain injury. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Dissertation for the degree of Doctor of medical sciences, specialty 14.03.04 "Pathological physiology" (222 - Medicine). – Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2018.

The dissertation presents the results of morphofunctional studies of the stem cells transplantation on the regeneration of nervous tissue and behavioral phenomena on different models of cerebral ischemic injury in both adults and newborns.

The following experimental models of ischemic brain injury were used in this work: global short-term ischemia, focal ischemia, hypoxic-ischemic

brain injury of newborn rats, *in vivo* model of periventricular leukomalacia (PVL). An *in vitro* PVL model was developed using an organotypic culture of brain slices of 7-day-old mice.

Different cell types were used to investigate the effect of stem cell transplantation on the processes of regeneration of the nervous tissue after ischemic brain injury: neural progenitor cells (NPCs), multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs), human induced pluripotent stem cells (iPSCs).

The NPCs were transfected with lentiviral vectors for overexpression of the fibroblast growth factor-2 (FGF-2) or the inducer of extracellular matrix metalloproteinase (EMMPRIN).

The methods of immunocyto- and histochemistry at the light and electron microscopic levels were used for the morphological characteristics of the nerve tissue.

The study of animal behavioral reactions was carried out using the following tests: "Morris water maze" (spatial memory estimation) and "the reaching and retrieving food" test (estimation of corticospinal function). The results were analyzed for statistical significance using Student's t-test (results were considered significant when $P < 0.05$).

It has been shown that transplanted fetal GFP-positive neural progenitor cells (NPCs) able to migrate to damaged region of the CA1 hippocampal area, to differentiate both in astrocytes and in mature neurons that form synaptic contacts with host neurons. We demonstrated that global short-term cerebral ischemia resulted into cognitive impairments in mice. Stereotaxic transplantation of NPCs promoted the cognitive function recovery in experimental animals after ischemic brain injury.

On *in vivo* model of periventricular leukomalacia (PVL) we demonstrated that MMSC transplantation contributes to the restoration of corticospinal function in animals after PVL, reduces the degradation of the main protein of myelin and inhibits the development of astro- and microgliosis.

To find out the pathogenetic mechanisms of PVL, as well as to study the pathways of neuroprotection of the brain at this pathology, a new experimental *in vitro* model of PVL has been developed on an organotypic culture of murine brain slices.

For the first time, on the developed *in vitro* model of periventricular leukomalacia (PVLmiv) we showed that the presence of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) in the non-contact co-culture of brain slices diminished PVLmiv effects improving cell viability, preventing degradation of oligodendocytes and extensive astro- and microgliosis in brain slices. Our data suggest that protective capacity of MMSCs can be executed distantly most likely via released biomodulatory compounds.

For the first time, we showed that FGF-2-transduced progenitors grafted in the early postnatal rat cortex have the distinct tendency to associate with the vasculature, establish perivascular BrdU-positive spiral-like proliferative clusters and the formation of a pool of immature DCX-positive neurons in response to ischemic injury in the brain.

For the first time, we showed that extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) overexpressing SVZ cells invade tissue more efficiently than controls and form a population of neural progenitors in the injured cortex.

Using the immunoelectron microscopy, we demonstrate that the grafted GFP-positive neurons receive direct GFP-negative synaptic inputs from neurons in different host brain areas located in a pattern similar to that of neurons projecting to the corresponding endogenous cortical neurons in the intact brain.

The results of this study have fundamental importance since they significantly expand the existing knowledge of cellular mechanisms of neuroprotective action of transplanted stem cells during ischemic brain damage and peculiarities of the behavior of these cells in the body.

The use of GFP-labelled transplanted cells allows us to track their migration, integration and differentiation in recipient tissues.

Practical importance of obtained results is to find new approaches for the treatment of ischemic brain injury and justification for stem cells use in stem cell therapy treatments of neurological disorders. The developed experimental *in vitro* model of periventricular leukomalacia, that is the predominant form of brain injury and the leading known cause of cerebral palsy, can be used for the study of pathogenetic mechanisms of PVL development, as well as for searching for a new strategy to protect the brain at this pathology.

Our data provide evidence that engineering neural progenitors to overexpress FGF-2 may be a suitable strategy to improve the integration of grafted neural progenitor cells with the host vasculature thereby generating neurovascular clusters with a neurogenic potential for brain repair.

The present study demonstrates, for the first time, that the host brain regulates the activity of grafted neurons, providing strong evidence that transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons can become incorporated into injured cortical circuitry. Our findings support the idea that these neurons could contribute to functional recovery in stroke and other conditions causing neuronal loss in cerebral cortex.

The results of the dissertation were introduced into the materials of the scientific and methodological recommendations of the Department of Histology and Embryology of the Bogomolets National Medical University and Center of Molecular and Cell research of National University of Kyiv-Mohyla Academy.

Keywords: stem cells, transplantation, ischemia, regeneration, FGF-2, EMMPRIN, electron microscopy, behavioral disorders.

SCIENTIFIC PAPERS TO PUBLISH MAJOR SCIENTIFIC RESULTS OF THIS THESIS PAPER:

1. Poddubna AO, Tsupikov OM, Petrenko OYu, Ochenashko OV, Pivneva TA, Skibo GG. *Reaktsiya glialnyh klityn hipokampa na nejrotransplantatsiyu pry eksperymentalnij ishemii mozku* [The reaction of hippocampal glial cells on neurotransplantation after experimental brain injury]. *Achiev Clin Exp Med*. 2007;2:121–4.
2. Jenny B, Kanemitsu M, Tsupikov O, Potter G, Salmon P, Zraggen E, et al. FGF-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential. *Stem cells*. 2009;27(6):1309–17.
3. Tsupikov OM, Pivneva TA, Poddubna AO, Kyryk VM, Kuchuk OV, Butenko GM, et al. Migration and differentiation of fetal neural progenitor cells in the brain of ischemic animals. *Int J Phys Pathophysiol*. 2010;1(1):25–35.
4. Kuchuk OV, Tsupikov OM, Kyryk VM. *Kultivirovanie i napravlennaya osteogennaya differentsirovka multipotentnyh stromalnyh kletok kostnogo mozga v kulture mikromassy* [Cultivation and directed osteogenic differentiation of bone marrow-derived multipotent stromal cells in a micromass culture]. *Probl osteol*. 2010;13(4):36–41.
5. Garashchuk OV, Tsupikov OM, Tsymbaliuk VI. Impact of late transplantation of fetal neural tissue on hippocampal cytoarchitectonics in remote period after transient global cerebral ischemia in rats. *Int J Phys Pathophysiol*. 2012;3(1):39–52.
6. Tsupikov OM, Poddubnaya AO, Smozhanyk KG, Kyryk VM, Kuchuk OV, Butenko GM, et al. Integration of grafted neural progenitor cells in host hippocampal circuitry after ischemic injury. *Neirofiziologiya*. 2011;43(4):372–5.

7. Tsupykov O, Kyryk V, Smozhanik E, Rybachuk O, Butenko G, Pivneva T, et al. Long-term fate of grafted hippocampal neural progenitor cells following ischemic injury. *J Neurosci Res*. 2014;92(8):964–74.
8. Tsupykov OM. A protocol for isolation of fetal neural progenitor cells from mouse hippocampus. *Cell Organ Transplant*. 2014;2(2):155–7.
9. Tsupykov OM, Kyryk VM, Ustymenko AM, Yatsenko KV, Butenko GM, Skybo GG. Effect of transplantation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia. *Cell Organ Transplant*. 2015;3(1):68–73.
10. Tsupykov O. Neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Cell Organ Transplant*. 2015;3(2):190–4.
11. Tsupykov O. Ultrastructural analysis of murine hippocampal neural progenitor cells in culture. *Microsc Res Tech*. 2015;78(2):128–133.
12. Tsupykov O, Kanemitsu M, Smozhanik E, Skibo G, Dayer A, Kiss JZ. Relationship of grafted FGF-2 overexpressing neural stem/progenitor cells with the vasculature in the cerebral cortex. *Cell Transplant*. 2016;25(7):1359–69.
13. Tsupykov O, Ustymenko A, Kyryk V, Smozhanik E, Yatsenko K, Butenko G, et al. Ultrastructural study of mouse adipose-derived stromal cells induced towards osteogenic direction. *Microsc Res Tech*. 2016;79(6):557–64.
14. Tsupykov OM, Lushnikova IV, Nikandrova YA, Yatsenko KV, Ustymenko AM, Kyryk VM, et al. A novel model of periventricular leukomalacia on mouse organotypic brain slice culture. *Cell Organ Transplant*. 2016;4(2):188–193.
15. Tornero D, Tsupykov O, Granmo M, Rodriguez C, Grønning-Hansen M, Thelin J, et al. Synaptic inputs from stroke-injured brain to grafted human

- stem cell-derived neurons activated by sensory stimuli. *Brain*. 2017;140(3):692–706.
16. Tsupykov OM, Lushnikova IV, Ustymenko AM, Kyryk VM, Nikandrova YA, Patseva MA, et al. Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model *in vitro*. *Cell Organ Transplant*. 2017;5(1):28–32.
 17. Tsupykov O, Kyryk V, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. *Vplyv transplantovanyh nejralnyh progenitoriv na proliferatsiyu klityn hipokampa pislya ishemichnogo ushkodzhennya mozku* [Influence of transplanted neural progenitors on proliferation of hippocampal cells after ischemic brain injury]. *ScienceRise. Medical Science*. 2017;14(6):32–6.
 18. Kanemitsu M, Tsupykov O, Potter G, Boitard M, Salmon P, Zraggen E, et al. EMMPRIN overexpression in SVZ neural progenitor cells increases their migration towards ischemic cortex. *Exp Neurol*. 2017;297:14–24.
 19. Tsupykov O, Kyryk V, Butenko G, Skibo G. *Stymulyatsiya endogennoho neurogeneza v hipokampe posle ishemicheskogo povrezhdeniya mozga s pomoshchyu ekzogennyh neuralnyh progenitorov* [Stimulation of endogenous neurogenesis in the hippocampus after ischemic brain injury using exogenous neural progenitors], *Neurology and neurosurgery. The Eastern Europe*. 2017;7(3):457–63.
 20. Tsupykov O, Kyryk V, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. *Efektivnist vykorystannya zelenogo fluorestscentnogo bilka yak markera dlya identyfikatsii transplantovannyh neuralnyh progenitornyh klityn u nervovij tkanyini myhsej* [The efficiency of using green fluorescent protein as a marker for the identification of transplanted neural progenitor cells in mice nervous tissue]. *Ukr Neurol J*. 2017;44(3): 51–7.
 21. Tsupykov O, Lushnikova I, Ustymenko A, Kyryk V, Nikandrova Y, Patseva M, et al. The effects of multipotent mesenchymal stromal cells on

mouse brain slices at their co-culture in an *in vitro* model of periventricular leukomalacia. Fiziol Zh. 2017;63(5):3–12.

SCIENTIFIC PAPERS PROVING THIS THESIS PAPER MATERIALS VALIDATION:

22. Poddubnaya A, Tsupikov O, Pivneva T. Neurotransplantation ameliorates hippocampal cells structure after ischemic injury. The 44th International Conference of the Slovak Anatomical Society «Morphology 2007», Bratislava. Acta histochem. 2009;111:456.
23. Tsupikov OM, Poddubna AO, Pivneva TA, Skibo GG. *Vplyv neurotransplantatsii na stan glialnyh klityn hipokampa pislya ishemii-reperfuzii* [The effect of neurotransplantation on the hippocampal glial cells after ischemia-reperfusion brain injury] Materialy mizhnar nauk.-prakt. konf. [Proceedings of International Scientific Practical Conference] Vysokogirna hypoksiya i genom [High-altitude hypoxia and genome], Terskol, Fiziol Zhur. 2008;54(4):93.
24. Tsupikov O, Poddubna A, Kyryk V, Kuchuk O, Butenko G, Skibo G, et al. The fate of neural progenitor cells after transplantation into ischemic brain. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease Glia, Paris. Glia. 2009;57(S13):74.
25. Tsupikov O, Poddubna A, Ochenashko O, Petrenko A, Kyryk V, Kuchuk O, et al. Grafting of fetal neural progenitor cells into the adult ischemic brain. 7th FENS Forum, Amsterdam. FENS Abstr book. 2010;5:016.31.
26. Labunets IF, Tsupikov OM, Kyryk VM, Kuchuk OV, Pivneva TA, Skibo GG, et al. *Vplyv neurotransplantatsii na funktsionalnu aktyvnist epifiza ta tymusa pry ishemichnomu ushkodzhenni golovnoho mozku* [Influence of neurotransplantation on the functional activity of the epiphysis and thymus after ischemic brain injury], Materialy mizhnar nauk.-prakt. konf. [Proceedings of International Scientific Practical Conference] Genetychna i

- regeneratyvna medytsyna: problemy ta perspektyvy [Genetic and regenerative medicine: problems and perspectives], Kyiv, J Nat Acad Med Sci Ukr. 2010;16:100–1.
27. Vasilev RG, Kuchuk OV, Tsupikov OM, Kyryk VM. *Perspektyvy zastosuvannya v regeneratyvnyj medytsyni tryvymirnyh transplantativ, zaselennyh multipotentnymy stromalnymy klitynamy kistkovogo mozku* [Perspectives of usage in regenerative medicine of three-dimensional scaffolds seeded with bone marrow-derived multipotent stromal cells], Materialy konf. [Proceedings of Conference] Aktualni pytannya gerontologii ta geriatrii [Actual issues of gerontology and geriatrics], Kyiv. 2011:8–9.
 28. Tsupikov O, Pivneva T, Poddubna A, Kyryk V, Kuchuk O, Skibo G. Hippocampal-derived neural progenitor cells establish synaptic junctions after grafting into the adult ischemic brain. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence. 2011: D141.
 29. Skibo GG, Nikonenko IR, Kovalenko TN, Osadchenko IA, Lushnikova IV, Pivneva TA, Tsupikov OM, Pasteva MA, Smozhanyk EG, Nikonenko AG. *Sinapticheskaya plastichnost mozga* [Synaptic plasticity of the brain], Nauchnye trudy III sezda fiziologov SNG [Scientific works of the III Congress of Physiologists of the CIS], Yalta. 2011:50–1.
 30. Tsupikov O, Poddubna A, Smozhanyk E, Kyryk V, Kuchuk O, Pivneva T, et al. The grafted fetal neural progenitor cells can integrate in the adult hippocampal tissue after ischemic injury. Abstracts of the World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig. 2011:163.
 31. Tsupikov O, Kanemitsu M, Pivneva T, Skibo G, Dayer AG, Kiss JZ. Ectopic niche formation by grafted FGF-2 overexpressing neural stem/progenitors in the cerebral cortex. Abstracts of the SFN, Washington. 2011;129.05/A18:20.
 32. Tsupikov O, Smozhanik E, Rybachuk O, Kyryk V, Kuchuk O, Patseva M, et al. Synapse formation between the grafted neural progenitor cells and

host hippocampal neurons after ischemic injury. 8 th FENS meeting, Barselona. FENS Forum Programme Book. 2012:300.

33. Tsupyykov OM. *Eksperimentalnye podhody k izucheniyu terapevtycheskogo potentsiala stvolovyh kletok pri perinatalnoj patologii CNS* [Experimental approaches to the study of the therapeutic potential of stem cells in the perinatal pathology of the CNS], Materialy mizhnar nauk.-prakt. konf. [Proceedings of International Scientific Practical Conference] Klitynni tehnologii v akesherstvi, ginekologii, neonatologii na dytyachij nevrologii [Cell technology in obstetrics, gynecology, neonatology and pediatric neurology], Kyiv. 2013:29.
34. Tsupyykov OM, Kyryk VM, Mamchur AM, Ustymenko AM, Yatsenko KV, Butenko GG, et al. *Transplantatsiya multypotentnyh mezenhimalnyh stromalnyh klityn zhyrovoi klitkovyny pry perynatalnij patologii CNS* [Transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue during perinatal CNS pathology], Materialy mizhnar nauk.-prakt. konf. [Proceedings of International Scientific Practical Conference] Transplantatsiya - sogo dennya, mynule ta majbutne [Transplantation - Present, Past, and Future], Kyiv. 2014:37.
35. Tsupyykov O, Kyryk V, Pivneva T, Butenko G, Skibo G. Neural stem cells transplantation promote the spatial learning recovery after ischemic brain injury. 1st International Symposium on Mechanisms Underlying Memory Storage and Pathological Learning, Montpellier. Abstract book. 2015:29.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ	30
ВСТУП	31
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ	42
1.1. НЕЙРАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ.....	42
1.1.1. Відкриття нейральних стовбурових клітин (НСК).....	42
1.1.2. Ніші нейральних стовбурових клітин	44
1.1.2.1. Анатомія субвентрикулярної зони.....	45
1.1.2.2. Анатомія субгранулярної зони	48
1.1.2.3. Сигналінг у ніші НСК	50
1.1.2.3.1. FGF-2 сигналінг	52
1.1.2.3.2. EMMPRIN сигналінг.....	53
1.1.3. Культура НСК.....	55
1.1.4. Трансплантація стовбурових клітин.....	56
1.2. ІШЕМІЧНЕ ПОШКОДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ.....	57
1.2.1. Загальні механізми ішемічного пошкодження головного мозку	57
1.2.2. Зміни у нейронах гіпокампа, що обумовлені ішемією.....	66
1.2.3. Зміни клітин інших типів у нервовій тканині головного мозку, пов'язані з ішемією.....	75
1.3. ВИКОРИСТАННЯ НСК ПРИ ІШЕМІЧНОМУ УШКОДЖЕННІ МОЗКУ	78
1.3.1. Використання НСК при перинатальні патології ЦНС.....	86
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	91
2.1. ОБ'ЄКТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	91
2.2. ВИДІЛЕННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН.....	95
2.2.1. Отримання та кріоконсервування фетальної нервової тканини щурів.....	95

2.2.2. Отримання суспензії клітин гіпокампа фетального мозку щурів	96
2.2.3. Адгезивна культура нейральних прогеніторних клітин з фетального гіпокампа миші.....	97
2.2.4. Адгезивна культура нейральних прогеніторних клітин з субвентрикулярної зони новонароджених щурів.....	98
2.2.5. Адгезивна культура мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) з жирової клітковини або плаценти GFP-позитивних мишей.....	98
2.2.6. Фенотипічна характеристика культури ММСК	100
2.2.7. Органотипова культура зрізів головного мозку новонароджених щурів.....	101
2.2.8. Отримання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин людини	102
2.2.9. Нейронне диференціювання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин людини	103
2.2.10. Конструювання лентивірусних векторів та трансдукція нейральних прогеніторних клітин.....	104
2.2.11. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією	106
2.2.12. Аналіз активності металопротеїназ ММП-2 та ММП-9 за допомогою желатинової зимографії	107
2.2.13. Аналіз інвазії EMMPRIN-трансформованих нейральних прогеніторних клітин у колагеновому матриксі <i>in vitro</i>	108
2.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МОДЕЛІ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ	109
2.3.1. Глобальна короткотривала ішемія головного мозку піщанки.....	109

2.3.2. Глобальна короткотривала ішемія головного мозку щура.....	109
2.3.3. Глобальна короткотривала ішемія головного мозку миші.....	110
2.3.4. Фокальна ішемія головного мозку щура.....	111
2.3.5. Гіпоксично-ішемічне ушкодження головного мозку новонароджених щурів	112
2.3.6. Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) у мишей <i>in vivo</i>	112
2.3.7. Моделювання ПВЛ у мишей <i>in vitro</i>	113
2.3.8. Кількісна оцінка цитозольного ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі.....	114
2.4. ТРАНСПЛАНТАЦІЯ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН	115
2.4.1. Ксеногенна трансплантація фетальної нервової тканини щурів.....	115
2.4.2. Алогенна трансплантація суспензії клітин гіпокампа фетального мозку щурів	115
2.4.3. Сингенна трансплантація GFP-позитивних нейральних прогеніторів гіпокампа миші.....	116
2.4.4. Сингенна трансплантація GFP-позитивних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин миші	116
2.4.5. Ксеногенна трансплантація GFP-позитивних нейральних прогеніторних клітин, утворених з іПСК людини	117
2.4.6. Ін'єкція BrdU	117
2.4.7. Ін'єкція лентивірусного вектора	118
2.5. ПОВЕДІНКОВІ ТЕСТИ	118
2.5.1. Тест "водний лабіринт Морріса"	118
2.5.2. Тест "діставання і виймання їжі"	119
2.6. МОРФОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	120

2.6.1. Таймлапс аналіз EMMPRIN-трансформованих нейральних прогеніторних клітин	120
2.6.2. Імуногістохімічний аналіз парафінових зрізів гіпокампа	120
2.6.3. Імуноцитохімічний аналіз адгезивної культури нейральних прогеніторних клітин	121
2.6.4. Імуногістохімічний аналіз вібраторних зрізів головного мозку.....	122
2.6.5. Електронно-мікроскопічні методи дослідження.....	123
2.6.5.1. Електронно-мікроскопічний аналіз адгезивних культур стовбурових клітин	123
2.6.5.2. Імуногістохімічний аналіз GFP-позитивних трансплантованих клітин на електронно-мікроскопічному рівні	123
2.7. ХІМІЧНІ РЕАКТИВИ І РОЗЧИНИ	125
2.8. МЕТОДИ СТАТИСТИЧНОГО АНАЛІЗУ	127

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ФЕТАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ (ФНТ) НА СТРУКТУРУ ГІПОКАМПА ГРИЗУНІВ ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ.....128

3.1. Вплив трансплантації ФНТ на гліальні клітини гіпокампа піщанки після короткотривалої глобальної ішемії мозку	128
3.2. Вплив пізньої трансплантації ФНТ на структуру гіпокампа щурів у віддаленому періоді після ішемічного ушкодження мозку.....	131

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НЕЙРАЛЬНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН (НПК) НА СТАН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ ТА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ МИШЕЙ ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ.....141

4.1. ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРАЛЬНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН <i>IN VITRO</i>	141
4.2. МІГРАЦІЯ ТА ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ ФЕТАЛЬНИХ НЕЙРАЛЬНИХ КЛІТИН У МОЗКУ ІШЕМІЗОВАНИХ ТВАРИН	148
4.3. УТВОРЕННЯ СИНАПТИЧНИХ КОНТАКТІВ МІЖ ТРАНСПЛАНТОВАНИМИ НПК ТА НЕЙРОНАМИ ГІПОКАМПА РЕЦИПІЄНТА ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ	153
4.4. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НПК НА ЕНДОГЕННИЙ НЕЙРОГЕНЕЗ У МИШЕЙ ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ.....	156
4.5. ІНТЕГРАЦІЯ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ ГІПОКАМПАЛЬНИХ НПК У МОЗОК МИШІ ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ.....	165
4.6. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НПК НА КОГНІТИВНІ ФУНКЦІЇ МИШЕЙ ПІСЛЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ-РЕПЕРFUЗІЇ.....	172

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ММСК НА СТАН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ І ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ МИШЕЙ ПІСЛЯ ПВЛ.....175

5.1. ХАРАКТЕРИСТИКА МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН (ММСК) <i>IN VITRO</i>	175
5.2. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ММСК НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ МИШЕЙ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ПВЛ	183
5.3. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ММСК НА СТАН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ МИШЕЙ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ПВЛ <i>IN VIVO</i>	185
5.4. МОДЕЛЮВАННЯ ПВЛ <i>IN VITRO</i> НА ОРГАНОТИПОВІЙ КУЛЬТУРІ ЗРІЗІВ ГОЛОВНОГО МОЗКУ МИШІ	187
5.5. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ММСК НА СТАН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ПВЛ <i>IN VITRO</i>	198

РОЗДІЛ 6. ТРАНСФОРМАЦІЯ НПК У НАПРЯМКУ НАДЕКСПРЕСІЇ FGF-2 ДЛЯ УТВОРЕННЯ НАВКОЛОСУДИННИХ КЛАСТЕРІВ З НЕЙРОГЕННИМ ПОТЕНЦІАЛОМ.....206

6.1. ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРИ НЕЙРАЛЬНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН, ОТРИМАНИХ ІЗ СВЗ	207
6.2. УТВОРЕННЯ НАВКОЛОСУДИННИХ КЛАСТЕРІВ ТРАНСПЛАНТОВАНИМИ НПК, ЯКІ НАДЕКСПРЕСУЮТЬ FGF-2.....	208
6.3. ПРОЛІФЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ FGF-2-ТРАНСФОРМОВАНИХ НПК	213
6.4. FGF-2-ТРАНСФОРМОВАНІ НПК, ЩО КОНТАКТУЮТЬ ІЗ СУДИНАМИ, УТВОРЮЮТЬ ПУЛ НЕЗРІЛИХ НЕЙРОНІВ ПІСЛЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ	217
6.5. ПРОСТОРОВА ОРГАНІЗАЦІЯ НАВКОЛОСУДИННИХ КЛАСТЕРІВ, УТВОРЕНИХ ТРАНСПЛАНТОВАНИМИ FGF-2-ТРАНСФОРМОВАНИМИ НПК	220
6.6. УЛЬТРАСТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ НАВКОЛОСУДИННИХ КЛІТИННИХ КЛАСТЕРІВ	225

РОЗДІЛ 7. ТРАНСФОРМАЦІЯ НСК У НАПРЯМКУ НАДЕКСПРЕСІЇ ЕММРІН ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ МІГРАЦІЇ ЦИХ КЛІТИН З СВЗ У ПОШКОДЖЕНІ ДІЛЯНКИ МОЗКУ228

7.1. ЕКСПРЕСІЯ ММП У КУЛЬТУРІ НПК.....	228
7.2. ВПЛИВ НАДЕКСПРЕСІЇ ЕММРІН НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ ТА ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ НПК.....	232
7.3. ЕММРІН-ТРАНСФОРМОВАНІ НПК МАЮТЬ ПІДВИЩЕНУ ШВИДКІСТЬ МІГРАЦІЇ КЛІТИН НА КОЛАГЕНОВОМУ МАТРИКСІ <i>IN VITRO</i>	235
7.4. ЕММРІН ПОКРАЩУЄ ІНВАЗИВНІ ЗДІБНОСТІ НПК У 3D МАТРИЧНИХ СИСТЕМАХ.....	237
7.5. НАДЕКСПРЕСІЯ ЕММРІН ПОКРАЩУЄ МІГРАЦІЮ НПК З СВЗ ДО ПОШКОДЖЕНОЇ ДІЛЯНКИ СОМАТОСЕНСОРНОЇ КОРИ	240

РОЗДІЛ 8. ІНТЕГРАЦІЯ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ НПК, УТВОРЕНИХ З ІПСК ЛЮДИНИ, У МОЗОК ЩУРА ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ248

8.1. НЕЙРОНИ РЕЦИПІЄНТА ФОРМУЮТЬ АФЕРЕНТНІ СИНАПТИЧНІ
КОНТАКТИ З ТРАНСПЛАНТОВАНИМИ КЛІТИНАМИ, УТВОРЕНИМИ З ІПСК
ЛЮДИНИ.....249

РОЗДІЛ 9. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ254

9.1. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ФЕТАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ НА
СТРУКТУРУ ГІПОКАМПА ГРИЗУНІВ ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ.254

9.2. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НПК НА СТАН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ
ПІСЛЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ У МИШЕЙ.....258

9.3. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НПК НА ЕНДОГЕННИЙ НЕЙРОГЕНЕЗ
ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ262

9.4. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НПК НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ МИШЕЙ
ПІСЛЯ ІШЕМІЇ-РЕПЕРFUЗІЇ264

9.5. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ММСК НА СТАН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ
ПІСЛЯ ПВЛ265

9.6. ТРАНСПЛАНТОВАНІ FGF-2-ТРАНСФОРМОВАНІ НПК, ЩО
КОНТАКТУЮТЬ ІЗ СУДИНАМИ, УТВОРЮЮТЬ ПУЛ КЛІТИН З НЕЙРОГЕННИМ
ПОТЕНЦІАЛОМ ПІСЛЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ267

9.7. ТРАНСФОРМАЦІЯ НСК У НАПРЯМКУ НАДЕКСПРЕСІЇ EMMPRIN
ПОКРАЩУЄ МІГРАЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ ЦИХ КЛІТИН273

9.8. ІНТЕГРАЦІЯ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ НПК, УТВОРЕНИХ З ІПСК
ЛЮДИНИ, У МОЗОК ЩУРА ПІСЛЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ276

ВИСНОВКИ 294

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ297

ДОДАТОК 1. СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ336

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

AQP-4 – аквапорин-4
 BDNF – нейротропний фактор
 BrdU – 5-бромдезоксіуридин
 CD – кластер диференціювання
 DAB - 3,3'-діамінобензидин тетрагідроклорид
 DCX – даблкортин
 EMMPRIN – Extracellular Matrix MetalloPRoteinase INducer – індуктор екстрацелюлярних матриксних металопротеїназ
 FGF-2 – фібрилярний фактор росту
 GDNF – нейротропний фактор, що продукується лінією гліальних клітин
 Iba-1 - іонізована кальцій-зв'язуюча молекула-1
 GFP – зелений флюоресцентний білок
 IL – інтерлейкін
 NeuN - нейрональні ядра
 VEGF – судинний ендотеліальний фактор росту
 БМ – базальна мембрана
 ВЛМ – водний лабіринт Морріса
 ДЦП – дитячий церебральний параліч
 ЕМ – екстрацелюлярний матрикс
 іПСК – індуковані плюрипотентні стовбурові клітини людини
 ІЩ – сумарна кількість мічених клітин, яка підраховується в кожному шарі зони CA1 гіпокампа на 100 мкм² площини зрізу
 КГД – киснево-глюкозна депривація
 ЛДГ – лактатдегідрогенеза
 ЛПС – ліпополісахариди
 ЛЩ – лінійна щільність клітин
 MAP-2 – білок-супутник мікротрубочок-2
 ММСК – мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини
 МНС – основний комплекс гістосумісності
 НПК – нейральні прогеніторні клітини
 НСК – нейральні стовбурові клітини
 ПВЛ – перивентрикулярна лейкомаляція
 СВЗ (SVZ) – субвентрикулярна зона бокових шлуночків
 СГЗ (SGZ) – субгранулярна зона зубчастої звивини
 СК – стовбурові клітини
 ССК – соматосенсорна кора
 ТО – трансдукуюча одиниця
 ФА – формальдегід
 ФБС – фетальна бичача сироватка
 ФНТ – фетальна нервова тканина
 ШПШ – ширина променистого шару

ВСТУП

Актуальність теми. Актуальним завданням сучасної патологічної фізіології є з'ясування механізмів репаративної регенерації тканин та органів при багатьох патологічних процесах, що дозволить запропонувати нові підходи їх корекції, зокрема, із залученням стовбурових клітин. Відомо, що стовбурові клітини здатні розрізняти ділянки ушкодженої тканини, мігрувати у ці зони та диференціюватися у тип клітин, необхідний для відновлення втраченої функції [219].

Останнім часом активно вивчаються можливості застосування клітинної терапії з використанням стовбурових клітин для лікування захворювань нервової системи. Неврологічні захворювання належать до найпоширеніших хвороб в Україні, розповсюдженість яких за останні роки значно зросла [350]. Перше місце серед неврологічних захворювань посідають цереброваскулярні хвороби, серед яких найбільш тяжким вважається мозковий інсульт. У зв'язку з підвищенням рівня захворюваності атеросклерозом, артеріальною гіпертензією, цукровим діабетом, вони все частіше трапляються й у людей працездатного віку [21], а гостра гіпоксично-ішемічна енцефалопатія у новонароджених може стати причиною розвитку дитячого церебрального паралічу [166].

Проблема цереброваскулярних захворювань актуальна не лише для дорослого населення, але й для новонароджених. Перинатальна патологія ЦНС становить 49,8% всіх неврологічних захворювань у дітей [89]. Інвалідність дитячого населення внаслідок перинатальних уражень ЦНС, які призводить до порушення психофізіологічного розвитку дитини, продовжує зростати і коливається від 0,5 до 4-х випадків на 1000 населення (або на 200-300 дитячого населення) [352].

Активно ведеться пошук нейропротекторних засобів, здатних впливати на механізми ішемічно-реперфузійних ушкоджень мозку.

Припускають, що наслідки ішемічного ушкодження нервової тканини можуть бути компенсовані завдяки активації власних репаративних механізмів або корекції за допомогою різних терапевтичних підходів [338].

Одним з перспективних напрямків у лікуванні, розробці профілактичних протиінсультних заходів і реабілітації пацієнтів з ішемічними ураженнями головного мозку є клітинна терапія із використання нейральних стовбурових клітин (НСК) [219]. В основу таких досліджень покладено теоретичні та експериментальні розробки, що вказують на здатність стовбурових клітин диференціюватися в нейрони або гліальні клітини, компенсуючи тим самим функцію загиблених тканин. Як відомо, під час ембріогенезу НСК здатні диференціюватися в усі типи клітин, які необхідні для формування ЦНС [285]. Тому терапевтичне застосування фетальних нейральних стовбурових клітин передбачає їх диференціювання в спеціалізовані клітини ЦНС і в дорослому організмі.

Оскільки ще не до кінця встановлені механізми репаративної регенерації нервової тканини під час ішемічного ушкодження головного мозку, виникає необхідність проведення експериментальних досліджень впливу трансплантації стовбурових та прогеніторних клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини в ЦНС. Для дослідження ефективності клітинної терапії широко використовують моделювання пошкодження мозку з подальшою трансплантацією стовбурових клітин [219]. Ішемічне ураження головного мозку лабораторних тварин в експерименті дозволяє відтворити наслідки ішемічного інсульту в людини, а трансплантація клітин різного походження з різним потенціалом диференціювання має на меті вивчення їх регенеративного потенціалу та загальних закономірностей функціонування у відновних процесах у вогнищі ішемії. Це дозволить суттєво поглибити знання про клітинні механізми регенеративного потенціалу стовбурових клітин при ішемічних

ушкодженнях головного мозку та обґрунтувати можливість застосування клітинної терапії при цій патології.

Враховуючи вищевикладене, ми вважали за доцільне дослідити вплив трансплантації стовбурових клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини та поведінкові феномени на різних моделях ішемічного ушкодження головного мозку у лабораторних тварин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках наукових програм відділу цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: «Дослідження регенеративного потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин при перинатальній патології ЦНС» (2015-2019 рр.) №00115U003633, «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012-2016 рр.) №0112U001475, «Клітинні та молекулярні механізми нейродегенерації та шляхи її корекції» (2014-2018 рр.) №0113U007273; на базі державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології – «Молекулярні та генетичні механізми клітинної сигналізації в нормі та патології» (№UF45.2/001); у рамках гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених «Клітинна терапія при експериментальному ішемічному ушкодженні головного мозку» (2010-2011 рр.) №0111U005283, у рамках спільного проекту НАН України та Українського науково-технологічного центру «Вплив трансплантації стовбурових клітин на процеси регенерації нервової тканини при перинатальній патології ЦНС» (2014-2016 рр.) № 0114U006119, у рамках спільного швейцарського-українського проекту SCOPES «Ectopic niche formation by grafted neural stem/progenitors in the ischemic cerebral cortex» (2009-2012 рр.) № IZ73Z0_1 28015.

Мета дослідження: визначення впливу трансплантації стовбурових клітин різного генезу на процеси регенерації нервової

тканини головного мозку та поведінкові феномени на різних моделях ішемічного ушкодження мозку.

Завдання дослідження:

1. Встановити вплив трансплантації суспензії фетальної нервової тканини на структуру гіпокампа дорослих щурів у тривалі строки після трансплантації.

2. Оцінити можливість довгострокового виживання у мозку реципієнта фетальних GFP-позитивних нейральних прогеніторних клітин (НПК), трансплантованих тваринам після ішемічного ушкодження мозку, їх диференціювання у зрілі клітини нервової тканини та формування синаптичних контактів між нейронами реципієнта і донорськими GFP-позитивними НПК.

3. Охарактеризувати вплив трансплантованих НПК на ендогенний нейрогенез у гіпокампі мишей після ішемічного ушкодження мозку.

4. Описати вплив трансплантації НПК на когнітивні функції мишей після церебральної ішемії-реперфузії.

5. Визначити вплив трансплантації стовбурових клітин на стан нервової тканини і поведінкові реакції експериментальних тварин на *in vivo* моделі ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ).

6. Створити *in vitro* модель ПВЛ на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

7. Установити вплив надекспресії фактора росту фібробластів-2 (FGF-2) у НПК на функціональний стан цих клітин після їх трансплантації у соматосенсорну кору щурів з ішемічним ушкодженням мозку.

8. З'ясувати вплив надекспресії індуктора екстрацелюлярних матриксних металопротеїназ (EMMPRIN) у НПК на їх міграційні здібності із субвентрикулярної зони до ділянки ішемічного ушкодження у

соматосенсорній корі.

9. Оцінити можливість формування синаптичних контактів між нейронами реципієнта і донорськими нейронами, утвореними з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (іПСК) людини, після їх трансплантації у мозок ішемізованих щурів.

Об'єкт дослідження: структурно-функціональні зміни в головному мозку експериментальних тварин, викликані трансплантацією стовбурових клітин після ішемічного ушкодження мозку.

Предмет дослідження: морфологічна характеристика нервової тканини головного мозку та показники поведінкових феноменів.

Методи дослідження. Для досягнення мети даної роботи були використані методи: виділення та культивування нейральних стовбурових клітин, проточна цитофлюорометрія, таймлапс (time-lapse) аналіз, продукція лентівірусних векторів, трансфекція культури клітин, желатинова зимографія, моделювання ішемічних ушкоджень мозку; імуноцито- та гістохімія на світловому та електронно-мікроскопічному рівнях; лазерна доплерографія, поведінкові тести, статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі представлені оригінальні результати морфофункціональних досліджень впливу трансплантації стовбурових клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини головного мозку та поведінкові феномени на різних моделях ішемічного ушкодження головного мозку як у дорослих, так і у новонароджених тварин.

На моделі глобальної короткотривалої ішемії головного мозку мишей продемонстровано, що субокципітально трансплантовані фетальні GFP-позитивні НПК здатні мігрувати в ушкоджені ділянки зони CA1 гіпокампа, диференціюватися як в астроцити, так і в зрілі нейрони з добре розвиненими дендритами і шипиками та виживати у мозку ішемізованих тварин як мінімум 90 діб після трансплантації. За допомогою

ультраструктурного аналізу показано, що субокципітальна або стереотаксична трансплантація GFP-позитивних НПК у мозок ішемізованих тварин сприяє утворенню простих та перфорованих синаптичних контактів між донорськими клітинами та нейронами реципієнта.

На моделі глобальної короткотривалої ішемії головного мозку мишей також продемонстровано, що ішемічне ушкодження гіпокампа викликає порушення когнітивних функцій (просторової пам'яті), а стереотаксична трансплантація НПК сприяє відновленню просторової пам'яті у тварин після ішемічного ушкодження мозку.

На *in vivo* моделі перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) показано, що сингенна стереотаксична трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин сприяє відновленню кортикоспинальної функції у тварин після ПВЛ, зменшує деградацію основного білка мієліну та гальмує розвиток астро- та мікрогліозу. Для з'ясування патогенетичних механізмів ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярної лейкомаляції, а також для дослідження шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології створено нову експериментальну *in vitro* модель цієї патології на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

На створеній нами *in vitro* моделі ПВЛ уперше показано, що ММСК в умовах їх безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку мають нейропротекторний вплив на нервову тканину, зменшуючи реактивний астро- та мікрогліоз та збільшуючи кількість Рір-імунопозитивних олігодендроцитів.

Досліджено вплив трансформації НПК у напрямку надекспресії FGF-2 на поведінку цих клітин після їх трансплантації у соматосенсорну кору щурів з ішемічним ушкодженням мозку та можливість утворення

ними локальних навколосудинних проліферативних кластерів із нейрогенним потенціалом.

Уперше показано, що надекспресія FGF-2 у НПК сприяє їх тісному контакту з судинною мережею та формуванню навколосудинних BrdU-позитивних спіралеподібних проліферативних кластерів та утворенню пулу незрілих DCX-позитивних нейронів у відповідь на ішемічне ушкодження мозку.

Уперше показано, що НПК, які надекспресують EMMPRIN, мігрують у пошкоджену соматосенсорну кору далі порівняно із контрольними НПК та утворюють популяцію нейральних прогеніторів у пошкодженій ділянці кори.

З використанням імуно-електронно-мікроскопічного аналізу вперше показано, що GFP-негативні аксони реципієнта формують синаптичні контакти на GFP-позитивних трансплантованих нейронах, утворених з іПСК людини, і більшість з цих контактів мають ультраструктурні характеристики збуджувальних глутаматергічних синапсів.

Практичне значення роботи. Результати дослідження мають передусім фундаментальне значення, оскільки помітно розширюють існуючі уявлення про клітинні механізми нейропротекторної дії трансплантованих стовбурових клітин при ішемічних ушкодженнях головного мозку та особливості поведінки цих клітин в організмі. Використання GFP-мічених трансплантованих клітин дає можливість тривало простежувати їх міграцію, інтеграцію та диференціювання в тканинах реципієнта.

Практичне значення одержаних результатів полягає в знаходженні нових підходів для лікування ішемічних уражень головного мозку та обґрунтуванні застосування методів клітинної терапії із використанням стовбурових клітин при цій патології.

Розроблену у дисертаційній роботі нову експериментальну *in vitro* модель перивентрикулярної лейкомаляції можна використовувати під час дослідження патогенетичних механізмів розвитку ПВЛ, а також для пошуку шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології.

Отримані дані дають нове розуміння взаємозв'язку між трансплантованими НПК, що надекспресують FGF-2, та судинами реципієнта. Створення штучної ектопічної нейрогенної ніші має практичне значення для подолання низького регенеративного потенціалу кори головного мозку завдяки підтримці міграційного та проліферативного стану НПК і збільшенні пулу незрілих нейронів, необхідних для регенерації мозку.

Перспективним джерелом донорського матеріалу при аутологічній трансплантації є індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК). У наших експериментах з використанням фібробластів шкіри людини для отримання з них іПСК з подальшим диференціюванням їх у нейральному напрямку ми продемонстрували утворення синаптичних контактів між трансплантованими клітинами і нейронами реципієнта, що може стати майбутнім перспективним терапевтичним підходом у лікуванні наслідків ішемічного інсульту.

Результати дисертаційної роботи впроваджені в матеріали науково-методичних рекомендацій кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця та Центру молекулярних і клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могилянська академія».

Особистий внесок здобувача. Автором особисто обрано і обґрунтовано напрямок і схему наукової роботи, проведено критичний аналіз літературних джерел відповідно до сучасних уявлень про нейральні стовбурові клітини та можливість їх застосування при ішемічному ушкодженні головного мозку. Сформульовані мета, основні

завдання дисертаційної роботи, визначено репрезентативний об'єм наукових досліджень та комплекс методів, організовано і проведено основну частину експериментів, аналіз отриманих результатів, статистичну обробку фактичного матеріалу, його наукову інтерпретацію, узагальнення результатів і формулювання висновків. Особисто здобувачем була виконана більшість представлених у роботі експериментів з моделювання ішемічного ушкодження мозку, культивування нейральних стовбурових клітин та їх трансплантації у ішемізований мозок. Деякі експерименти були проведені зі співавторами опублікованих робіт, зокрема співробітниками Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України д.б.н. Т. А. Півневою та к.б.н. І. В. Лушніковою, співробітниками ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» к.мед.н. В. М. Кириком та к.б.н. А. М. Устименко, співробітником Інституту нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України О. В. Гаращуком. Експерименти з використанням нейральних прогеніторних клітин, що надекспресують FGF-2 або EMMPRIN, були проведені на базі відділу фундаментальних нейронаук Женевського університету (керівник проф. Ж. З. Кіш) спільно з М. Канеміцу. Експерименти з використанням індукованих плюрипотентних стовбурових клітин людини були проведені на базі Лабораторії стовбурових клітин і відновлювальної неврології Лундського університету (керівник проф. З. Кокайя) спільно з Д. Торнеро.

Апробація результатів дисертації. Усі матеріали дисертації доповідалися на семінарах Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, а також на наукових симпозіумах і з'їздах: форумах Федерації Європейських нейрофізіологічних товариств (Амстердам, 2010; Барселона, 2012), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи» (Київ, 2010), конгресі Міжнародної організації з дослідження мозку (Флоренція, 2011), світовій конференції з регенеративної медицини

(Лейпциг, 2011), конгресі Товариства нейронаук (Вашингтон, 2011), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неонатології та дитячій неврології» (Київ, 2013), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Трансплантація – сьогодення, минуле та майбутнє» (Київ, 2014)), міжнародному симпозіумі «Mechanisms Underlying Memory Storage and Pathological Learning» (Монпельє, 2015), а також на засіданнях сектору молекулярної фізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Публікації. За результатами дослідження опубліковано 35 наукових робіт, з яких 21 стаття у вітчизняних та іноземних наукових журналах фахового спрямування та 14 тез доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, дев'яти розділів, висновків та списку використаної літератури.

У першому розділі наведено критичний аналіз сучасних наукових літературних джерел щодо стану вивчення нейральних стовбурових клітин дорослого організму та можливості їх застосування при ішемічному ушкодженні головного мозку та перинатальній патології ЦНС.

У другому розділі «Матеріали і методи дослідження» описані експериментальні *in vivo* та *in vitro* моделі ішемічного ушкодження головного мозку, методи виділення та культивування стовбурових клітин різного генезу, методи конструювання лентивірусних векторів та трансдукції нейральних прогеніторних клітин, способи трансплантації стовбурових клітин, методи імуноцито- та гістохімії на світловому та електронно-мікроскопічному рівнях, методи дослідження поведінкових реакцій експериментальних тварин.

У третьому-восьмому розділах наведено результати експериментальних досліджень і статистичний аналіз отриманих даних.

У дев'ятому розділі «Обговорення результатів» здійснено аналіз і узагальнення отриманих результатів дослідження, на основі яких зроблено висновки.

Список використаної літератури налічує 357 джерел.

Обсяг дисертації - 335 сторінок, із них основного тексту – 266 сторінок. Дисертаційна робота ілюстрована 107 рисунками і 3 таблицями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ.

1.1. Нейральні стовбурові клітини

1.1.1. Відкриття нейральних стовбурових клітин (НСК)

«Усе може вмерти, але ніщо не може відродитися», – казав Рамон-і-Кахаль. Догма, що клітини головного мозку дорослого організму не оновлюються, панували тривалий час. Ця теза глибоко вкоренилася серед представників наукової спільноти, і тому відкриття у 1962 році Джозефом Олтманом новоутворених клітин у головному мозку дорослих гризунів було практично повністю проігноровано [6]. Пізніше нейрогенез був детальніше описаний у дорослих гризунів та співочих птахів [105, 145]. Однак ці результати не вдалося відтворити у дорослих особин макаки-резус, і складалося враження, що у дорослих приматів нейрогенез відсутній [237]. Вважалося, що в мозку дорослих людей нові нейрони не можуть утворюватися, оскільки мозок не здатний до макроскопічної регенерації після пошкодження [327].

Лише з появою нових технологій і після публікації основоположних робіт Семюеля Вейса на початку 1990-их нейрогенез у мозку дорослого організму став загальноприйнятим фактом [244]. Застосування 3Н-тимідину – радіоактивного нуклеотиду, який використовували для вивчення проліферації за рахунок його вбудовування в клітини під час S-фази клітинного циклу, було замінено на його аналог, бромодезоксіуридин (BrdU), який визначається за допомогою специфічних антитіл. Використовуючи BrdU для мітки новоутворених клітин за допомогою імуногістохімії було показано, що клітини-попередники, ізольовані з головного мозку дорослих мишей, здатні проліферувати в умовах *in vitro* та диференціюватися в нейрони і астроцити [244].

Наявність нейрогенезу в головному мозку дорослих людей було підтверджено в 1998 р, коли Фред Гейдж та шведський нейробіолог Петер Ерикссон уперше продемонстрували утворення нових нейронів у гіпокампі людини [81].

Сьогодні вже не викликає сумнівів існування постійного нейрогенезу в деяких ділянках головного мозку дорослих ссавців, який забезпечується завдяки пулу нейральних стовбурових клітин (НСК) [184, 208, 251].

Незважаючи на великий прогрес, який був зроблений у розумінні біології нейральних стовбурових клітин, досі відсутній чіткий критерій ідентифікації НСК, що призводить до суперечливих результатів щодо розподілу цих клітин у постнатальному мозку, їх властивостей та потенціалу до проліферації і диференціювання [69]. Визначення «стовбуровості» ґрунтується як на *in vivo*, так і на *in vitro* критеріях.

Для визначення НСК в умовах *in vitro* найчастіше використовується метод нейросфер [102]. Ізольовані НСК з мозку дорослого організму культивуються в присутності факторів росту і формують нейросфери (діаметр 50–150 мкм) з проліферуючих недиференційованих клітин [238]. У подальшому ці нейросфери можуть послідовно пасажуватися для збільшення їх кількості, або диференціюватися як у нейрони, так і гліальні клітини [225].

Ці результати демонструють дві функціональні властивості стовбурових клітин: самовідтворення і мультипотентність. Клонування нейросфер дало інструмент для встановлення властивості «стовбуровості» у тих чи інших первинних популяціях нейральних прогеніторних клітин. Саме за допомогою цього підходу було продемонстровано, що деякі ділянки мозку, що розвивається, і зрілого мозку ссавців, у тому числі людини, містять пули нейральних стовбурових клітин [163, 221].

Ідентифікація НСК в умовах *in vivo* традиційно базується на аналізі морфології цих клітин, їх мітотичної активності, а також експресії певних генів та синтезі білків. Найчастіше використовуються такі маркери НСК: нестин, SOX-2, Musashi 1 і 2, Oct4, Nanog та інші, але жоден з них не можна використовувати як єдиний критерій для ідентифікації НСК [197].

Цікаво, що НСК у мозку дорослого організму не є аморфними недиференційованими клітинами, а мають властивості диференційованих астроцитів на ультраструктурному, електрофізіологічному та молекулярному рівнях, у тому числі експресують астрогліальні білки, такі як GFAP, GLAST та інші [74, 232]. Під час розвитку головного мозку, радіальна глія є первинним попередником нейронів і глії [10]. У постнатальному розвитку радіальна глія перетворюється у зрілі астроцити, але деякі з астроцитів зберігають властивості стовбурових клітин [194]. Слід зауважити, що до 11-ої постнатальної доби, астроцити з усього мозку можуть генерувати нейросфери, але потім ця здатність залишається лише у астроцитів, що знаходяться у певних нейрогенних ділянках головного мозку дорослих ссавців [168].

1.1.2. Ніші нейральних стовбурових клітин

Спеціалізовані нейрогенні зони головного мозку, які є ключовим регулятором поведінки стовбурових клітин *in vivo*, підтримують їх самовідновлення та продукування ними диференційованих клітин, називаються нішами [94].

Девід Скадден визначає нішу стовбурових клітин як «специфічне анатомічне утворення, яке регулює поведінку стовбурових клітин, які беруть участь у регенерації тканини та підтримці її функціонування» [257]. Ніша – це динамічна система, яка забезпечує збалансовану відповідь

стовбурових клітин на потреби організму і в одночас захищає його від надмірної проліферації стовбурових клітин [257].

Нейральні стовбурові клітини мають великий проліферативний потенціал, здатні до самовідтворення та генерації мультипотентних потомків, які згодом диференціюються у три типи клітин нервової тканини – нейрони, астроцити та олігодендроцити [251].

До недавня лише дві зони у головному мозку дорослого організму розглядалися як ніші нейральних стовбурових клітин. Це субвентрикулярна зона (СВЗ) бічних шлуночків та субгранулярна зона (СГЗ) зубчастої звивини [174]. Але в останні роки з'являється все більше даних про те, що нейро- і гліогенез у постнатальному мозку насправді відбувається вздовж усієї шлуночкової системи, особливо після пошкодження мозку або інших індукуючих стимулах [178, 179, 247].

1.1.2.1. Анатомія субвентрикулярної зони

Субвентрикулярна зона (СВЗ) простягається вздовж бічної стінки бокового шлуночка і містить тонкий шар клітин, що зберігають високу проліферативну активність. СВЗ є найбільшою гермінативною зоною у постнатальному головному мозку.

Розташування і проліферативна активність постнатальної СВЗ дає підстави вважати, що вона походить з ембріональної СВЗ латерального гангліонарного горбика [297].

Цитоархітектоніка СВЗ найкраще візуалізується на фронтальних зрізах головного мозку (**Рис. 1.1**) [305].

У субвентрикулярній зоні бокових шлуночків виділяють 4 основні типи клітин: нейробласти (тип А), СВЗ астроцити (тип В), незрілі прогеніторні клітини (тип С) і ворсинчасті епендимоцити (тип Е), які стимулюють продукцію ліквору (**Рис. 1.1А**) [305].

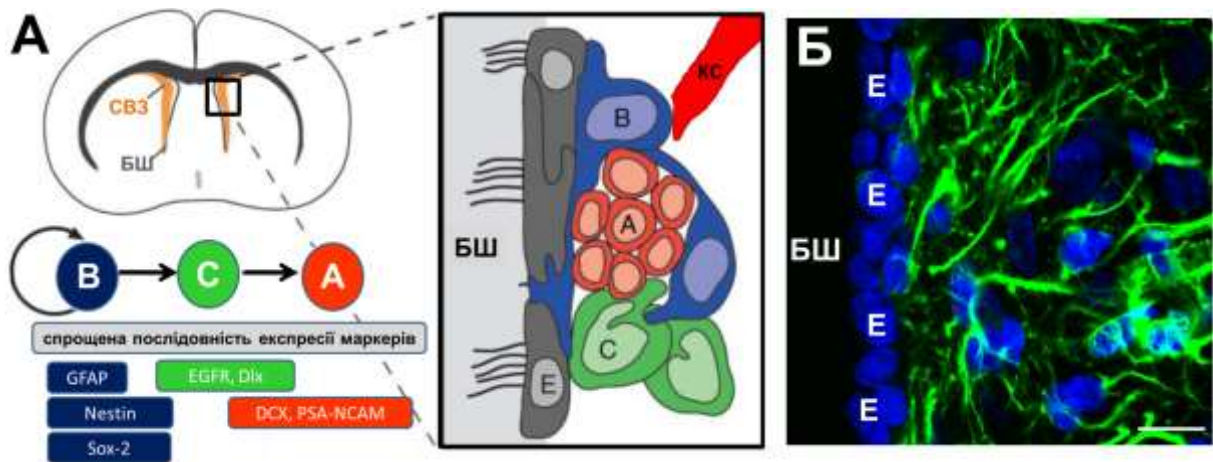


Рис. 1.1. Структурна організація СВЗ мозку дорослого гризуна. А – Схематичне зображення субвентрикулярної зони (СВЗ), прилеглої до бокових шлуночків (БШ). Шар ворсинчастих епендимальних клітин (Е) межує зі шлуночком. СВЗ астроцит (тип В) має відросток, який також безпосередньо контактує зі шлуночком. Клітини типу В продукують пул перехідних клітин типу С, з яких у свою чергу, утворюються нейробласти (клітини типу А). Кровоносні судини (КС) тісно контактують як із клітинами типу В, так і з іншими клітинами СВЗ. Схематично зображена спрощена послідовність експресії маркерів різних типів клітин СВЗ (модифіковано з [74]). Б – Конфокальне зображення СВЗ щура. Імуногістохімічне фарбування астроцитів (GFAP – зелений колір). Ядра клітин пофарбовані Hoechst 33342 (синій колір). БШ – боковий шлуночок, Е – епендимоцити. Шкала = 10 мкм.

Повільнопроліферуючі клітини типу В продукують пул перехідних активнопроліферуючих клітин (transit amplifying cells) типу С, з яких у свою чергу, утворюються клітини типу А (нейробласти) [73]. У багатьох органах стовбурові клітини діляться відносно повільно і утворюють пул перехідних клітин, які швидко проліферують, збільшуючи їх кількість перед тим, як утворити більш зрілі клітини. Така ієрархія

поділу і диференціювання дозволяє збільшувати кількість зрілих клітин, які походять із однієї стовбурової клітини, таким чином мінімізуючи можливість мутацій під час реплікації ДНК у геномі довгоживучих стовбурових клітин [242].

Цікаво, що НСК типу В дорослого мозку крім GFAP, GLAST, експресують також й інші білки, характерні для зрілих астроцитів. Незважаючи на такі гліальні особливості цих клітин, саме їх вважають первинними нейральними стовбуровими клітинами [232]. Ці клітини тісно контактують з усіма іншими типами клітин СВЗ, у тому числі із клітинами типу С та нейробластами (**Рис. 1.1А**) [176].

Крім того, СВЗ астроцити (клітини типу В) мають тісні контакти з кровоносними судинами (**Рис. 1.1А**) і, таким чином, створюють мікрооточення, що стимулює нейрогенез [176]. Кінцеві відростки гліальних клітин (кінцеві ніжки астроцитів) на судинах головного мозку можна візуалізувати за допомогою імуногістохімічного забарвлення на Aquaporin-4 (AQP-4) – канали в мембрані ніжок астроцитів, що відповідають за проникність води.

У СВЗ є невеличкі ділянки на судинах, які не забарвлюються на AQP-4, і саме в цих ділянках EGFR-експресуючі клітини (тип С) найчастіше контактують із судинами. Такі AQP-4-негативні ділянки унікальні лише для СВЗ, тоді як судини кори та стріатума повністю вкриті ніжками астроцитів [289].

Клітини судин є ключовими елементами ніші стовбурових клітин у зоні бокових шлуночків [174]. Розгалужена мережа кровоносних судин охоплює всю СВЗ і тісно контактує з НСК [313].

Клітини типу В і С утворюють трубчасту мережу, якою об'єднані в ланцюжки нейробласти (тип А) мігрують ростральним міграційним шляхом (РМШ) до нюхових цибулин, де новоутворені нейрони диференціюються в гранулярні та перигломерулярні нейрони [103].

Крім того, у постнатальній СВЗ відбувається також і гліогенез, зокрема у цій зоні можуть утворюватися нові олігодендроцити, як за нормальних умов, так і під час ремієлінізації [207].

1.1.2.2. Анатомія субгранулярної зони

Іншою нейрогенною зоною у головному мозку дорослого організму є субгранулярна зона (СГЗ) зубчастої звивини. На відміну від значної відстані, яку доводиться долати нейробластам з СВЗ щоб досягнути свого місця призначення - нюхових цибулин, гранулярні нейрони зубчастої звивини утворюються прямо в СГЗ і рухаються на незначну відстань у шар гранулярних клітин (**Рис. 1.2А**) [149].

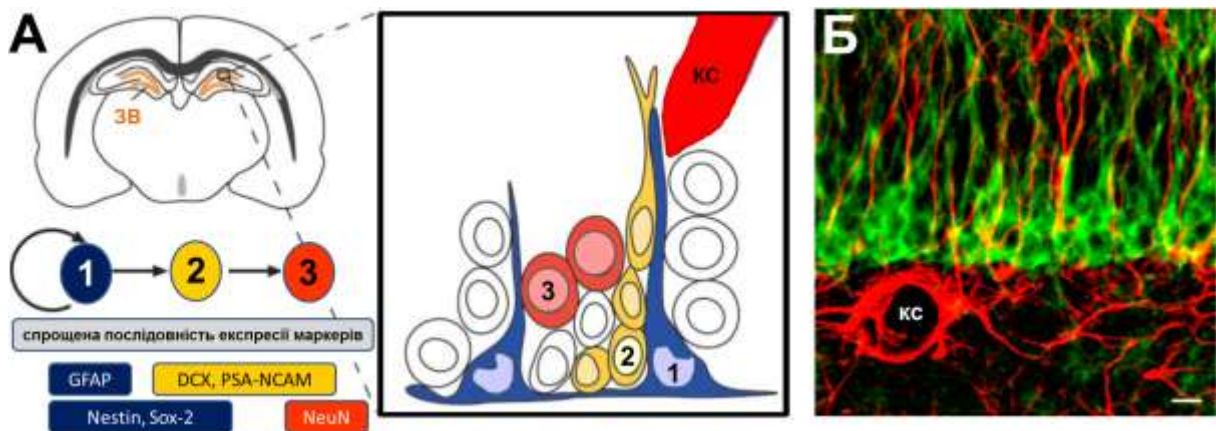


Рис. 1.2. Структурна організація СГЗ мозку дорослого гризуна. А – Схема субгранулярної зони (СГЗ). Клітини 1 типу продукують пул перехідних клітин 2 типу, з яких у свою чергу, утворюються клітини 3 типу. Кровоносні судини (КС) тісно контактують як із клітинами 1-го типу, так і з іншими клітинами СГЗ. Схематично зображена спрощена послідовність експресії маркерів різних типів клітин СГЗ (модифіковано з [74]). Б – Конфокальне зображення СГЗ миші. Імуногістохімічне фарбування астроцитів (GFAP – червоний колір) та прогеніторних клітин (DCX – зелений колір). КС – кровоносна судина. Шкала = 10 мкм.

Субгранулярна зона містить СГЗ астроцити (клітини 1 типу), які, як і СВЗ астроцити, є первинними нейральними стовбуровими клітинами, а також мають спільні з радіальною глією морфологічні та антигенні характеристики. Ці клітини зазвичай спрямовують свій апікальний відросток у молекулярний шар і контактують з обов'язковим компонентом нейрогенної ніші – кровоносними судинами (**Рис. 1.2А,Б**) [305].

Незважаючи на значну кількість клітин 1 типу в субгранулярній зоні, ці клітини повільно діляться. СГЗ астроцити експресують GFAP, нестин і на ультраструктурному рівні мають ознаки, властиві диференційованим астроцитам, але не експресують кальцій-зв'язуючий білок S100 β , характерний для постмітотичної популяції зрілих астроцитів [286]. Було показано, що крім нейрогенезу, у зубчастій звивині відбувається і гліогенез [276]. На відміну від клітини 1-го типу, новоутворені постнатальні астроцити СГЗ експресують не лише GFAP, але й S100 β [276].

СГЗ астроцити (клітини 1 типу) діляться, утворюючи перехідні активнопроліферуючі клітини (клітини 2 типу). Ці клітини мають маленьку сому та короткі відростки, у них відсутній апікальний відросток, як у клітин 1 типу. Цікаво, що клітини 2 типу експресують як гліальні маркери (нестин), так і нейронні (DCX, PSA-NCAM) [276, 305]. Клітини 2 типу поділяються на два підтипи, обидва нестин-позитивні: один негативний (тип 2a), а інший позитивний (тип 2b) на маркер незрілих нейронів даблкортин (DCX) [149].

Клітини 2 типу продукують повільно-проліферуючі нейробласти (клітини 3 типу), які експресують нейрональні маркери (DCX, PSA-NCAM, NeuroD, Prox1) та не експресують гліальні маркери, що свідчить про вихід з клітинного циклу і початок нейронального розвитку [149]. На цьому етапі закінчується радіальна міграція клітин до гранулярного шару і орієнтація відростків клітин 3 типу змінюється з горизонтальної на

вертикальну. Вихід з клітинного циклу також позначається проміжною експресією кальцій-зв'язуючого білка калретиніну [36]. З клітин 3 типу утворюються зрілі постмітотичні гранулярні нейрони (**Рис. 1.2А**).

Отже, застосувавши класичну концепцію біології стовбурових клітин, у СГЗ дорослого організму можна виділити чотири типи клітин з певними властивостями клітин-попередників: клітини 1 типу можна вважати стовбуровими клітинами; перехідні активнопроліферуючі (*transit amplifying cells*) прогеніторні клітини 2a і 2b типу; і клітини 3 типу – нейробласти [149].

Слід зазначити, що постнатальний нейрогенез у СГЗ суттєво відрізняється від нейрогенезу в СВЗ та індуктори СГЗ нейрогенезу не завжди впливають на СВЗ нейрогенез [38]. Також клітини-попередники СВЗ не є ідентичними клітинам у СГЗ [262].

1.1.2.3. Сигналінг у ніші НСК

Активація нейральних стовбурових клітин у ніші, їх самовідновлення, проліферація і диференціювання регулюється безліччю сигналів, такими, як BMPs та їх антагоністами Noggin, FGF-2, EGF, Wnt/ β -катенін, Notch і Shh [119]. Самовідновлення НСК регулюється за допомогою Notch сигналінгу, у той час як мітогенний EGFR сигналінг впливає на проліферацію та міграцію НСК [101]. Aguirre та ін. показали, що Notch і EGFR контролюють кількість НСК та нейральних прогеніторних клітин (НПК) [4]. Транскрипційний фактор Dlx2 бере участь у нейрогенезі як під час ембріонального розвитку, так і у дорослому організмі, і експресується в клітинах типу С та нейробластах СВЗ [138]. На відміну від нейрогенних факторів, сигналінг від родини білків BMP (кістковий морфогенетичний білок) спрямовує НСК/НПК у гліальний напрямок диференціювання [177].

Wnt сигнальна система відіграє важливу і складну роль у регуляції активності НСК. У корі головного мозку стабілізована форма білка β -катенін сприяє або самовідновленню [49], або нейрональному диференціюванню клітин-попередників [31] залежно від того, коли β -катенін експресується під час кортикального розвитку [118]. Було також встановлено, що сигнали FGF модифікують реакцію кортикальних попередників на β -катенін, опосередковуючи перемикання від проліферації (в присутності FGF-2) на нейрональне диференціювання (у його відсутності) [131].

Цікавою особливістю нейрогенної ніші як у СВЗ, так і у СГЗ, є тісний зв'язок НСК із кровоносними судинами, через що її називають нейроваскулярною нішею [174]. Рясна васкуляризація нейрогенних ніш свідчить про те, що розчинні фактори, які виділяють ендотеліальні клітини, контролюють не лише ангіогенез, а також можуть стимулювати самовідновлення та нейрогенез ембріональних та дорослих НСК [220]. Наприклад, внутрішньошлуночкове введення судинного фактора росту ендотелію (VEGF), який є основним ангіогенним фактором і секретується ендотеліальними клітинами, підвищує проліферацію НСК у СВЗ і СГЗ [280]. Синергетична взаємодія між VEGF і FGF-2 сигналінгом може лежати в основі координації ангіогенезу і нейрогенезу в СВЗ і СГЗ [220]. Крім VEGF, ендотеліальні клітини продукують також інші сигнали, які впливають на НСК: Notch, FGF2, IGF1, PEDF, BDNF та ін. [234].

Нейроваскулярна ніша містить не лише НСК, але й різноманітні диференційовані клітини, такі як гліальні клітини, нейрони та екстрацелюлярний матрикс (ЕМ) [189]. Інтегральною частиною нейроваскулярної ніші є базальна мембрана (БМ) і компоненти екстрацелюлярного матриксу, які закріплюють клітини і забезпечують їх різноманітними факторами [189]. Регуляція функцій нейрогенної ніші відбувається також за рахунок білків ЕМ, які беруть участь як в

проліферації так і міграції НСК, а саме: колагену-1, тенасцину С, гепаран сульфат протеоглікану, хондроїтин сульфат протеоглікану, ламініну $\alpha 2$ та $\beta 1$ інтегринів [84]. Наприклад, гепаран сульфат протеоглікани зв'язують фактори росту (EGFs, FGFs, IGF-II, PDGF-AA і VEGF), морфогени і мітогени (BMP-2, -4, Shh і Wnts), хемокіни і цитокіни [84].

Було показано, що в нейроваскулярних нішах базальна мембрана формує розгалужені лабіринт-подібні структури – фрактони [74]. У СВЗ, фрактони вкривають усі типи клітин, у тому числі НСК, і сприяють проліферації клітин за рахунок зв'язування з позаклітинного середовища нейрогенних факторів, таких як FGF-2 [193].

1.1.2.3.1. FGF-2 сигналінг

Серед усього різноманіття родини FGF виділяють 10 факторів росту фіброblastів, які експресується в ЦНС, що розвивається, разом з чотирма FGF рецепторами (FGFR-1-4) [93]. Було показано, що члени родини FGF відіграють кілька ключових ролей в процесі формування ЦНС – від нейрональної індукції до термінального диференціювання [314]. Зокрема, FGF-8 може регулювати ростро-каудальну полярність під час формування середнього і заднього мозку, а також стимулювати проліферацію клітин [187].

Було показано, що FGF-2 експресується як у ембріональній, так і дорослій ЦНС, а також бере участь у розвитку мозку шляхом модуляції проліферації НСК і плюріпотентності [93]. FGF-2 експресується GFAP-позитивними стовбуровими клітинами і FGF-рецептори (FGFR-1 і FGFR-2) присутні на проліферуючих клітинах-попередниках та епендимocyтах [106].

Відомо, що FGF-2 відіграє значну роль у нейрогенезі в субвентрикулярній зоні (СВЗ) бічних шлуночків [162]. Показано, що після

внутрішньошлуночкового введення FGF-2 здатний збільшувати нейрогенез [299]. І навпаки, ін'єкції антитіл, що нейтралізують FGF-2, у бічний шлуночок дорослих щурів значно зменшувало проліферацію клітин-попередників у СВЗ [201].

Крім того, FGF-2 є потужним модулятором проліферації і диференціювання мультипотентних НСК/НПК у культурі [241]. Було показано, що надекспресія FGF-2 збільшує міграційну здатність трансплантованих НПК і сприяє утворенню навколосудинних кластерів [68]. Цей контакт НПК, що надекспресують FGF-2, з кровоносними судинами відіграє важливу роль у підтримці НПК у недиференційованому стані [68].

Ці дані свідчать про те, що трансформація нейральних прогеніторних клітин у напрямку надекспресії фактора росту фібробластів (FGF-2) може бути корисною стратегією для покращення інтеграції трансплантованих нейральних прогеніторів з судинами реципієнта, утворюючи тим самим судинні кластери з нейрогенним потенціалом для відновлення нервової тканини після ішемічного ушкодження мозку [68].

1.1.2.3.2. EMMPRIN сигналінг

Численні дослідження показали, що ішемія мозку викликає проліферацію нейральних прогеніторних клітин у СВЗ [333, 343]. Фундаментальне питання полягає в тому, чи зможуть новоутворені прогеніторні клітини мігрувати до місця пошкодження і замінити нейрони, які померли. Кількість робіт щодо такого нейронного самовідновлення в корі головного мозку дорослих ссавців обмежена [12]. Новоутворені НПК у СВЗ після ішемічного інсульту можуть бути потенційним джерелом нових нейронів у пошкодженій тканини, якщо вони зможуть мігрувати до ішемізованої ділянки. Підвищення міграційної здатності ендогенної

популяції нейральних прогеніторних клітин і створення таким чином пулу НПК в ішемізованій зоні, може мати великий потенціал для відновлення нервової тканини після ішемічного ушкодження мозку.

Було визначено кілька молекулярних сигналів, задіяних у регуляції міграції НПК в ушкодженому мозку, таких як ангіогенні фактори [330], хемокіни [246], екстрацелюлярний матрикс (ЕЦМ) і матриксні металопротеїнази (ММП) [170]. Було показано, що деградація ЕЦМ відіграє важливу роль у покращенні міграції прогеніторних клітин [281].

Сімейство ММП налічує більш ніж 20 ферментів, що секретуються або трансмембранних, які здатні деградувати різноманітні білки ЕЦМ. Впливаючи на білки ЕЦМ, ММП регулюють різні біологічні процеси, такі як міграція клітин та виживання [3]. Цікаво, що ММП беруть участь як у репаративних, так і патологічних процесах у центральній нервовій системі [335]. Оскільки ММП мають здатність деградувати майже всі типи матриксних компонентів, тому дія ММП дуже точно регулюється складними механізмами, в яких залучені цитокіни, фактори росту та ін. [95]. Тому ідентифікація глікопротеїну EMMPRIN, здатного індукувати експресію кількох ММП, нові можливості для регулювання активності ММП [110].

EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer – індуктор екстрацелюлярних матриксних металопротеїназ) – це трансмембранний глікопротеїн, який належить до сімейства імуноглобулінів і бере участь у численних фізіологічних та патологічних процесах [203]. Роль EMMPRIN як індуктора ММП при різноманітних онкологічних захворюваннях досліджена достанько добре, проте участь EMMPRIN у регуляції експресії ММП у ЦНС недостатньо досліджена [111].

1.1.3. Культура НСК

Суттєвим кроком у дослідженні нейральних прогеніторних клітин стало їх виділення і культивування. Культура нейральних стовбурових/прогеніторних клітин широко застосовується для вивчення характеристик цих клітин в контрольованих умовах, а також для дослідження клітинних і молекулярних механізмів розвитку захворювань ЦНС та розробки стратегій їх лікування.

Важливою властивістю НПК є здатність підтримувати проліферативну активність в умовах *in vitro*, що дозволяє нарощувати їх кількість в культурі. Хоча велика увага приділяється потенційному використанню НПК в клітинній терапії, культивування нейральних прогеніторів може бути також важливим для дослідження механізмів нейрогенезу в контрольованих умовах [28].

Нейральні прогеніторні клітини спочатку культивували як вільноплаваючі кулеподібні колонії (так звані нейросфери) у безсироватковому середовищі з додаванням різних ростових факторів, наприклад, епідермального фактору росту (EGF) [243]. Пізніше НПК почали вирощувати в моношарових культурах із використанням основного фактора росту фібробластів (bFGF-2) [222].

Моношарова (адгезивна) культура нейральних прогеніторів має кілька переваг порівняно із нейросферами. Така культура є однорідною популяцією недиференційованих прогеніторних клітин [16]. Клітини в адгезивній культурі можна легко моніторити, оцінювати морфологію й поведінку кожної клітини. Саме тому моношар НПК – це корисна модель для дослідження процесів міграції та диференціювання клітин і потенційне джерело для трансплантації клітин.

1.1.4. Трансплантація стовбурових клітин

Трансплантація (від лат. *transplantatio* – пересаджування) – пересадка реципієнту органа або іншого анатомічного матеріалу (трансплантата), а також клонованих тканин, штучних імплантатів.

Розрізняють такі види трансплантації:

- Аутологічна (від грец. αὐτός – сам) – донором трансплантата є сам реципієнт.
- Сингенна або ізогенна (від грец. ἴσος – подібний) – донором трансплантата є генетично і імунологічно ідентичний реципієнту близнюк.
- Алогенна (від грец. ἄλλος – інший) – донором трансплантата є організм того ж виду, що генетично і імунологічно відрізняється від реципієнта.
- Ксеногенна (від грец. ξένος – чужий), або міжвидова – донором трансплантата є інший біологічний вид.

Найбільш привабливою і перспективною серед різних видів трансплантації є аутологічна завдяки доступності застосування аутологічних клітин пацієнта, мінімальному ризику відторгнення трансплантату, безпеці і ефективності даного методу в лікуванні різних захворювань. Широко застосовується аутологічна трансплантація шкіри при важких опіках з непошкоджених ділянок на ушкоджені [259]. При лейкоміях, лімфомах і хіміочутливих злоякісних пухлинах після високодозової протипухлинної хіміотерапії використовують аутоотрансплантацію кісткового мозку або гемопоетичних стовбурових клітин [347].

Трансплантовані стовбурові клітини здатні розрізняти ділянки ушкодженої тканини, мігрувати у ці зони та диференціюватися у тип клітин, необхідний для відновлення втраченої функції.

1.2. Ішемічне пошкодження головного мозку

1.2.1. Загальні механізми ішемічного пошкодження головного мозку

Тканина головного мозку відрізняється від інших тканин високою чутливістю до порушень кровообігу. Ця специфіка пояснюється високим рівнем енергетичного обміну, властивим для цієї тканини. У разі зниження надходження глюкози головний мозок використовує вільну фракцію глікогену, повне окислення якого триває 5-7 хвилин. Вичерпання запасу поживних речовин призводить до ішемічного інсульту (фокальної ішемії) у разі знекровлення зони мозку, що належить до басейну блокованої артерії, та глобальної ішемії при припинення кровообігу по магістральних судинах головного мозку.

Ступінь ураження, спричиненого гострою фокальною ішемією головного мозку, залежить від ступеня й тривалості ослаблення кровообігу в останньому. В експериментах продемонстровано послідовність метаболічних відповідей тканини головного мозку щура на прогресуюче зниження кровообігу в ньому [123] (**Рис. 1.3**).

При сповільненні кровообігу до 70–80 % від нормального рівня (> 55 мл/100 г тканини головного мозку за хвилину, перший критичний рівень) пригнічується синтезу білків. К. Hossmann пояснює це дезінтеграцією рибосом. Такий процес відбувається на перших етапах ішемії головного мозку. У разі зниження кровообігу до 50 % від нормального значення (35 мл/100 г тканини головного мозку за хвилину, другий критичний рівень) активуються процеси гліколізу та збільшується концентрація лактату. Результатом цього стають ацидоз тканини та розвиток цитотоксичного набряку клітин.



***Рис. 1.3** Схема динаміки ішемічного ураження тканини головного мозку залежно від інтенсивності кровообігу в ній [123]*

Коли ж кровообіг знижується до 30 % від нормального значення (20 мл/100 г тканини головного мозку за хвилину, третій критичний рівень), припиняється синтез АТФ, що призводить до розвитку енергетичного дефіциту.

Зменшується фосфорилювання білків, які виконують функції каналів, унаслідок чого порушуються іонні градієнти. У результаті формується дисфункція каналів активного транспорту іонів, змінюється мембранний потенціал та відбувається масове вивільнення збуджувальних нейромедіаторів.

При зниженні кровообігу до 20 % від нормального рівня (10–15 мл/100 г тканини головного мозку за хвилину) втрачаються

трансмембранні іонні градієнти нейронів і відбувається аноксична деполяризація їх мембран [127]. Зміни метаболізму кисню та глюкози найсильніше виражені в центральній частині ішемізованої ділянки і найслабкіше – у прилеглих зонах.

У разі зниження кровообігу в головному мозку до нижнього порогу (< 10 мл/100 г тканини за хвилину) протягом 6–8 хвилин відбувається незворотнє пошкодження нейронів. Зона головного мозку, де це відбувається, називають ішемічним ядром [91]. Протягом кількох годин ішемічне ядро оточене ішемізованою, але живою тканиною, кровообіг у якій перевищує 20 мл/100 г тканини головного мозку за хвилину. Це так звана ішемічна пенумбра [127] (**Рис. 1.4**). Енергетичний обмін у нейронах деякою мірою зберігається, що сприяє їх виживанню. Водночас пригнічується їх функціональна активність [66]. Подальше ослаблення кровообігу призводить до поширення інфаркту в зону пенумбри.

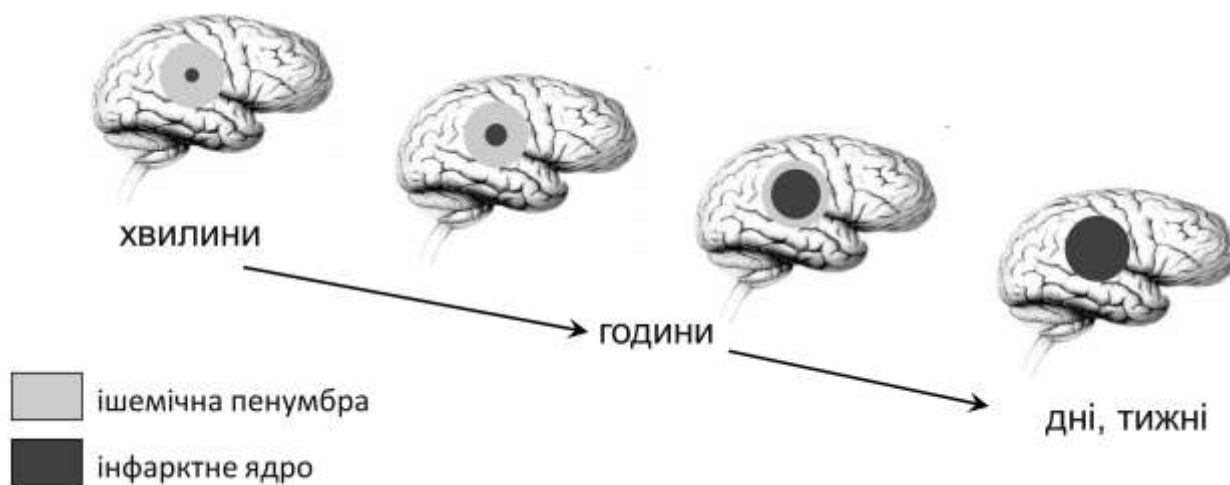


Рис.1.4. Формування ішемічної напівтіні (пенумбри) [127]

Пенумбра – це головна зона, на яку спрямовані терапевтичні впливи протягом перших годин та днів після ішемічного епізоду в тканині

головного мозку. Якщо оклюзія артерій має тимчасовий характер або якщо швидко активується мережа колатеральних судин, то кровообіг в ішемізованій зоні частково або повністю відновлюється. Зону пенумбри розглядають не тільки з позицій морфології. Тут відбувається динамічний процес, в якому порушення енергетичного обміну поширюється від ішемічного ядра до периферії [103]. Тривалість існування пенумбри залежить від стану конкретного організму й відображає часові межі (так зване терапевтичне вікно), коли медичне втручання найефективніше. Описані вище порушення найбільш виражені у фокусі ішемічного ураження. Ситуація дещо відмінна в зоні пенумбри. Процеси енергетичного обміну тут порушуються меншою мірою, однак ішемія запускає серію процесів у пенумбрі, які врешті-решт можуть призвести до загибелі клітин [182]. В експериментах на щурах і мишах показано, що для гострої фокальної ішемії терапевтичне вікно більш вузьке, ніж для глобальної ішемії, за якої тканину головного мозку можна врятувати, якщо лікування розпочати через добу після ішемічного епізоду [103]. Повний спектр змін морфологічних показників при інфаркті в головному мозку можна спостерігати через 48–72 годин після початку ішемії.

Тривалий дефіцит кровообігу викликає незворотні зміни у тканині головного мозку, які спричиняють порушення і смерть нервових клітин. Доведено, що первинним чинником ішемії є втрата кисню та енергетичних субстратів, зокрема глюкози. На відміну від глюкози, що має деякі альтернативи, кисень незамінний як кінцевий акцептор електронів у ланцюгу окислювального фосфорилування. Раптове зменшення перфузії головного мозку призводить до значного обмеження надходження в мозкову тканину основних енергетичних субстратів – кисню та глюкози. Це спричинює розвиток фазного процесу, результатом якого є зниження активності мітохондріального дихального ланцюга та синтезу АТФ [250].

Розвиток енергетичного дефіциту і лактат-ацидозу в умовах наростаючої до критичних значень ішемії мозкової тканини запускає низку патологічних реакцій, що відбуваються в усіх основних клітинних пулах ЦНС. Цим пояснюється значне зниження вироблення АТФ та витік електронів з електронотransпортного ланцюга, що породжує реакційноздатні сполуки кисню. Гліколіз, що триває, призводить до внутрішньоклітинного закислення, що порушує клітинні функцію більшою мірою [250].

Пригнічення енергетичного продукування в клітині призводить до порушення функції Na^+/K^+ -АТФазної ферментної системи з подальшим розладом трансмембранних іонних градієнтів. У результаті запускається каскад ушкоджувальних глутамат-кальцієвих реакцій, які відіграють головну роль у формуванні осередка некрозу в мозковій тканині під час ішемії [133].

Порушення активного іонного транспорту призводить до пасивного руху K^+ з клітин і Ca^{2+} в клітини, внаслідок чого відбуваються деполяризація клітинних мембран та подальше входження іонів Ca^{2+} в клітини через потенціал залежні кальцієві канали [133].

Накопичення H^+ у клітинах та ацидоз також призводять до значного вивільнення Ca^{2+} з органел. Зростання концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} у пресинаптичних нейронах викликає неспецифічне, нефізіологічне вивільнення збуджувальних амінокислот – глутамату та аспартату – в міжклітинний простір, одночасно з цим порушується зворотне захоплення глутамату. Глутамат та аспартат, що вивільняються у великій кількості, спричиняють перезбудження постсинаптичних рецепторів, це явище отримало назву ексайтотоксичність [22] (Рис. 1.5).

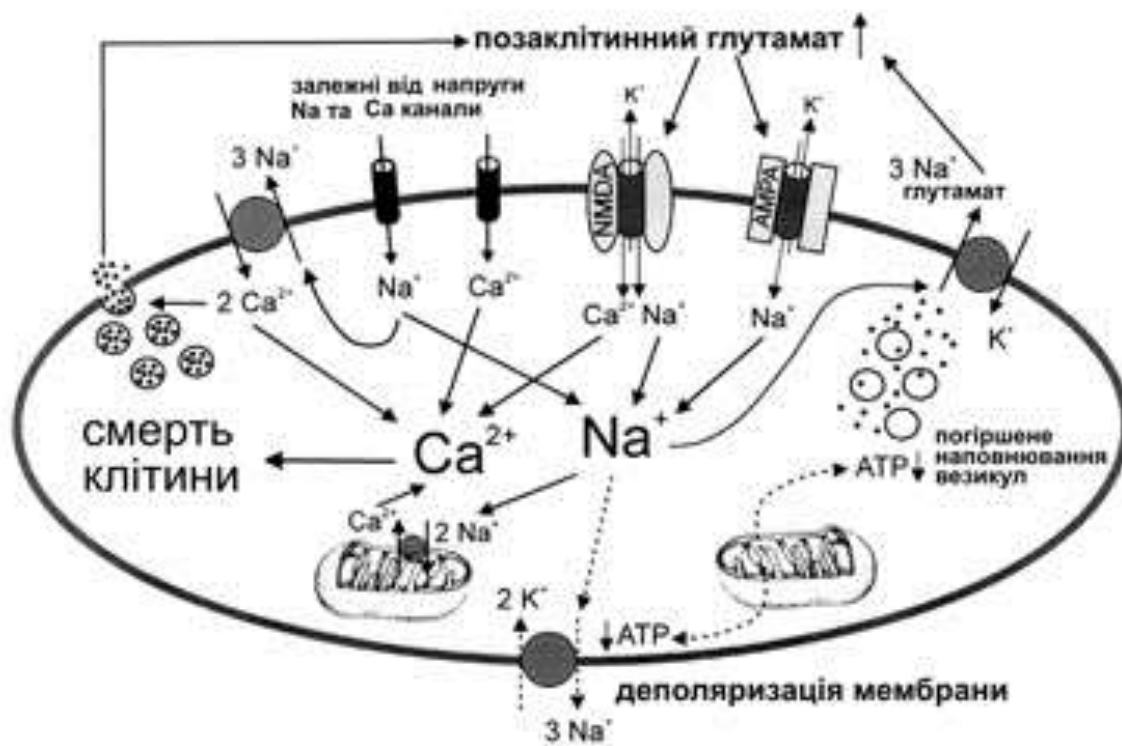


Рис.1.5. Схема механізму ексайтотоксичності (із сайту *Cell Biology of Disease and Exercise* <http://pt851.wikidot.com/stroke-cell-bio>).

Гіпотезу «ексайтотоксичної смерті нейронів» вперше висунув J. W. Olney, який експериментально встановив наявність цитотоксичних властивостей у збуджувальних аміноацидєргічних медіаторів – глутамату й аспартату. Основою феномену ексайтотоксичності (від англ. *excite* – збуджувати) є порушення проникності моноотропних рецепторів, які регулюють вміст іонів калію, натрію, хлору та кальцію у внутрішньоклітинному й позаклітинному просторах. Найчастіше активуються рецептори до N-метил-D-аспартату (NMDA-рецептори). Вони відіграють важливу роль у регуляції нейронної збудливості, синаптичної пластичності, а також у патогенезі епілепсії та судомних станів [218].

NMDA-рецептори є гетерогенною популяцією, яка містить іонотропні глутаматні рецептори й метаботропні рецептори, зв'язані з G-білком. Іонотропні рецептори відіграють головну роль у здійсненні

збуджувальної передачі в ЦНС, яка бере участь у запуску патобіохімічного каскаду під час гострої фокальної церебральної ішемії [213].

У фізіологічних умовах NMDA-рецептори активуються мілімолярними концентраціями глутамату, що міститься у синаптичній щілині, протягом кількох мілісекунд. За умов патологічної імпульсації рецептори активуються мікромоллярними концентраціями глутамату, але протягом значно тривалішого часу [42]. Perezбудження саме NMDA-рецепторів глутаматом призводить до "шокового" відкриття кальцієвих каналів і масивного припливу іонів Ca^{2+} у нейрони зі значним збільшенням його вмісту в клітинах.

Активування AMPA-рецепторів змінює проникність постсинаптичної мембрани для іонів K^+ , Na^+ , посилення входу Na^+ у клітину та короточасну деполяризацію постсинаптичної мембрани, що зумовлює додаткове збільшення припливу іонів Ca^{2+} у клітину через агоністозалежні (NMDA) та потенціалозалежні канали [324].

Надходження іонів Ca^{2+} усередину клітини через канали NMDA-рецепторів вважають ключовою подією в реалізації токсичних ефектів глутамату. Приплив іонів Na^+ супроводжується входженням у клітини води та іонів Cl^- . Це, у свою чергу, призводить до набухання апікальних дендритів та лізису нейронів [59]. У період наростання ішемії головного мозку ступінь вираженості деструктивних змін нейронів корелює з рівнем глутамату. "Кальцієве перевантаження" нейронів та активування кальційзалежних процесів (підвищення активності протеаз, кіназ, ендонуклеаз, ліпоксигеназ, фосфоліпази A2 та інших ферментів) призводить до значних змін у метаболізмі й генетичному апараті клітини, а також до неконтрольованої дії вільних радикалів, наслідком чого є незворотна загибель клітин [117].

Додатковим результатом активування NMDA-рецепторів є внутрішньоклітинне продукування активних форм кисню (АФК) перш за

все супероксид-аніонів та гідроксид-радикалів. Масове надходження іонів натрію та кальцію в клітини активує фосфоліпази та протеїнази, внаслідок чого утворюються цитокіни, простагландини, лейкотрієни, які спричиняють ушкодження цитоскелета та загибель клітин.

Крім впливу власне на клітину, прозапальні цитокіни, медіатори запалення, високоактивні вільні радикали та гострофазові астроцитарні білки негативно впливають на міжклітинні структури й судинну стінку. При цьому пошкоджується базальна судинна мембрана, щільні межендотеліальні контакти, сама ендотеліальна вистілка церебральних судин і як результат - розвиваються функціональні порушення гематоенцефалічного бар'єра [1].

За підвищення рівня іонів Ca^{2+} у цитоплазмі клітин неспецифічно активуються фосфоліпаза A2 та інші фосфоліпази, які посилюють ушкодження структурних фосфоліпідів мембран. Деструкція мембран нейронів у результаті активування клітинних ферментів призводить до інтенсифікації процесів вільнорадикального окислення та пероксидного окиснення ліпідів [37].

Особливо руйнівним є розщеплення фосфоліпідів у зовнішній клітинній мембрані та в мембранах внутрішньоклітинних органел. При цьому масово вивільнюється арахідонова кислота, метаболізм якої пов'язаний з утворенням простагландинів, тромбосанів, гідрокси- й гідропероксижирних кислот, лейкотрієнів, ліпопероксидів і реактивних вільних радикалів, що значно інтенсифікує процеси вільнорадикального окиснення і пероксидного окиснення ліпідів. Різке пришвидшення окиснювальних процесів призводить до розвитку оксидантного стресу, що є одним з універсальних механізмів ураження тканини організму, особлива небезпека розвитку якого в ЦНС визначається значною інтенсивністю окиснювального метаболізму мозку [46].

Серед чинників, що пришвидшують трансформацію фокальної церебральної ішемії в інфаркт, важливе значення мають місцеве запалення й аутоімунні реакції на специфічні антигени мозку.

Високі рівні внутрішньоклітинного кальцію запускають механізми клітинної смерті. Цей процес, відомий під назвою ексайтотоксичності, передбачає синергічну дію протеаз, АФК та перевантаження кальцієм [213] (**Рис 1.5**). Якщо ішемічний епізод відносно короткий, то клітинна смерть настає з відтермінуванням, в той час як тривала ішемія викликає ширші й швидші деструктивні зміни клітин. Повідомлялося, що помірна ішемія зумовлює потенціацію синаптичної передачі, а істотна ішемія - пригнічує її [140]. Деякі ділянки мозку з гіпокампом включно чутливіші за інші до ішемії. Структурні зміни, спричинені ішемією, на таких ділянках можна спостерігати на різних рівнях організації нервової тканини.

З метою вивчення цих змін були запропоновані різні *in vivo* [129] та *in vitro* [272] моделі. Зокрема, гризуни (щури, миші та піщанки) активно використовуються як *in vivo* моделі різних видів ішемії, оскільки в них нейробіологічні основи ішемічного ураження головного мозку схожі з людськими [298].

При моделюванні глобальної ішемії *in vivo* найчастіше використовують припинення кровопостачання всього головного мозку за допомогою чотири- або двосудинної оклюзії [192].

На моделях із чотирисудинною оклюзією найчастіше використовуються щури, а із двосудинною – піщанки. Піщанки – це вид тварин, який широко застосовують у світових наукових дослідженнях, оскільки саме у цих тварин коло Віллізія недорозвинуте і глобальна церебральна ішемія досягається шляхом перетискування лише обох загальних сонних артерій [67].

Крім того, було показано, що патобіохімічні процеси, які відбуваються при активації імунної системи людини на ішемічне ушкодження мозку, найбільш схожі з такими у піщанок, ніж у щурів [116].

1.2.2. Зміни у нейронах гіпокампа, що обумовлені ішемією

Гіпокамп відіграє важливу роль у процесах навчання і пам'яті, дефіцит яких часто виникає внаслідок інсультів та інших уражень головного мозку. До того ж чутливість гіпокампа до ішемії вища, ніж інших відділів мозку.

Власне гіпокамп людини (Амонів ріг) є тришаровою структурою давньої кори головного мозку. Він представлений переважно одним шаром клітин - пірамідних нейронів і двома сіткоподібними шарами, що знаходяться вгорі та внизу. Найліпшим чином його можна поділити на три окремі зони, які, згідно з номенклатурою, запропонованої Лоренцо де Но (1934), називають CA1, CA2, CA3. Зона CA3 з одного боку межує з хілузом зубчастої звивини, а з другого боку – з зоною CA2. Раніше також ідентифікували зону CA4. Однак, на сьогодні відсутні критерії та підстави для виділення її таку в окрему зону [8].

Зона CA3 найбільша у гіпокампі, повна товщина шару пірамідних клітин у її межах дорівнює 10 клітинам. Найважливішою характеристикою пірамідних клітин зони CA3 є та, що вони отримують іннервацію від моховитих волокон гранулярних клітин зубчастої звивини, що утворюють контакти на проксимальних дендрітах пірамідних клітин. Межа між зонами CA3 і CA2 нечітка.

Зона CA2 містить найкомпактніший шар пірамідних клітин, який повністю позбавлений іннервації з боку моховитих волокон гранулярних клітин та отримує іннервацію переважно з супраамілярної ділянки гіпоталамуса. Зона CA1 зазвичай описується як найскладніша за структурою частина гіпокампа, її зовнішній вигляд змінюється вздовж

поперечної та ростракаудальної осей. Межа між зонами CA1 і CA2 нечітка, на його іншому боці зона CA1 на відповідній відстані перекривається з субікулюмом. Товщина шару пірамідних клітин тут варіює від 10 до понад 30 клітин, 10% нейронів у цій зоні є інтернейронами [8].

У радіальному шарі (*stratum radiatum*) та висхідному шарі (*stratum oriens*), клітини зон CA3 і CA2 мають асоціативні зв'язки з іншими ростракаудальними рівнями гіпокампа, а також аферентацію від субкортикальних структур, таких як септальні ядра та супрамамілярна ділянка. Проекції пірамідних клітин зон CA3 і CA2 на зону CA1, які часто називають шаферівськими колатераліями, також завершуються у радіальному та висхідному шарах. Проекції з енторинальної кори на зубчасту звивину (перфорантний шлях) прямують до лакунозно-молекулярного шару (*stratum lacunosum-moleculare*), де їх волокна утворюють синаптичні контакти en passant з дистальними апікальними дендритами пірамідних клітин гіпокампа (**Рис. 1.6**) [8].

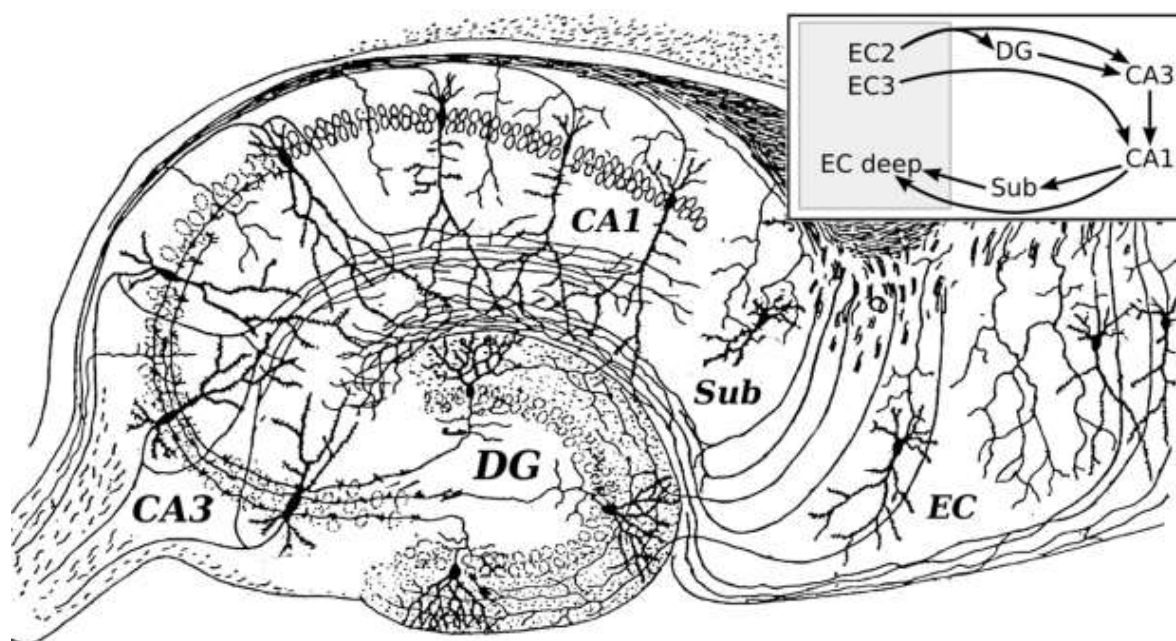


Рис. 1.6. Схематичне зображення гіпокампа (рисунок Рамона-і-Кахаля, 1911).

Глютамат та (або) аспартат вважають основними збуджувальними нейротрансмітерами для таких трьох шляхів гіпокампа: перфорантного шляху, що починається в енторинальній корі і закінчується переважно в зубчастій звивині; моховитих волокон, що йдуть від гранулярних клітин зубчастої звивини до пірамідних клітин зони СА3; шаферівських колатералей пірамідних клітин зони СА3, що утворюють контакти на пірамідних нейронах зони СА1 [8].

ГАМК-ергічні нейрони знаходять у глибині шару гранулярних клітин у зубчастій звивині (кошикові клітини), а найвища концентрація рецепторів до γ -аміномасляної кислоти (ГАМК) - у молекулярному шарі зубчастої звивини. У власне гіпокампі GAD (глютаматдекарбоксилаза)-імунопозитивні клітини містяться переважно у висхідному шарі, але їх також можна виявити в шарі пірамідних клітин і радіальному. У гіпокампі є багато нейронів, що містять різноманітні пептиди. У гранулярних клітинах зубчастої звивини знайдено опіоїдний пептид – динорфін, який також виявлено в моховитих волокнах, що йдуть до зони СА3, в той час як енкефалін або пов'язаний з ним пептид може міститись у волокнах, що йдуть з енторинальної кори. У молекулярному шарі зубчастої звивини й лакунозно-молекулярному шарі гіпокампа є щільна мережа соматостатин-позитивних волокон. Багато соматостатин-позитивних нейронів у поліморфному шарі зубчастої звивини, висхідному шарі амонічного рога та глибоких шарах енторинальної кори. Таку імунореактивність соматостатину можна виявити також у багатьох нейронах, що теж є GAD-імунопозитивними, а їх просторовий розподіл дуже подібний до розподілу нейронів, які містять нейропептид Y [8].

Ішемія головного мозку призводить до різних структурних змін нервових клітин. Електронно-мікроскопічні дослідження, що були проведені раніше, підтвердили швидке набухання мітохондрій, дезагрегацію полірибосом, зменшення шершавого ендоплазматичного

ретикулума (ЕПР) та апарату Гольджі у постішемичних нейронах гіпокампа. Відновлення цих клітин було пов'язано з істотним збільшенням гладенького ЕПР [229]. Ішемія спричинює значну втрату позаклітинної рідини та набухання клітин гіпокампа [161].

Ці дані підтверджуються результатами експериментів, згідно з якими об'ємна частка позаклітинного простору зменшується в 5 разів - з 20 до 4% [212]. Набухання мітохондрій - одна з початкових змін після ішемії. У помірних випадках набухлі мітохондрії доволі швидко відновлюють свою нормальну форму, в тяжких - ці органели демонструють конденсацію, збільшену щільність матриксу та появу депозитів електроннощільного матеріалу, після чого відбувається дезінтеграція мітохондрій [161].

Швидкоплинна ішемія дещо знижує активне дихання у мітохондріях, однак разом з підвищенням внутрішньоклітинного рівня кальцію призводить до дуже значних ефектів. Щоб стати медіатором ішемичного пошкодження, кальцій має швидко надійти в матрикс мітохондрії [258]. Спостерігаються зміни у контактних точках мембран, підвищується рівень цинку всередині мітохондрій, активуються великі, багатопровідні канали, що порушують функціональну цілісність зовнішньої мембрани мітохондрій у постішемичних нейронах гіпокампа [32].

Показано, що ішемія головного мозку пригнічує синтез білків. Збільшення кількості так званих стресових гранул – місць, у яких накопичуються елементи неактивного синтетичного апарату – спостерігали в інтервалі 10-90 хвилин реперфузії у деяких зонах гіпокампа щура [147]. Синтез білка у пенумбрі незворотно пригнічувався через декілька годин після ішемії [341]. У нейронах постішемичного гіпокампа було виявлене значне збільшення імунореактивності убіквітину – білка, що слугує маркером молекул, що призначені для гідролізу [109],

причому після ішемії він значною мірою зв'язується зі структурами білоксинтетичної системи клітин [341].

За умов ішемії порушується баланс між активністю протеаз і їхніх інгібіторів. Цитоплазматичні Ca^{2+} -залежні цистеїнові протеази, кальпаїни відіграють важливу роль у процесах ремоделювання цитоскелета та інших внутрішньоклітинних структур. Залежна від кальпаїнів деградація цитоскелета нейронів розпочинається дуже рано після ішемії, при цьому деградує фодрин [334], α -спектрин [210], белок MAP2 [40] та інші білки цитоскелета. Інша протеаза – каспаза-3 – активується переважно в апоптотичних нейронах [239]. У зоні CA1 постішемичного гіпокампа надекспресія каспази-3 пов'язана переважно з дегенеруючими пірамідними нейронами, що демонструють ознаки фрагментації ДНК. Пригнічення активності цього ферменту істотно зменшує кількість випадків смерті клітин, спричинених ішемією [47].

Відповідь тканини головного мозку на ішемію визначається, перш за все жорсткістю ішемії. Після жорсткої й довготривалої ішемії, тканина мозку швидко переходить у стан інфаркту. Якщо тривалість ішемії помірна, постраждала тканина набуває такого стану повільніше. Коли ішемічний стан дуже короткий, інфаркт тканини головного мозку може не виникнути взагалі. Замість цього, селективно ушкоджуються й гинуть нейрони, що належать до деяких груп, що вказує на їх підвищену чутливість до ішемії. Такі чутливі нейрони є в гіпокампі, стріатумі та корі головного мозку. Гіпокамп відомий своєю чутливістю до патологічних впливів, таких як ішемія та інші. У 1982 році проведені цікаві спостереження з тканиною головного мозку гризунів, підданою короткотривалій ішемії. У результаті, встановлено селективність загибелі пірамідних клітин зони CA1 гіпокампа. Детальний аналіз показав, що загибель нейронів є повільним процесом, що триває 2-3 доби, перш ніж

виникнуть кінцеві морфологічні зміни, тому цей феномен отримав назву "відтермінована клітинна смерть" [154].

Коли клітини перебувають у поганих умовах, вони зазвичай раніше або пізніше гинуть. Дуже несприятливі умови спричинюють швидку й пасивну деструкцію клітин, яка називають некрозом. Щойно некроз розпочався, він стає незворотним. Водночас у багатоклітинних організмах, у тому числі й організмі людини, часто спостерігають інший тип клітинної смерті. Для потреб органогенезу під час розвитку, а також для підтримання цілісності тіла багатоклітинні тварини мають відповідні молекулярні механізми, що допомагають їм позбутися небажаних клітин. Клітинну смерть, пов'язану з такими механізмами, називають програмованою, або апоптозом. Нині відомо, що апоптоз використовується для деструкції клітин у різних патологічних умовах, а відтермінована смерть нейронів у зоні CA1 може бути також результатом апоптозу.

З погляду морфології, відтермінована смерть нейронів має ознаки, спільні з апоптозом. Наприклад, нейрони, що гинуть такою смертю, формують апоптотичні тілець, які містять фрагментовані компоненти клітин [214]. Однак у них не виявляються інші характеристики апоптотичних клітин, такі як конденсація хроматину до ступеня, що спостерігається за типового апоптозу.

Ще однією ознакою апоптозу, властивою й ішемізованим нейронам зони CA1, є розрізання ДНК на нуклеосомні фрагменти. Для нейронів гіпокампа зони CA1, що гинуть за відтермінованою схемою, характерні східчаста форма електрофореграм і позитивне фарбування на TUNEL. Однак такі зміни можна також спостерігати за церебрального інфаркту, що розвивається після фокальної ішемії головного мозку, при якій нейрони гинуть за механізмом типового некрозу.

За використання молекулярно-біологічних методів дослідження накопичується дедалі більше даних про те, що механізми клітинної смерті,

які відбуваються за апоптозу, також відіграють значну роль у відтерміновані клітинної смерті. Наприклад, каспаза-3 - типовий ефектор апоптозу - активується в нейронах зони CA1 після ішемії, інгібітори каспази-3 мають протективний ефект на нейрони. Більше того, імуносупресанти циклоспорин А та FK506, які закривають транзиторні проникні пори мітохондрій, захищають нейрони зони CA1 від відтермінованої смерті [266]. Оскільки мітохондрії відіграють важливу роль в апоптозі, вважають, що деякі аспекти відтермінованої нейронної смерті мають спільні молекулярні механізми з апоптозом.

Тривала глобальна ішемія головного мозку спричинює загибель до 96 % нейронів у зоні CA1 на 4-ту добу [57]. Нейрони у пенумбрі гинуть повільніше - у діапазоні днів [341]. Відтермінована і швидка загибель нейронів передбачає подібну послідовність клітинних подій. Інтервал між ішемічним епізодом та смертю нейронів залежить від тяжкості та (або) тривалості ішемії [249].

Визначені популяції нейронів гіпокампа демонструють різну чутливість до ішемії [114]. Інтернейрони гіпокампа загалом стійкіші за пірамідні клітини до ексайтотоксичних впливів, можливо через відмінності в рівні експресії NMDA-рецепторів та (або) складі субодиниць [15]. Однак деякі інтернейрони чутливіші до ішемії ніж інші, зокрема соматостатин (SST)- та нейропептид Y (NPY)-позитивні інтернейрони, локалізовані у зубчастій фасції [167], кальретин-позитивні інтернейрони в зоні CA3 [125], та незначна кількість інтернейронів, розміщених у шарі моховитих волокон.

Сона SST-позитивних інтернейронів локалізована в хілусі, а їх відростки входять у зовнішній молекулярний шар, де завершуються на дендритах гранулярних клітин зубчастої фасції, які є поряд із входом перфорантного шляху. Ці інтернейрони, дуже чутливі до

ексайтотоксичності, зменшують вірогідність розвитку довготривалої потенціації (ДТП) [283].

Кальретин-позитивні інтернейрони зони СА3 відомі своїми характерними дендритами з великою кількістю шипиків, вони отримують більшу частину інервації від моховитих волокон. Згідно з наявними даними, дегенерація інтернейронів зони СА1 та пірамідних клітин зони СА3 може відбуватись вторинно по відношенню до смерті пірамідних нейронів зони СА1, що спричиненна ішемією [125].

На відміну від цього у гіпокампі ГАМК-ергічні інтернейрони, NPY-позитивні інтернейрони у зонах СА1 і СА3, а також парвальбумін-позитивні клітини виживають після ішемії [167]. Однак, змінена ГАМК – нейропередача може робити внесок у смерть нейронів, зумовлену ішемією, оскільки такі зміни сприяють збільшенню збудливості пірамідних клітин у зоні СА1 [340].

Механізми загибелі клітин, пов'язаної з ішемією, - некроз, апоптоз, аутофагію та гібридні форми клітинної смерті. Відмінності між апоптозом та некрозом все ще базуються переважно на морфологічних критеріях [186]. Некроз клітини ініціюється відхиленням від нормальної фізіології та починається з виснаження ресурсів АТФ та порушень проникності мембран. Потім настає пікноз клітинних ядер, а також порушується цілісність структури органел. Вивільнення фрагментів внутрішньоклітинних структур призводить до розвитку запальної реакції. На відміну від цього, апоптоз – це упорядкована серія змін у експресії генів та активності білків. Він починається з конденсації хроматину та дезінтеграції ядерець. Потім клітини, що помирають, фрагментуються з утворенням так званих апоптотичних тілець, а клітинні фрагменти фагоцитуються резидентними клітинами, які перебувають поруч, що, зазвичай, відбувається без виникнення гострого запалення.

Клітини, що гинуть за механізмом апоптозу, формують незначну кількість постішемичних нейронів, у той час як більшість нейронів гине за некротичним механізмом [202]. Активування білка phospho-c-Jun розглядають як ранню ознаку апоптозу нейронів у зоні CA1, а каспаза-3 активується в більшості апоптотичних клітин [202]. Вивільнення цитохрому *c* з мітохондрій до цитозолу вважається критичним етапом апоптотичної смерті нейронів у зоні CA1 після фокальної ішемії головного мозку [278].

Відомо, що смерть нейронів, пов'язана з ішемією, може містити елементи аутофагії – гомеостатичного процесу, що є необхідним для рециркулювання білків та пошкоджених органел. Продемонстровано, що фокальна ішемія асоційована з підвищеною експресією регулятора аутофагії Beclin1 та зміною розподілу всередині клітини маркера аутофагії LC3 [240].

Крім цього, виявлено, що деякі клітини в пенумбрі демонструють ознаки гібридних форм клітинної смерті, що комбінують апоптотичні й некротичні зміни: значне активування каспази-3, конденсацію/фрагментацію ядра, набухлу цитоплазму, ушкоджені органели, порушення мембран [326].

Цікаво, що помірною ішемією може стимулювати проліферацію клітин у субгранулярній зоні зубчастої фасції. Кількість ДНК-синтезуючих клітин, що експресують маркер нейральних стовбурових клітин/клітин-попередників, була значно більшою в цій зоні через 8 діб після ішемії [331]. Експресія індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) швидше за все необхідна для стимульованої ішемією проліферації клітин, так як остання не спостерігається після фокальної ішемії головного мозку в мутантній миші з відсутнім геном iNOS [345].

1.2.3. Зміни клітин інших типів у нервовій тканині головного мозку, пов'язані з ішемією

Незважаючи на те що дисфункція нейронів відіграє головну роль у механізмах ішемічного пошкодження головного мозку, клітини інших типів також дуже важливі в реакції на ішемічні інсульту (**Рис. 1.7**).

Нейрогліальні клітини – це велика популяція в мозку, чисельність яких у 10 разів більша, ніж нейронів. Основна відмінність гліальних клітин від нервових полягає в тому, що вони не беруть безпосередньої участі в синаптичній передачі та електричній сигналізації, допомагають формуванню синаптичних контактів, підтримують сигнальні властивості нейронів [150].

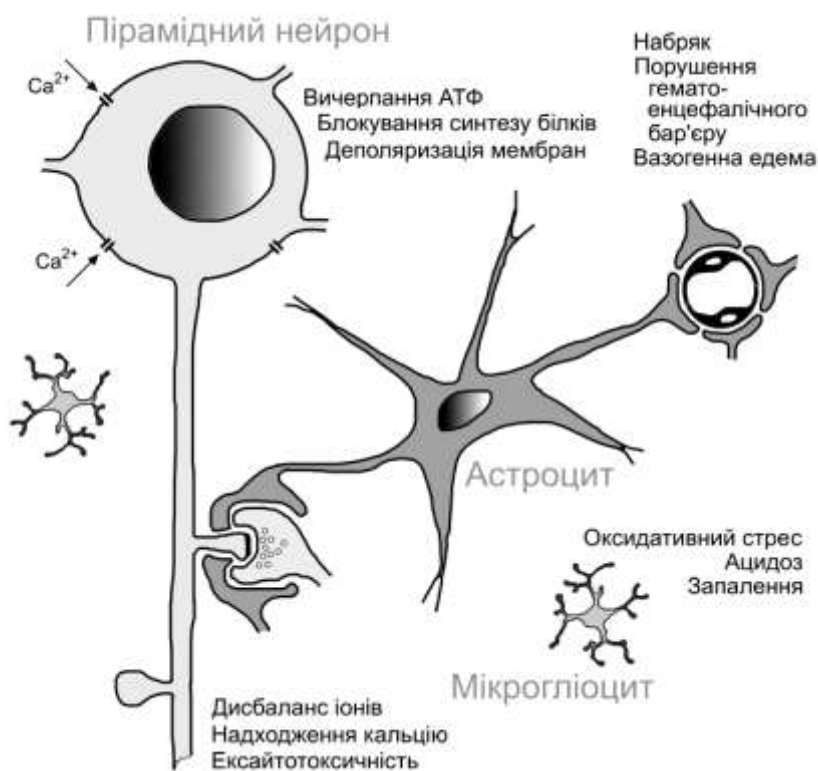


Рис. 1.7. Схема факторів, що визначають часову та просторову динаміку ішемічного ураження гіпокампа

У ЦНС є три типи гліальних клітин: астроцити, олігодендроцити, мікрогліальні клітини. Незважаючи на високій ступінь морфологічного і функціонального розмаїття, всі нейрогліальні клітини насамперед залучені до збереження гомеостазу нервової тканини [150].

Неврологічні хвороби – це втрата нервовою тканиною гомеостазу з тих чи інших причин – гострих (механічних або хімічних) уражень або тих, що є результатом хронічних процесів (дефекти розвитку чи нейродегенерації).

Гліальні клітини менш чутливі до ішемічного ушкодження, ніж нейрони. Наприклад, астроцити здатні підтримувати рівень АТФ довше, ніж нейрони; вони несуть на своїх мембранах меншу кількість іонотропних глутаматних рецепторів, можуть виявляти ліпшу буферну здатність щодо іонів та антиоксидантну активність. Астроцити – єдині клітини у тканині головного мозку, що накопичують глікоген. За ішемічних умов вони використовують його як тимчасовий заміник глюкози. Зрештою, вони можуть вивільнювати глутамат, *D*-серин, аденозин, які відіграють певну роль в ішемічному ураженні головного мозку [250].

Астроцити забезпечують метаболічну та трофічну підтримку нейронам, а також модулюють синаптичну активність, тому погіршення функцій цих клітин може чинити критично важливий вплив на виживання нейронів. Астроцити реагують на ішемію збільшенням кількості та розмірів паралельно з видовженням цитоплазматичних відростків [141], посиленням експресії гліального фібрилярного кислого білка (GFAP) проміжних філаментів [250], реорганізацією щілинних контактів, що створюють функціональний синцитій, та нетривалим накопиченням глікогену [141].

Деякі дані вказують, що ішемія сприяє поновленню в астроцитах експресії нексину – потужного інгібітора протеази, що стимулює ріст нейритів, який переважно локалізований у нюховій системі дорослої

тварини [122]. Тривала ішемія може спричинити апоптоз у астроцитах [336], однак згідно з іншими даними, ці клітини гинуть переважно за неапоптотичним механізмом [55].

Нещодавно отримано результати, які свідчать, що мікроглія здійснює моніторинг функціонального стану синапсів та робить внесок у плинність синаптичних контактів у тканині головного мозку, ураженій ішемією [321]. На відміну від астроцитів та мікроглії, ішемія призводить до значного зменшення кількості олігодендроцитів у гіпокампі [229].

Ішемія головного мозку також спричинює утворення численних мікроворсинок ендотеліоцитами, це може зумовити збільшення мікроваскулярного опору, що супроводжується помірними гемодинамічними порушеннями.

Ушкодження ендотеліоцитів призводить до агрегації тромбоцитів і формування запірних тромбів [72]. Прогресивне, асоційоване з ішемією набухання периваскулярних відростків астроцитів сприяє звуженню просвіту мікросудин [205]. Хронічна ішемія головного мозку може спричинити виникнення колатерального кровообігу з формуванням нових мікросудин в ішемічних ділянках головного мозку [282].

Пов'язане з ішемією збільшення продукування супероксидних радикал-аніонів призводить до розширення й аномальної реактивності судин, аномальну реактивність судин, порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єра [159], що може спричинити вазогенний набряк мозку.

Механізми запалення відіграють важливу роль у гостру фазу ішемії головного мозку. В подіях раннього ураження нервової тканини беруть участь кілька цитокінів та молекул клітинної адгезії, в той час як металопротеази задіяні в розвитку геморагічних перетворень [248]. Блокада рецепторів інтерлейкіну-1 (IL-1), як і нокаутна інактивація гена IL-1, значно зменшувала втрату нейронів після нетривалої ішемії. Відомі

дані щодо можливої дії IL-1 через вивільнення оксиду азоту, що пов'язано з активністю iNOS [196].

Показано також, що інтерлейкін-6 має трофічні ефекти на постішемні нейрони гіпокампа [190]. Інгібітор металопротеази істотно знижує асоційоване з ішемією ушкодження цих клітин. У миші з дефіцитом металопротеази-9 ішемічне ушкодження було значно меншим [171].

Після нетривалої глобальної ішемії головного мозку в піщанок відбувається двофазне підвищення рівня простагландину 2, що свідчить про участь ізоформ циклооксигенази у розвитку ішемічного пошкодження [43].

1.3. Використання НСК при ішемічному ушкодженні мозку

Для дослідження можливого регенеративного потенціалу СК широко використовують різні моделі ішемічного пошкодження мозку з подальшою їх трансплантацією. Ішемічне ураження головного мозку у мишей в експерименті дозволяє змодельовати наслідки ішемічного інсульту в людини [92], а трансплантація клітин різного походження з різним потенціалом диференціювання має на меті вивчення їх регенеративного потенціалу та загальних закономірностей функціонування у відновних процесах у вогнищі ішемії.

Важливим моментом під час вивчення шляхів розселення, диференціювання та можливого трансдиференціювання трансплантованих стовбурових клітин є їх ідентифікація в організмі реципієнта [200]. Для цього потрібен надійний маркер трансплантованих клітин. Такими маркерами можуть бути радіонукліди (^{99m}Tc), синтетичні аналоги нуклеотидів ДНК (бромдезоксіуридин – BrdU) тощо [60]. Але ці маркери не завжди стійкі та передбачають попередній вплив на організм донора або

культуру клітин для мічення їх безпосередньо перед процедурою трансплантації.

Раніше активно застосовували хромосомні маркери (виявлення Y-хромосоми у самок-реципієнтів клітин від самців, лінія мишей T6T6 тощо), але новим перспективним напрямком стало використання трансгенних мишей, клітини яких стійко експресують гени, відповідальні за продукцію нетипових для організму реципієнта білків (β -галактозидаза *E.coli*, флюоресцентні білки, зокрема зелений, жовтий, червоний), які можна виявляти імуногістохімічними або іншими методиками [87]. Так зелений флюоресцентний білок (від англ. green fluorescent protein – GFP) став важливим маркером для ідентифікації донорських клітин в організмі реципієнтів тварин різних класів за рахунок нетоксичності та можливості виявлення простими методами візуалізації без руйнування структури тканин [293].

Було показано, що через 8 тижнів після трансплантації нейроепітеліїподібних клітин людини, отриманих з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин, у мозок щурів після ішемічного ушкодження, трансплантовані GFP-позитивні клітини виживали, мігрували в зону ушкодження і диференціювалися в нейрони в мозку реципієнта [287].

У недиференційованому стані нейральні стовбурові клітини не експресують молекули головного комплексу гістосумісності МНС класів I і II на рівні, достатньому для індукції реакції імунного відторгнення [274]. Але це стосується лише низькодиференційованих нейральних прогеніторних клітин. Не всі нейральні стовбурові клітини в мозку реципієнта зберігаються в незрілому стані. Значна їх частина піддається процесу диференціювання, в процесі якого молекули МНС експресуються в повному обсязі.

Традиційною є точка зору, згідно з якою ЦНС є імунологічно привілейованою зоною, ізольованою від імунної системи гематоенцефалічним бар'єром, але є цілий ряд робіт, які свідчать про те, що ця точка зору не повною мірою відповідає сутності імунних процесів у мозку ссавців [165].

У даний час переконливо доведена можливість презентації антигенів у ЦНС принаймні трьома видами клітин. По-перше, це дендритні клітини кістково-мозкового походження, які локалізуються в головному мозку вздовж великих кровоносних судин і в білій речовині. По-друге, антигени здатні презентувати ендотеліальні клітини кровоносних судин мозку, причому в асоціації з антигенами МНС, що підтримує клональне зростання специфічних до цих антигенів Т-клітин. По-третє, в ролі антигенпрезентуючих агентів виступають клітини мікро- та астроглії. Беручи участь у формуванні імунної відповіді в ЦНС, астроцити набувають властивостей імуноефекторної клітини і експресують ряд антигенів, цитокінів і імуномодуляторів.

Отже, макрофаги і активовані клітини мікроглії реципієнта діють *in situ* як антигенпрезентуючі імуностимулюючі клітини, а підвищення експресії донорських антигенів МНС класу I підсилює кілерну активність цитотоксичних Т-лімфоцитів реципієнта [90].

Трансплантація ембріональної нервової тканини характеризується розвитком запалення за участю сенсibilізованих до антигенів мозку та активованих клітин, антитіл, а також внаслідок локальної продукції цитокінів [357]. Важливу роль при цьому відіграє попередня сенсibilізація організму до антигенів мозку, яка виникає в період розвитку захворювань ЦНС і може бути спрямована на антигени трансплантату. Саме тому реально тривале виживання гістонесумісних нейротрансплантатів досягається тільки шляхом супресії системи

імунітету за допомогою циклоспорину А [273] або введення моноклональних антитіл до CD4⁺-лімфоцитів реципієнта [128].

Епігенетична стимуляція і подальша іморталізація дозволяють отримати проліферуючі клітини, вже комітовані до нейронального фенотипу. Це обмеження можна подолати отриманням нейрональних попередників від тотипотентних ембріональної СК. У цьому випадку проліферація до отримання будь-якої бажаної кількості клітин відбувається до нейронального диференціювання, і розмноження клітин швидко конвертуються в нейрональний фенотип. Таким чином, *in vitro* диференціювання ембріональних СК у нейрональні попередники дозволяє отримати невичерпне джерело нейрональних СК.

Ембріональні СК ізолюють з внутрішньої клітинної маси бластоцисти; в присутності LIF вони здатні до необмеженого поділу і при цьому зберігають тотипотентність. Нейрональне диференціювання ембріональних СК *in vitro* індукує ретиноева кислота. Після трансплантації в стріатум, пошкоджений квіноліном і 6-гідроксидопаміном, ці клітини можуть диференціюватися в допамінергічні і серотонінергічні нейрони.

Один з ефективних способів отримання нейрональних попередників з ембріональних СК описаний О. Brüstle [39]. Спочатку клітинну масу ембріональних СК нарощують у присутності LIF; після перенесення в середовище, що не містить LIF, починається процес диференціювання. Клітини агрегуються, формуючи ембріональні тільця. Далі ембріональні тільця поміщають в середовище, яке сприятиме збереженню нейрональних попередників, а потім індукують проліферацію нейрональних СК у присутності FGF-2. Видалення мітогенного фактора стимулює диференціювання нейрональних СК в нейрони і глію. Після інтравентрикулярного введення в головний мозок ембріона щура нейрональні попередники (нащадки ембріональних СК) залишають шлуночок і мігрують у різні ділянки мозку реципієнта, в тому числі кору,

стріатум, септум, таламус, гіпоталамус і мозочок. Клітини, що залишаються у шлуночках, формують епітеліальні структури, що нагадують нервову трубку, а також окремі островці ненеурональної тканини. Клітини донора, які потрапили в паренхіму мозку реципієнта, формують усі 3 основні типи клітин нервової системи [39].

Таким чином, нейрональні прогеніторні клітини, отримані з ембріональних СК *in vitro*, здатні адекватно реагувати на сигнали з мікрооточення, що спрямовують регіональну міграцію і диференціювання, і можуть забезпечувати багато ділянок мозку, що розвивається, нейронами і глією.

Слід підкреслити, що успіх стратегії отримання нейрональних СК та інших нейрональних попередників з ембріональних СК залежить винятково від можливості отримання високоочищених нейрональних СК. Недиференційовані ембріональні СК при трансплантації дорослому імунокомпетентному реципієнту можуть утворювати тератоми і тератокарциноми [63]. Навіть дуже незначна домішка низькодиференційованих клітин у суспензії клітин донора може призвести до туморогенності трансплантату або до індукції ненеурональної тканини.

Таким чином, для використання ембріональних СК як альтернативного джерела донорської тканини необхідно отримати гомогенні популяції нейрональних клітин-попередників. Це можливо при забезпеченні зовнішніх сигналів, що визначають специфічний нейрональний фенотип протягом нормального ембріогенезу.

Інший підхід полягає в елімінації небажаних клітинних популяцій шляхом лінійспецифічної селекції [173]. При встановленні гена резистентності до неоміцину в локус *Soc* з подальшою індукцією диференціювання ембріональних СК і селекцією на середовищі, що містить G418, Sox-негативні клітини елімінуються і зберігається тільки популяція нейрональних клітин. При цьому залишається невирішеним

питання, чи дійсно клітини, селектовані на даний момент, вже експресують гени, специфічні для нейрональних субпопуляцій і досить зрілі, щоб мігрувати і інтегруватися в структури головного мозку реципієнта.

Підбір мікрооточення у реципієнта – інша важлива попередня умова культивування клітин-попередників з ембріональних СК для отримання донорського матеріалу. Через недостатню експозицію з паренхімою мозку може відбуватися збій програми нейронального диференціювання з формуванням структур, характерних для нервової трубки [39].

Інше джерело нейрональних попередників було виявлено в кістковому мозку [78]. Нещодавно доведено існування мезенхімальної СК, що дає початок всім типам клітин сполучної тканини. Представлені в стромі кісткового мозку мезенхімальні СК за певних умов також можуть зазнавати нейронального диференціювання. Стромальні клітини кісткового мозку людини і миші, культивовані *in vitro* в присутності GDNF and NT-3, експресують маркер нейрональних попередників нестин. У певних умовах культивування з'являлися клітини з маркерами глії (CFAP) і нейронів (MAP-2) [346]. Встановлено, що після трансплантації в боковий шлуночок мозку сингенних новонароджених мишей високоочищені промарковані мезенхімальні СК кісткового мозку мігрують, розміщуючись в передньому мозку і мозочку, не порушуючи цілісної архітекτονіки мозку реципієнта. Частина мезенхімальних СК диференціюється в зрілі астроцити в смугастому тілі і молекулярному шарі гіпокампа. Це дало підставу використовувати мезенхімальні СК як клітинні вектори для лікування захворювань центральної нервової системи. Мезенхімальні СК з кісткового мозку людини можуть диференціюватися в макроглію *in vitro* і після трансплантації інтегруватися в структури головного мозку щура. Подібним чином мезенхімальні СК, виділені з кісткового мозку людини і

трансплантовані в гіпокамп дорослих щурів, мігрують в паренхіму мозку і диференціюються в нейрони і глію [254].

Нейральні стовбурові клітини можуть бути використані для відновлення функцій головного мозку після перенесеного інсульту. Відкриття та ідентифікація нейральних стовбурових клітин дає, щонайменше, два шляхи вирішення проблеми інсульту: (1) вивчення можливостей впливати на інтенсивність поділу нейрональних стовбурових клітин хворого; (2) нейротрансплантація стовбурових клітин донора.

Основною проблемою в лікуванні мозкових інсультів є лізис нервової тканини головного мозку і утворення гліального рубця. Останній ускладнює репарацію аксо- і дендро-нейрональних зв'язків, залишає вкрай мало шансів на відновлення втрачених у результаті інсульту функцій і на тривалий термін зберігає той чи інший рівень неврологічного дефіциту. Нейральні стовбурові клітини після трансплантації мігрують в пошкоджену ділянку й надалі розвиваються як нормальні клітини мозку. Якщо з'ясується, що такі клітини не тільки фізично заміщають дефект, а й беруть на себе функцію пошкоджених клітин, це може стати проривом у лікуванні наслідків інсультів у людини.

За даними Г. Стейнберга, при введенні стовбурових клітин безпосередньо в зону інсульту вони гинули, оскільки кровопостачання ураженої ділянки було порушено [254]. Якщо ж клітини вводилися в сусідні ділянки, то вони не тільки приживалися, але і мігрували до зони інсульту. Г. Стейнберг вважає, що з пошкодженої ділянки надходить своєрідний "сигнал лиха", який "закликає" стовбурові клітини. На підтвердження цього наводиться той факт, що у здорових щурів стовбурові клітини мігрували лише на відстань 0,2 мм, а у щурів, що перенесли інсульт, – на 1,2 мм [254].

Уперше трансплантацію в головний мозок людини нейральних клітин, виділених з лінії тератокарциноми (NT2N) виконали в 1998 році в

Медичному центрі Піттсбурзького університету [33]. У 2002 році дослідження показали, що нейрони, отримані з тератокарциноми, виживають в мозку людини більше 2-х років після трансплантації, без злоякісного переродження [209].

Дослідницькою групою Savitz-Caplan був апробований метод ксенотрансплантації фетальних нейронів свині, але FDA призупинила ці випробування в США після завершення I фази [256].

Вважають, що міграцією незрілих нервових клітин, які заміщають загині нейрони в пошкоджених областях, керують білки, які продукуються ендотелієм нових судин: стромальний фактор-1 (SDF-1) і ангіопоетин-1 (Ang-1). Дослідники з Тайваню в результаті рандомізованих клінічних випробувань показали, що застосування гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (G-CSF) у гострій фазі ішемічного інсульту веде до покращення стану пацієнтів. Як відомо, G-CSF мобілізує стовбурові клітини і має протизапальну і нейропротекторну дію.

Компанія Stem Cell Therapeutics (Канада) оголосила про позитивні результати II фази клінічних випробувань при лікуванні гострого інсульту з використанням методу мобілізації власних стовбурових клітин.

Було запропоновано дослідження й інших препаратів на основі ростових факторів, але, наприклад, біотехнологічна компанія Wyeth-Ayerst Laboratories and Scios (США) призупинила клінічні випробування фактора росту фібробластів для лікування інсульту, оскільки його молекули не проникали через гематоенцефалічний бар'єр.

Компанія ReNeuron Group (США) розпочала в 2009 році клінічні випробування клітинного препарату ReN001 на основі стандартизованої лінійної культури нейронів для лікування ішемічного інсульту. Подібний проект заплановано також компанією NeuroGeneration (США).

Враховуючи ряд етичних та імунологічних обмежень щодо застосування фетальних клітин, а також технологічні труднощі виділення дорослих нейральних стовбурових клітин, увагу дослідників привернула можливість впливати на вогнище інсульту за допомогою інших типів стовбурових клітин. Поруч з іншими типами клітин (ембріональні стовбурові, нейрональні стовбурові, модифіковані лінії клітин) як потенційне джерело клітин для нейротрансплантації у пошкоджений мозок розглядаються й мезенхімальні стовбурові клітини [342]. У дослідженнях Jim Kohyama було показано, що нейрональне диференціювання можна отримати при культивуванні клітин строми кісткового мозку в середовищі зі специфічними індукторами на субстраті з фібронектину та орнітину. Нейрони та глія, отримані з кістковомозкової строми, формували аксони, експресували нейрон-специфічні маркери (MAP-2, NF, Nestin, GFAP) та відповідали на деполяризуючі стимули як функціонуючі зрілі нейрони. Трансдиференціювання клітин строми кісткового мозку в цьому експерименті було отримане внаслідок дії на клітини Noggin-агентом [156]. Активна участь приватних біотехнологічних компаній в аналогічних проектах підтверджує не лише соціальну, а й економічну значимість очікуваних результатів. Більшість з цих компаній працюють в США: Advanced Cell Technology, VistaGen Therapeutics, Inc., ViaCell, Inc., Medistem Inc., Osiris Therapeutics, Inc.

Таким чином, перші отримані результати клінічних випробувань способу лікування наслідків ішемічного інсульту методом трансплантації нейральних стовбурових свідчить про позитивний ефект даного методу і вимагають подальших більш тривалих спостережень.

1.3.1. Використання НСК при перинатальній патології ЦНС

Діти з перинатальною патологією ЦНС мають високий ризик розвитку фізичних, інтелектуальних та емоційних порушень. Групу

синдромів, які виникли в результаті недорозвинення або пошкодження мозку в пренатальний, інтранатальний та ранній постнатальний періоди, об'єднує термін «дитячий церебральний параліч» (ДЦП). Існує безліч можливих причин ДЦП, основними з яких є гіпоксично-ішемічні ураження головного мозку, аутоімунні механізми в системі мати-плід, внутрішньоутробні інфекції, особливо вірусні, та ін. Останнім часом істотну роль у патогенезі ДЦП надають нейроімунному конфлікту в системі мати-плід, що призводить до порушення розвитку як ЦНС, так і імунокомпетентних систем плода [155, 322].

Найбільший відновлюваний ефект слід очікувати від реабілітаційних заходів, які повинні бути проведені в перші місяці життя таких немовлят. Використання лікарських препаратів у терапії ЦНС, особливо на ранніх стадіях захворювання, здатне порушити складний взаємозв'язок компенсаторно-приспосувальних процесів у організмі дитини і нерідко призводить до виникнення ускладнень, що унеможлиблює подальше проведення медикаментозної терапії. Тому актуальним є пошук немедикаментозних методів корекції ушкоджених функцій ЦНС, які б дозволили підвищити ефективність терапії шляхом стимуляції природних механізмів відновлення, легко комбінувалися б з іншими, традиційно застосовуваними методиками й не спричиняли небажаних наслідків.

Зараз активно вивчаються можливості застосування клітинної терапії з використанням стовбурових клітин різного генезу у лікуванні і реабілітації пацієнтів з перинатальною патологією ЦНС [317]. Ця патологія є цікавою для досліджень з використанням стовбурових клітин з кількох причин. По-перше, клітинна терапія при перинатальній патології ЦНС може бути зроблена на ранніх стадіях розвитку, коли незрілий мозок є більш сприйнятливим середовищем для приживлення трансплантата. По-друге, оскільки при перинатальному пошкодженні ЦНС уражаються

декілька типів клітин, то лікування стовбуровими клітинами має величезний потенціал.

Як діючий агент планується використання стовбурових клітин з різних джерел та різного ступеня диференціювання - від ембріональних і фетальних клітин до клітин дорослого організму [323]. При цьому відкритим залишається питання не тільки про допоміжну роль клітин трансплантату в регенерації, але і про можливість трансдиференціювання інших, відмінних від нейральних стовбурових клітин, наприклад мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК), в нейрони або нейроглію [130].

ММСК мають тропність до зони пошкодження та можуть впливати на перебіг процесів аутозапалення і репарації в ній. Показано, що ММСК мають особливу властивість пригнічувати надмірні запальні процеси та підтримувати гомеостаз імунної системи за рахунок фізичних та/або хімічних взаємодій з клітинами імунної системи [5]. Вони забезпечують толерантність імунної системи реципієнта до алогенних клітин, власне для самих себе. При цьому використання аутологічних ММСК дозволило б вирішити питання імунологічної сумісності трансплантованого матеріалу і тестування його на інфекції, а також уникнути етичних та юридичних проблем з приводу фетального донорського матеріалу [50].

Перспективним є використання ММСК жирової клітковини для регенерації нервової тканини завдяки їх нейрогенному потенціалу, більш вираженому, ніж у ММСК кісткового мозку. Вже на 4-у добу культивування цих клітин від приматів з нейротрофічним фактором головного мозку BDNF, FGF-2 і EGF починають формуватися нейросфери [143]. Через 30 діб культивування в присутності BDNF і ретиноєвої кислоти більше половини клітин морфологічно, імунофенотипово та електрофізіологічно вже подібні до нейронів [9].

При трансплантації ММСК жирової клітковини на моделі геморагічного інсульту у щурів довготривало послаблюється неврологічний дефіцит і знижується атрофія мозку [151]. При цьому зростає клітинна проліферація і кількість дрібних судин, істотно обмежується зона ішемічного інфаркту мозку.

Багато дослідників вважають, що нейропротекторні властивості ММСК реалізуються не прямо через диференціювання, а паракринно за рахунок трофічних факторів і активації клітин реципієнта. Так, кондиційне середовище з ММСК захищає культуру мозочкових гранулярних нейронів від індукованого апоптозу шляхом активації каспаз-3 [325].

На моделі аутоімунного енцефаломієліту міграція ММСК в демієлінізовані ділянки супроводжується збільшенням числа ендогенних олігодендроцитів [58].

Також показано, що покращення моторних функцій у щурів з моделлю пошкодження спинного мозку при внутрішньовенній трансплантації попередників олігодендроцитів з ММСК супроводжувалося їх міграцією в пошкоджену ділянку і диференціюванням в нейрони та глію [144].

В експерименті на собаках ММСК жирової клітковини сприяли морфологічному і функціональному відновленню пошкоджень спинного мозку і самі експресували гліальні маркери GFAP, β -тубулін-3 і нейрофіламенти NF160 [252].

Група з медичного коледжу Джорджії та Університету Південної Флориди показали, що внутрішньовенне введення стовбурових клітин з пуповинної крові при одночасному введенні з манітолом суттєво зменшує обсяг уражень, до яких призводить інсульт. Введені клітини мігрували в головний мозок, переважно в зону ураження, і диференціювалися в нейрони і клітини глії. Внутрішньовенне введення клітин виявилось більш ефективним.

На противагу, дослідження з трансплантації клітин пуповинної крові, виконане Borlongan на моделі інсульту, вказує, що клітини не мігрують через гематоенцефалічний бар'єр, а лише стимулюють ендогенний нейро- і ангиогенез [34]. Інші дослідники підтвердили, що ММСК продукують високий рівень цитокінів, які залучені в процеси проліферації клітин та регенерації тканин, таких як IGF-1 (insulin-like growth factor-1), VEGF-a (vascular endothelial growth factor-a), SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) та еритропоетин [71, 175]. Подібні механізми ефектів ММСК показані і при внутрішньовенній трансплантації у тварин з моделлю пошкодження спинного мозку.

Проте, впровадження в клінічну практику методик трансплантації стовбурових клітин має базуватися на глибокому розумінні механізмів їх функціонування та достатньому експериментальному матеріалі. Вивчення зазначеного кола питань можливе в умовах експериментальної трансплантації із залученням адекватних моделей патології у лабораторних тварин. Перинатальне ушкодження головного мозку у мишей в експерименті дозволяє змодельовати перинатальну патологію ЦНС людини [56], а трансплантація клітин різного походження з різним потенціалом диференціювання має на меті вивчення їх регенеративного потенціалу та загальних закономірностей участі у відновних процесах після ішемічного ушкодження та запалення.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

Усі експерименти на тваринах виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях [83], статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки, прийнятими в установах Національної академії наук України.

В експериментах використовували піщанок монгольських (*Meriones unguiculatus*), щурів ліній Спрейг-Доулі (Sprague Dawley), Вістар (Wistar) та атимічних голих щурів (Charles River), мишей лінії FVB "дикого" типу та FVB-C-Tg (GFPU) 5Nagy/J, трансгенних за зеленим флюоресцентним білком (GFP), які утримувались за стандартних умов та раціону харчування з вільним доступом до води.

Дослідження впливу трансплантації стовбурових клітин після ішемічного ушкодження головного мозку проводили в гіпокампі та соматосенсорній корі (ССК) дорослих та новонароджених тварин.

Гіпокамп. Як об'єкт досліджень, нами був обраний гіпокамп – структура мозку, відповідальна за процеси формування пам'яті та навчання, і нейрони якого, особливо в зоні CA1, є надзвичайно чутливими до нестачі кисню, порівняно з іншими структурами мозку [328]. Окрім того, популяція нервових та гліальних клітин в гіпокампі завдяки специфічному розташуванню є найбільш придатною системою для кількісної оцінки структурних змін при ішемії мозку [153].

Результати дослідження мікроскопічної будови гіпокампа інтактних тварин наведено на **Рис. 2.1**.

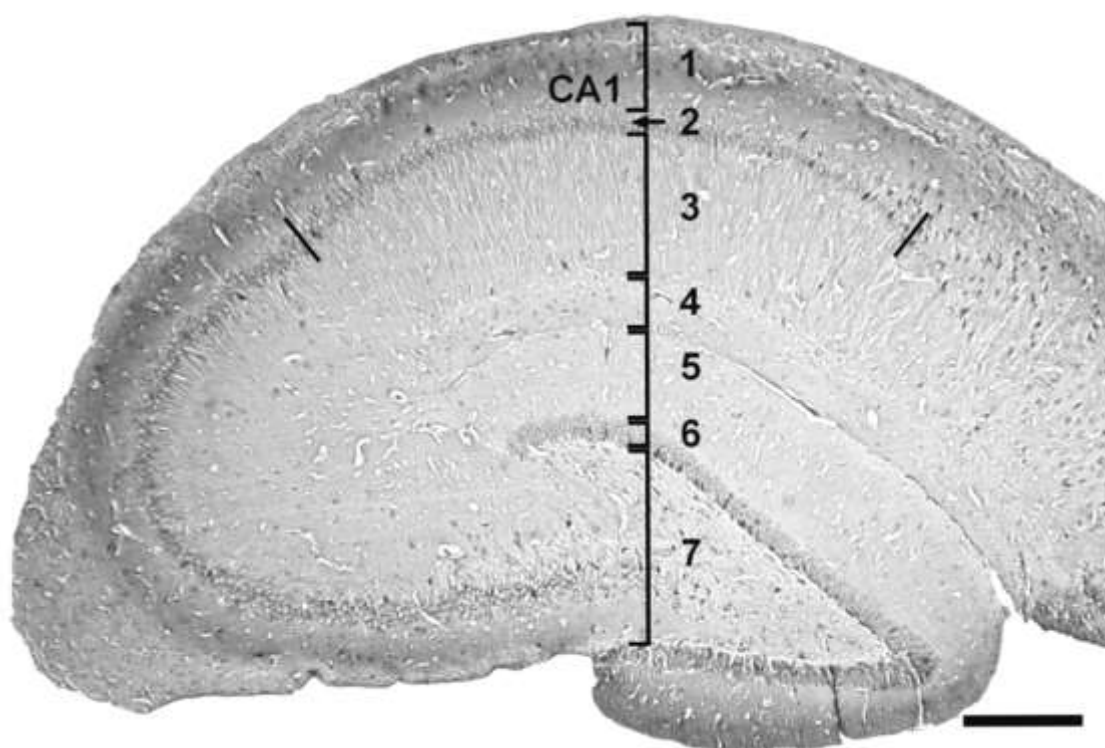


Рис. 2.1. Мікрофотографія гіпокампа піщанки монгольської (*Meriones unguiculatus*). CA1 зона гіпокампа позначена радіальними рисками. 1 – альвеус і висхідний шар, 2 – пірамідний шар, 3 – променистий шар, 4 – лакунозно-молекулярний шар, 5 – молекулярний шар зубчастої звивини, 6 – гранулярний шар зубчастої звивини, 7 – ворота зубчастої звивини. Шкала = 500 мкм.

У CA1-зоні гіпокампа розрізняють такі шари: *alveus*, утворений аксонами пірамідних клітин; *stratum oriens* (висхідний шар), утворений базальними дендритами пірамідних клітин; *stratum pyramidale* (пірамідний шар), що містить тіла пірамідних клітин; *stratum radiatum* (променистий шар), утворений нерозгалуженими волокнами апікальних дендритів; і *stratum lacunosum-moleculare* (лакунозно-молекулярний шар), утворений розгалуженими частинами та тонкими закінченнями апікальних дендритів пірамідних клітин (**Рис. 2.1**).

Зубчаста звивина містить внутрішній гранулярний та зовнішній молекулярний шари, взаємно розташовані V-подібно, у вигляді двох прямих «плечей». Гранулярний шар містить компактно розташовані у 4–6 шарів гранулярні клітини, морфологічно подібні до пірамідних клітин СА1-зони, однак дещо менших розмірів.

Соматосенсорна кора (ССК) – це сенсорний аналізатор вищого рівня, що забезпечує формування пропріоцептивної чутливості, яка регулює положення та рухи опорно-рухової системи організму, а також всі види шкірної чутливості (тактильну, температурну, больову або ноцицептивну) [211].

Соматосенсорна кора, як і інший неокортекс, має шарувату структуру. Як і в іншій сенсорній корі (зоровій або слуховій), таламічні шляхи закінчуються в IV шарі, який, в свою чергу, проектується в інші шари. У соматосенсорній корі розрізняють первинну (S1) і вторинну (S2) зони (**Рис. 2.2**) [86].

Первинна соматосенсорна кора має вигляд смужки сірої речовини і розташована в постцентральной звивині [261]. S1 має проєкції шкірної чутливості протилежного боку тіла від тактильних, больових, температурних рецепторів, а також інтероцептивної і пропріоцептивної чутливості від м'язових, сухожильних і суглобових рецепторів.

Шар VI первинної соматосенсорної зони характеризується високою щільністю гранулярних клітин, які мають тісні зворотні зв'язки з ядрами таламуса, через які надходить сенсорна інформація до кори від усіх рецепторів, крім нюхової сигналізації.

Структурною особливістю S1 зони те, що сусідні ділянки на поверхні кори представляють сусідні ділянки поверхні тіла [86].

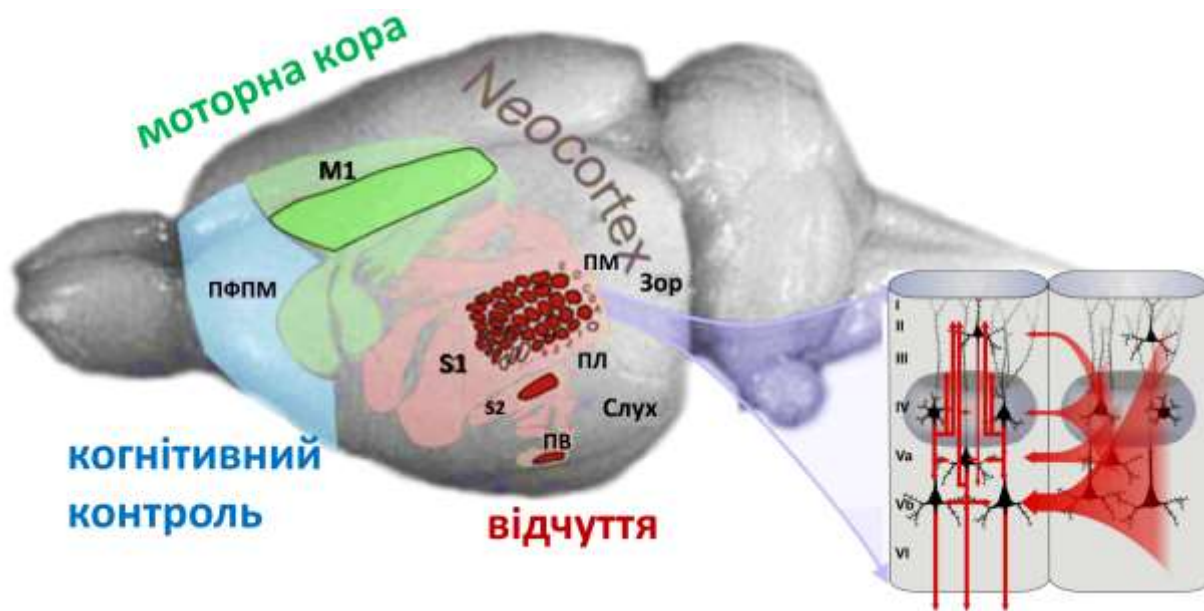


Рис. 2.2. Схематичне зображення соматосенсорної кори щура (модифіковано з [261]). Справа схематично зображені вертикальні колонки розташування нейронів, кожна з яких отримує сенсорну специфічну інформацію певної модальності. ПВ - парієтально-вентральна, ПЛ - парієтально-латеральна, ПМ - парієтально-медіальна ділянки кори; ПФПМ - префронтальна/премоторна зона; Зор - зорова кора; Слух - слухова кора; M1 - моторна кора; S1 – первинна соматосенсорна кора; S2 - вторинна соматосенсорна кора.

Вторинна зона соматосенсорної кори є частиною тім'яної долі і бере участь у сенсорній та моторній координації обох сторін тіла. Локалізація проєкцій тіла у вторинній соматосенсорній зоні менш чітка, і сигнали надходить сюди як від контрлатеральної, так і від іпсилатеральної півкулі. Ураження S2 зони призводить до розладу аналізу та синтезу різних шкірно-кінестетичних відчуттів [261].

S1-нейрони соматосенсорної кори згруповані разом з аналогічними входами в елементарні функціональні одиниці - колонки, які орієнтовані перпендикулярно до поверхні кори (**Рис. 2.2**). Колонка - це

елементарний блок кори, в якій обробляється інформація від рецепторів однієї модальності [261].

Одна колонка охоплює площу поверхні приблизно 300 мкм на 300 мкм, містить близько 10 000 збуджувальних та гальмівних нейронів та визначається горизонтальним поширенням терміналей аферентних таламокортикальних аксонів і вертикальною орієнтацією дендритів пірамідних клітин (**Рис. 2.2**) [216].

Кожна функціональна колонка соматосенсорної кори має кілька морфологічних мікромодулів, які поєднують невелику сукупність нейронів. Основним типом збуджувальних нейронів є пірамідні клітини, апікальні дендрити яких максимально зближені й утворюють дендритний пучок, а аксони формують зворотні колатералі, що може забезпечувати і полегшувати впливи в межах мікромодуля і гальмівні взаємодії між мікромодулями [86].

Збуджувальні нейрони використовують L-глютамат як основний нейромедіатор, а гальмівні інтернейрони - гамма-аміномасляну кислоту (ГАМК). Основними типами гальмівних інтернейронів неокортекса є кошикові клітини та клітини-канделябри [44].

Кількістний аналіз клітинного складу показав, що залежно від ділянки соматосенсорної кори близько 75–85 % нейронів - це збуджувальні нейрони, а 12–25 % - ГАМКергічні інтернейрони [19].

2.2. Виділення та культивування стовбурових клітин

2.2.1. Отримання та кріоконсервація фетальної нервової тканини щурів

Фетальну нервову тканину (ФНТ) виділяли з головного мозку плодів щурів 15–16 днів гестації. Отриману тканину головного мозку

промивали стерильним середовищем DMEM/F12 (Sigma, США) та механічно дезагрегували. Отриману суспензію фільтрували через стерильний нейлоновий клітинний фільтр з діаметром пор 40 мкм (BD Falcon, США). Отриманий осад клітин ресуспендували в середовищі DMEM/F12, що містило 0,6 % глюкози, 2 mM глютаміну, 3 mM бікарбонату натрію.

Отриману суспензію кріоконсервували в полікарбонатному контейнері для заморожування Nalgene Mr. Frosty (Sigma, США) зі швидкістю 1 °C /хв до – 80 °C у кріоконтейнерах (Corning, США) під захистом 10 % ДМСО в середовищі DMEM/F12 (Sigma, США). При цьому кінцева концентрація клітин суспензії становила 4×10^6 /мл, а їх об'єм – 200 мкл. Через добу ФНТ, заморожені до -80 °C, поміщали в рідкий азот ($t = -196$ °C). Відігрівання клітин проводили на водяній бані при 40 °C. Після відігрівання з метою відмивання від ДМСО до всіх проб із клітинами додавали 10-кратну кількість середовища DMEM/F12, та центрифугували при 100 g протягом 3 хв.

2.2.2. Отримання суспензії клітин гіпокампа фетального мозку щурів

Для отримання суспензії клітин гіпокампа фетального мозку (СКФМ) щурів відбирали вагітних самок на 18–19 добу після спарювання. Під інтраперитонеальним наркозом кетаміном у поєднанні з ксилазином плоди виділяли з матки та плідних міхурів. Після цього плоди відділяли від плацент і переносили у р-н Хенкса, що не містив Ca^{2+} та Mg^{2+} (Sigma, США), а також 0,6 % глюкози, 10 mM HEPES. Потім плоди декапітували, відокремлювали півкулі головного мозку, з яких поетапно виділяли CA1-зони та зародкові зубчасті звивини гіпокампа.

Отримані фрагменти тканини піддавали механічній дисоціації піпетками Пастера змінних діаметрів у об'ємі 2,0 мл. Життєздатність клітин суспензії оцінювали шляхом підрахунку кількості живих клітин у камері Горяєва після забарвлення розчином трипанового синього, її значення становило $70 \pm 8 \%$. Перед введенням СКФМ ресуспендували до концентрації 10 000 живих клітин/мкл.

2.2.3. Адгезивна культура нейральних прогеніторних клітин з фетального гіпокампа миші

У стерильних умовах з мозку плодів 17–18 доби ембріонального розвитку від мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за GFP, виділяли гіпокампи [301]. Фетальну нервову тканину механічно дисоціювали за допомогою Пастерівських піпеток різного діаметру у середовищі Neurobasal (Gibco).

Отриману суспензію клітин пропускали через нейлонові клітинні фільтри («Falcon», США) з діаметром пор 40 мкм. Очищену фракцію нейральних прогеніторних клітин (НПК) отримували центрифугуванням суспензії клітин у градієнті щільності (22 % розчин Percoll).

Відсоток життєздатних клітин у суспензії визначали методом проточної цитометрії за допомогою лазерного цитофлюориметра-сортера FACS Aria («Becton Dickinson», США) після інкубації суспензії клітин з 7-аміноактиноміцином (7-AAD). НПК висаджували у 35-мм чашки Петрі, покриті матриксом Matrigel (BD Matrigel™, США), зі щільністю 3×10^5 клітин у 2 мл культурального середовища (КС). У КС додавали фактор росту фіброblastів (FGF-2) із розрахунку 20 нг на 1 мл середовища.

Культивували клітини в CO₂-інкубаторі при 37 °C і 5% CO₂. Культуральне середовище змінювали кожні 3 дні.

2.2.4. Адгезивна культура нейральних прогеніторних клітин з субвентрикулярної зони новонароджених щурів

Первинні культури НПК були отримані з субвентрикулярної зони (SV3) мозку новонароджених (P0) щурів лінії Спрейг-Доулі (Sprague Dawley) [136]. SV3 біла відпрепарована з фронтальних зрізів мозку новонароджених щурів, механічно дисоційована і трипсинізована. Очищену суспензію НПК отримували шляхом центрифугування у 22 % розчині Percoll [136]. Отриману суспензію НПК висівали з щільністю 4×10^5 клітин на 35-мм культуральну чашку Петрі, вкриту Matrigel (1:500). Клітини культивували в середовищі Neurobasal (Invitrogen, Carlsbad, CA), з додаванням 20 нг/мл FGF-2 людини (рекомбінантний, R&D, Міннеаполіс), 2 % B27 Supplement (Invitrogen), 2 мМ L-глутаміну, 1 мМ пірувату натрію, 2 мМ N-ацетил-цистеїну і 1 % пеніциліну-стрептоміцину. На третю добу культивування середовище замінювали на свіже, що містило 20 нг/мл FGF-2 та контрольний або FGF-2 лентівірусний вектор. Перед трансплантацією клітини трипсинізували на 5-ту добу культивування, центрифугували і ресуспендували в середовищі Neurobasal.

2.2.5. Адгезивна культура мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) з жирової клітковини або плаценти GFP-позитивних мишей

Жирова клітковина мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за геном GFP, була використана для отримання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК). Клітинна суспензія культивувалась у повному поживному середовищі DMEM-LG, яке містило 15 % FBS, антибіотики (пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)), 1:100 замінні амінокислоти

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі 37 °C.

Для трансплантації використовували клітини 2-3 пасажів. Пасажування проводили при досягненні 80 % конфлюентності моношару.

Для отримання ММСК плаценти використовували плоди мишей 18-19 доби (E18-E19) ембріонального розвитку. Миші на 18–19 добу вагітності піддавалися евтаназії шляхом цервікальної дислокації. В стерильних умовах видаляли матку разом з ембріонами, переносили їх у чашку Петрі, наповнену охолодженим розчином HBSS, доповненим антибіотиками (пеніцилін 100 од./мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, (Sigma-Aldrich, USA)). Потім в іншій чашці Петрі, яка містила HBSS з 5 % фетальної бичачої сироватки (ФБС), плаценту відокремлювали від децидуальної оболонки, механічно подрібнювали та інкубували в 0,1 % розчині колагенази (Sigma-Aldrich, USA) при 37 °C на шейкері упродовж 60 хв. По досягненні однорідної суспензії колагеназу інгібували додаванням середовища DMEM-LG (Sigma-Aldrich, USA), яке містило 10 % FBS. Отриману суспензію клітин пропускали через 70 мкм клітинний фільтр (BD Falcon, MD, USA) з наступним дворазовим центрифугуванням в повному середовищі DMEM-LG, яке містило 10 % FBS та антибіотики.

У подальшому клітинна суспензія культивувалась у повному поживному середовищі DMEM-LG, яке містило 15 % ФБС, антибіотики (пеніцилін 100 од./мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)), 1:100 nonessential amino acids (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі 37 °C.

Для трансплантації використовували клітини 2–3 пасажів.

2.2.6. Фенотипічна характеристика культури ММСК

Визначали фенотипічні характеристики культивованих ММСК методом проточної цитометрії. Клітини були переведені з адгезивного стану в суспензію за допомогою розчину трипсину і розподілені в пробірки по 500 тис. клітин. До тестових зразків клітин були внесені моноклональні антитіла проти поверхневих антигенів CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117 в робочій концентрації 0,5 мкг/мл, кон'юговані з флюорохромами. Після інкубації протягом 30 хвилин та двократного відмивання клітин від розчину антитіл проведено вимірювання рівнів флюоресценції клітинної суспензії на лазерному проточному цитофлюориметрі-сортері для визначення відносної кількості клітин з певним поверхневим маркером та з комбінацією маркерів. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флюорохромів при багатопараметричному аналізі використано контрольні зразки клітин без внесення антитіл (unstaining control), зразки з кожним з антитіл окремо (single staining control) і зразки з комбінацією кількох антитіл без одного (fluorescence minus one – FMO control). Як ізотип-контроль використано Ig аналогічного ізотипу моноклонального антитіла, кон'югований з відповідним флюорохромом.

Відсоток загиблих та життєздатних ММСК визначали за рівнем проникнення в клітини з пошкодженою мембраною 7-аміноактиноміцину D.

Для підтвердження мультипотених властивостей ММСК їх було направлено диференційовано в остеогенному, адипогенному та хондрогенному напрямках. Для остеогенного диференціювання середовище, в якому культивувалися ММСК, замінювали на остеоіндуктивне, яке містило 10 % ФБС, 0,05 мМ L-аскорбінової кислоти 2-фосфату, 100 нМ дексаметазону та 10 мМ β -гліцерофосфату.

2.2.7. Органотипова культура зрізів головного мозку новонароджених щурів

Органотипову культуру зрізів головного мозку отримували з новонароджених (P3) щурів Вістар. Після швидкої декапітації виділяли мізки і на вібраторі Vibratome 1500 (Vibratome, St. Louis) нарізали корональні або сагітальні зрізи завтовшки 200–300 мкм в охолодженому розчині Hank's BSS (3-02P02-K, Amimed).

Зрізи спочатку промивали в середовищі для виділення (10 mM Tris, 1×minimum essential medium (MEM), 1% пеніцилін-стрептоміцину) протягом 5 хв на льоду, а потім висаджували зрізи на пористі нітроцелюлозні вставки (Millicell-CM, Millipore) і культивували при 37 °C і 5 % CO₂ в 60 × 15 мм чашках Петрі, що містили 5 мл культурального середовища з сироваткою (25% кінської сироватки, 0,5 × MEM, 5mM Tris, 25 % Hank's BSS, 6 % розчин NaHCO₃ і 1 % пеніцилін-стрептоміцину). Через 6 годин культуральне середовище з сироваткою замінювали безсироваткове середовище (Neurobasal (Invitrogen) з додаванням B27, 200 mM L-глутаміну, 1 M N-ацетил-цистеїну, 1 M Na-пірувату, 1% пеніцилін-стрептоміцин).

НПК, трансдуковані лентивірусними векторами EMMPRIN-GFP або контрольним GFP, концентрували до 50 × 10³ клітин/мкл і приблизно 0,5 мкл GFP-позитивної клітинної суспензії наносили на органотипові зрізи головного мозку. Зрізи інкубували при 37 °C протягом 90 годин з подальшою фіксацією у 4 %-му розчині формальдегіду протягом 24 год при температурі 4 °C.

Нанесені GFP-позитивні клітини візуалізували за допомогою імуногістохімічного фарбування на GFP та аналізували 3-D розподіл клітин у зрізі головного мозку з використанням конфокальної мікроскопії у режимі серії «оптичних» зрізів за віссю z з інтервалами 10 мкм.

Підраховували 3167 GFP-позитивні клітини, трансдуковані контрольним лентівірусом, та 3548 – EMMPRIN-GFP.

2.2.8. Отримання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин людини

Дозволи на процедури щипкової біопсії шкіри людини, отримання і культивування фібробластів людини та їх експериментального використання були отримані у Lund University Hospital відповідно до основних принципів, затверджених Lund Ethical Committee, а також були отримані письмові інформовані згоди від кожного донора.

Для отримання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (іПСК) людини використовували метод ретровірусної трансдукції. Ретровірусні часточки для трансдукції отримували за допомогою трансфекції епітеліальних клітини PhoenixGP (ATCC, кат. №3514) плазмідами, що кодують вірусний глікопротеїн VSV-G (Addgene, кат. № 12259) і репрограмуючі фактори: Oct4, Sox2, Klf4 і c-Myc (Addgene, кат. №17217-17220). Отриманими ретровірусними часточками двічі трансдукували культуру фібробластів шкіри людини. Після трансдукції клітини висаджували у культуральні плашки, які містили мишачі ембріональні фібробласти. На 6 добу після трансдукції культуральне середовище було замінено на середовище для культивування іПСК людини, що містило DMEM/F12 та 0,1 мМ замінних амінокислот, 1 мМ L-глютаміну, 0,1 мМ β -меркаптоетанолу і 50 нг/мл FGF-2 (Life Technologies), а потім середовище змінювалося через день. Через чотири тижні після трансдукції вручну відбирали колонії з морфологією плюрипотентних стовбурових клітин для подальших маніпуляцій.

2.2.9. Нейронне диференціювання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин людини

Колонії іПСК людини були відокремлені від шару кишачих ембріональних фібробластів за допомогою колагенази (Life Technologies). Формування ембріональних тілець (ЕТ) індукували шляхом посіву колоній на неадгезивні культуральні чашки, які містили середовище для культивування іПСК людини без додавання FGF-2. Половину культурального середовища міняли кожен другий день і на 5 добу ЕТ висівали у культуральні плашки, покриті 0,1 мг/мл полі-L-орнітином (Sigma).

Структури у вигляді нейрональних розеток починали з'являтися через 1 тиждень після посіву. Розетки були акуратно зібрані за допомогою голки, і ізольовані кластери були перенесені у неадгезивні культуральні плашки з DMEM F12, 2 mM L-глутаміну, 1,6 г/л глюкози і N2 (1:100) (Life Technologies).

Через 2 доби для отримання довготривалих ліній нейроепітеліїподібних стовбурових клітин, плаваючі розетки дисоціювали з використанням трипсину з подальшим гальмуванням дії трипсину інгібітором трипсину (Life Technologies).

Клітини центрифугували протягом 5 хвилин при 300 g і висівали у культуральні плашки, покриті полі-L-орнітином і 10 мкг/мл ламініном (Sigma) у тому ж середовищі з додаванням 10 нг/мл FGF-2, 10 нг/мл EGF (R&D Systems, Міннеаполіс, США) та 1 мкл/мл B27 (Life Technologies).

Нейральні прогеніторні клітини, отримані з іПСК, пасажували в співвідношенні 1:2–1:3 кожен другу або третю добу з використанням трипсину (Sigma).

2.2.10. Конструювання лентивірусних векторів та трансдукція нейральних прогеніторних клітин

Векторні системи поділяють на вірусні та невірусні. Вірусні вектори зарекомендували себе як найбільш перспективні інструменти біотехнології. Лентивіруси належить до ретровірусів і характеризуються більш тривалим інкубаційним періодом і здатні переносити довгі фрагменти генетичної інформації в геном інфікованої клітини. Лентивірусні вектори засновані переважно на вірусі імунодефіциту людини (ВІЛ), здатні переносити гени в постмітотичні клітини як *in vitro*, так і *in vivo*, тривалий час експресують трансген та мають низьку імуногенність [124]. Для трансдукції НПК було створено дві конструкції на основі лентивірусних векторів:

1) pWPI_SPbFGF лентивірусний вектор, який кодує фактор росту фібробластів FGF-2. кДНК, що кодує FGF-2 людини (18 кДа), була сполучена з сигнальним пептидом імуноглобуліну (IgSP), який покращує секрецію FGF-2 [245]. Отриману конструкцію клонували в біцистронний лентивірусний вектор pWPI. pWPI - це SIN вектор, отриманий з ВІЛ-1, що містить альфа промотор EF1 і цистрон EMCV-IRES-GFP. FGF-2 був клонований в сайт PmeI, розташований між EF1 альфа промотором і послідовністю IRES-GFP (Рис. 2.3).

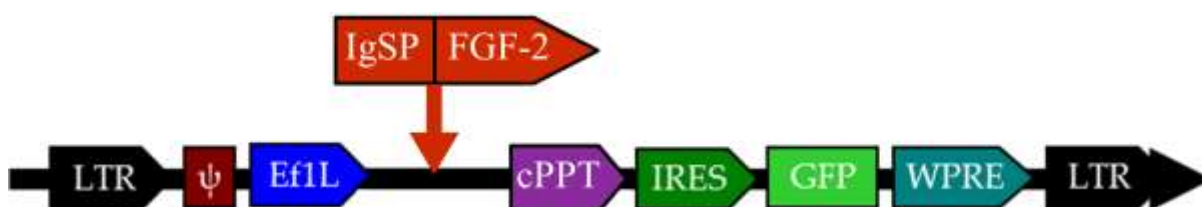


Рис. 2.3. Схематичне зображення конструкції лентивірусного вектора pWPI_SPbFGF.

У контрольному лентивірусному векторі pFUGW експресія GFP була під контролем промотора убіквітину.

2) Для створення **EMMPRIN** лентивірусного вектора використовували кДНК, що кодує EMMPRIN людини (28 кДа). кДНК була люб'язно надана професором Jian Cao (Stony Brook University). кДНК клонували в лентивірусний вектор pWPI, що містив альфа промотор EF1 і цистрон EMCV-IRES-GFP/Tomato (**Рис. 2.4**). У контрольному лентивірусному векторі pFUGW експресія GFP була під контролем промотора убіквітину.

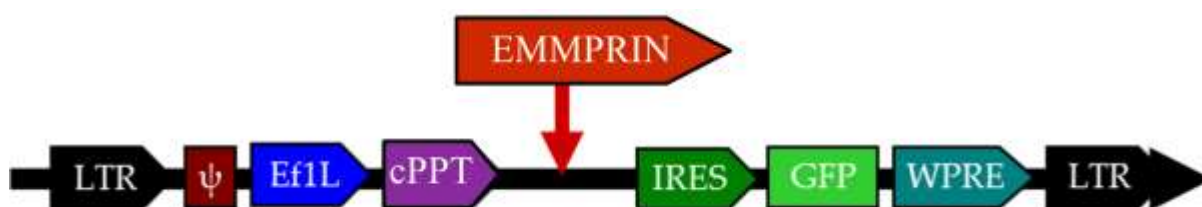


Рис. 2.4. Схематичне зображення конструкції лентивірусного вектора EMMPRIN.

Лентивірусні вектори були сконструйовані, концентровані і титровані відповідно до стандартних протоколів. Контрольні та FGF-2 лентивірусні вектори мали титри в діапазоні від 10^8 до 10^9 трансдукуючих одиниць (ТО)/мл.

НПК (50 000–75 000 клітин на 35 мм чашку Петрі) трансдукували на третю добу культивування контрольним або FGF-2 лентивірусними векторами у концентрації від 5×10^4 до 5×10^5 ТО.

2.2.11. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією

Сумарну РНК екстрагували з адгезивної культури НПК щура за допомогою системи очищення РНК RNeasy (Qiagen, Німеччина), використовуючи інструкцію виробника. Концентрацію РНК та її чистоту визначали шляхом вимірювання оптичної щільності (ОЩ) на довжинах хвиль 260 і 280 нм з використанням BioPhotometer (Eppendorf, Гамбург, Німеччина). Ампліфікацію проводили за допомогою пари специфічних праймерів. Були використані такі праймери: MMP-2 (прямий: 5'-CTG CCC CGA GAC CGC TAT G-3'; зворотний: 5'-GGG GCC AGT ACC AGT GTC AGT-3') з утворенням амплікону довжиною 385 п.о. (п.о. – пара основ двох нуклеотидів на комплементарних ланцюжках нуклеїнових кислот); MMP-3 (прямий: 5'-TGG ATT CTG CCA TTG AGA GAG C-3'; зворотний: 5'-AGA ACA AGA CTT CTC CCC GCA G-3') з утворенням амплікону довжиною 535 п.о.; MMP-7 (прямий: 5'-TCA TAA TTG GCT TCG CAA GGG-3'; зворотний: 5'-TGC TGG TGT CTG TCG TGT TAC CTG-3') з утворенням амплікону довжиною 490 п.о.; MMP-9 (прямий: 5'-GCC TGT GGT TGG TCA GAA G-3'; зворотний: 5'-GCT GTT TCC CCT GTG AGT G-3') з утворенням амплікону довжиною 682 п.о.; MMP-10 (прямий: 5'-GGG ACC AAT TTA TTC CTG GTT GC-3'; зворотний: 5'-GCT GCA TCA ATC TTC TTC ACG G-3') з утворенням амплікону довжиною 545 п.о.; MMP-11 (прямий: 5'-AAG GGA GGT CTT GGG CTG A-3'; зворотний: 5'-GTG CTG GGA AGA GGG AAG G-3') з утворенням амплікону довжиною 434 п.о.; MMP-13 (прямий: 5'-TCA CCT GAT TCT TGG GTG CT-3'; зворотний: 5'-AGC ATG AAA GGG TGG TCT CA-3') з утворенням амплікону довжиною 776 п.о.; MMP-14 (прямий: 5'-GAC ATC TTC TTG GTG GCT GTG C-3'; зворотний: 5'-ATC AAT CTT GTC CGT GGG CAG TCC-3') з утворенням амплікону довжиною 555 п.о.; MMP-16 (прямий: 5'-GGA GCC AAA CCC

AAC ATC TGT G-3'; зворотний: 5'-AAG CCA TTT TCC TTG TGG ACG-3') з утворенням амплікону довжиною 485 п.о.; EMMPRIN (прямий: 5'-GAT GAG TGG GTC TGG TTT AAG A-3'; зворотний: 5'-ATT CTT GTC CTT GTC ATT CAG G-3') з утворенням амплікону довжиною 390 п.о. Температури відпалу були оптимізовані для кожної пари праймерів. ПЛР-продукти аналізували на 1 %-му агарозному гелі і візуалізували за допомогою фарбування бромистим етидієм. Конститутивний ген β -актину, використовували як позитивний контроль для оцінки якості кДНК.

2.2.12. Аналіз активності металопротеїназ ММП-2 та ММП-9 за допомогою желатинової зимографії

Желатиназну активність матриксних металопротеїназ ММП-2 і ММП-9 у культуральному середовищі та гомогенаті клітин визначали за допомогою желатинової зимографії. НПК культивували в присутності FGF-2 (20 нг/мл) протягом 3 днів. На третю добу культивування половину культурального середовища замінювали свіжим середовищем, що містив 20 нг/мл FGF-2, або середовищем з FGF-2 та контрольним або EMMPRIN лентівірусним вектором. На шосту добу культивування клітини осаджали, а культуральне середовище концентрували за допомогою центрифужних ультрафільтрів (Amicon Ultra 30K, Millipore, Carrigtwohill, Ireland). Концентрацію білка клітинного екстракту вимірювали за методом Бредфорда (Sigma-Aldrich, США). Концентрацію білка в культуральному середовищі розраховували на кількість клітин в кожній культуральній чашці. Гель для проведення електрофорезу полімеризували разом із 10 % желатином. Проби завантажували в доріжки гелю (15 x 1,0 мм) та проводили електрофоретичне розділення білків. Після закінчення електрофорезу гель інкубували при температурі 37 °C протягом 16 годин для деградації субстрату желатиназами, що містяться у гелі. Потім гель

фарбували у розчині Brilliant blue R (Sigma Aldrich, США). Наявність ММП-2 та ММП-9 визначали за появою світлих смуг на темно-синьому тлі. Інтенсивність та площа світлих смуг були пропорційні активності желатиназ. Для проведення кількісного аналізу, гелі сканували на сканері Epson Perfection V750 і отримані зображення обробляли із застосуванням денситометричного аналізу за допомогою програми ImageJ. Активність желатиназ ММП-2 і ММП-9 виражали у відсотках від оптичної щільності контрольних проб. Статистичну обробку отриманих даних виконували із застосуванням t-критерію Стюдента. Різницю між середніми величинами вважали достовірною при $P < 0,05$.

2.2.13. Аналіз інвазії ЕММРІН-трансформованих нейральних прогеніторних клітин в колагеновому матриксі in vitro

Для аналізу інвазії НПК готували тривимірний матрикс з колагенових фібрил, отриманих з щурячого хвоста [198]. Для спостереження за інвазією клітин використовували 60×15 мм чашки Петрі (BD Falcon), на дні яких робили 10 мм отвір та прикріплювали 21×26 мм покривне скельце (Menzel-gläser). 50 % колаген, що містив 20 нг/мл FGF-2, наливали у чашку Петрі для отримання колагенового гелю завтовшки 1 мм і полімеризували при температурі 37°C протягом 30 хв. $2,5 \times 10^5$ клітин/мл ЕММРІН-трансформованих або контрольних НПК на 6 добу культивування висівали на колагенові гелі. Клітини на колагеновому гелі інкубували протягом 90 годин при 37°C і потім фіксували у 4%-му розчині ФА. Ядра клітин фарбували Hoechst 33342 (Invitrogen) та аналізували 3D розподіл клітин у колагеновому матриксі з використанням конфокальної мікроскопії у режимі серії «оптичних» зрізів за віссю z кожні 10 мкм від поверхні колагенового гелю. Підраховували

24123 GFP-позитивні клітини, трансдуковані контрольним лентивірусом, та 47549 – EMMPRIN-GFP.

2.3. Експериментальні моделі ішемічного ушкодження мозку

У роботі були використані експериментальні моделі ішемічного ушкодження мозку, а саме: глобальна короткотривала ішемія головного мозку, фокальна ішемія головного мозку, гіпоксично-ішемічне ушкодження головного мозку новонароджених щурів та перивентрикулярна лейкомаляція.

2.3.1. Глобальна короткотривала ішемія головного мозку піщанки

Експерименти були проведені на 40 статевозрілих (шість-сім місяців, маса 80–90 г) самцях піщанки монгольської (*Meriones unguiculatus*). Ішемізацію головного мозку створювали у наркотизованих тварин (n=30) (каліпсол + ксилазин, 75 та 2 мг/кг маси тіла відповідно, внутрішньом'язово) за допомогою перетискування обох загальних сонних артерій протягом 7 хв з наступним зняттям клем та відновленням кровоплину (реперфузія). Тваринам контрольної (несправжньооперованої) групи (n=10) проводили те ж саме оперативне втручання (препарування сонних артерій з наступним накладанням швів на шкіру), як і при створенні ішемії, але в даному випадку судини не перетискалися.

2.3.2. Глобальна короткотривала ішемія головного мозку щура

В експериментальну групу дослідження було включено 20 самців білих лабораторних щурів віком $13,2 \pm 2,4$ міс та вагою 417 ± 34 г, та 5

становили інтактний віварійний контроль. Щурів утримували по 4–6 особин у пластикових вольєрах у стандартних умовах віварію зі світловим режимом день-ніч при середній температурі 24 °С, годували стандартним комбікормом та поїли водою *ad libitum*. Перед оперативними втручаннями тварин позбавляли їжі строком на 8 год.

Транзиторну глобальну ішемію головного мозку викликали у тварин під внутрішньоочеревинним наркозом комбінацією кетаміну („Каліпсовет плюс”, ЗАТ „Біолік”, Україна) у дозі 70 мг/кг та ксилазину (“Хула”, Interchemie, Нідерланди) у дозі 7,5 мг/кг, шляхом чотирисудинної оклюзії за стандартною методикою [48]. У 65 % тварин спостерігали втрату установочного рефлексу при збереженні корнеального, що свідчило про достатнє кровопостачання стовбура головного мозку.

2.3.3. Глобальна короткотривала ішемія головного мозку миші

Ішемію викликали у наркотизованих (2,2,2-трибромоетанол – 125–240 мг/кг, інтраперитонеально) тварин лінії FVB "дикого" типу перетискуванням (оклюзія) обох загальних сонних артерій протягом 20 хв з наступним зняттям затискачів і відновленням кровопостачання (реперфузія). Псевдооперованим тваринам контрольної групи було виконано лише препарування артерії і вони перебували під наркозом протягом 20 хв. без накладання затискачів.

Оцінку регіонального мозкового кровотоку (РМК) та підтвердження ішемічного стану проводили за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії (moor-VMS-LDF-1, Moor Instruments, Великобританія) до і під час оклюзії, і відразу ж після реперфузії. Отримані дані проаналізовані за допомогою програмного забезпечення moorLAB (Moor Instruments, Великобританія). У подальших дослідженнях

використовували лише тварин, РМК яких опускався нижче 15 % від нормального базового рівня до оклюзії (Рис. 2.5).

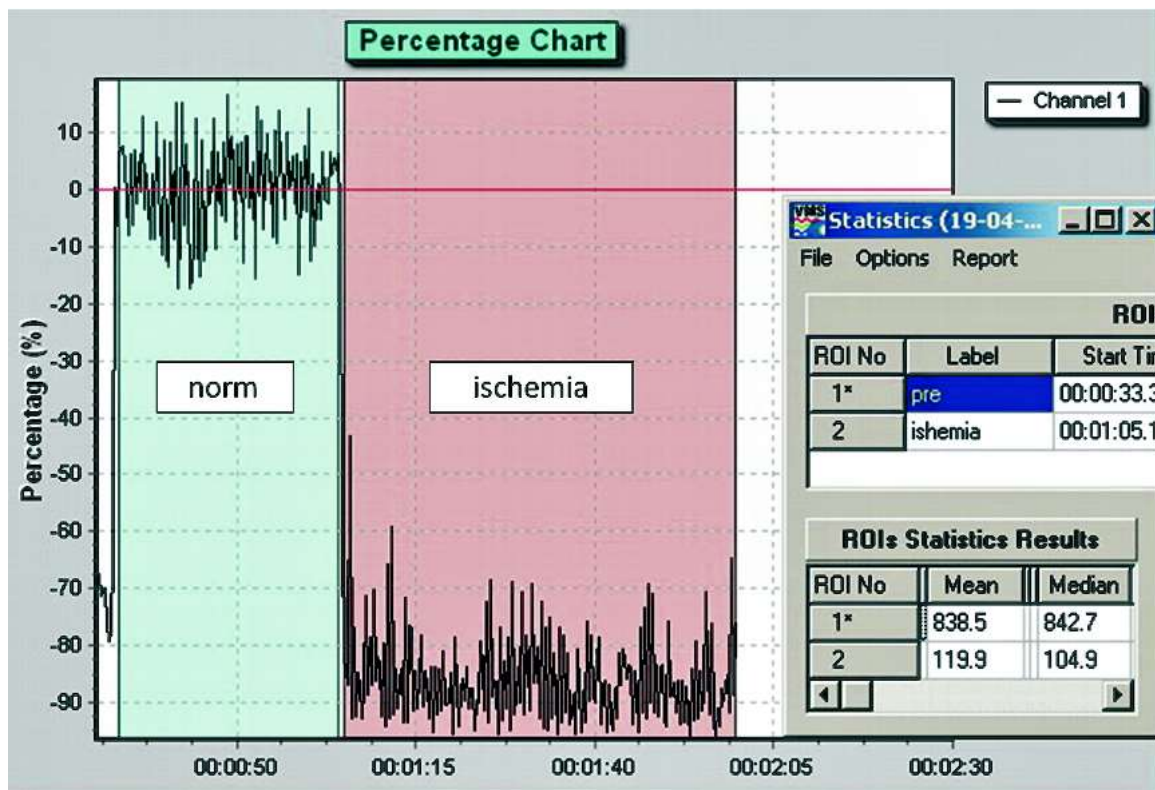


Рис. 2.5. Оцінка регіонального мозкового кровотоку за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії у мишей під час оклюзії обох загальних сонних артерій.

2.3.4. Фокальна ішемія головного мозку щура

Для моделювання фокальної ішемії головного мозку використовували дорослих самців (220 г) атимічних голих щурів (n=16; Charles River). Тварин анестезували і розрізали шкіру голови на рівні скроневої кістки. Робили краніотомію завширшки 3 мм, обережно відкривали тверду мозкову оболонку і накладали постійну лігатуру на дистальний сегмент середньої мозкової артерії. Після цього ізолювали

обидві загальні сонні артерії і робили тимчасову оклюзію судинними мікрозатискачами протягом 30 хв. Після зняття мікрозатискачів хірургічні рани були закриті.

2.3.5. Гіпоксично-ішемічне ушкодження головного мозку новонароджених щурів

Гіпоксично-ішемічне ушкодження головного мозку щурів Wistar виконували на сьому добу постнатального розвитку (P7). У наркотизованих ізофлураном тварин електрокоагулювали праву загальну сонну артерію. Через годину після електрокоагуляції тварин поміщали в герметичну камеру з 6,0 % O₂ протягом 35 хвилин при температурі 37 °C, а потім повертали до самиць. На третю добу після моделювання гіпоксично-ішемічного ушкодження (P10) мізки тварин фіксували шляхом транскардіальної перфузії 4%-им розчином формальдегіду для подальшого морфологічного аналізу.

2.3.6. Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) у мишей in vivo

Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції здійснювалося шляхом однобічної коагуляції загальної сонної артерії на мишах лінії FVB шостої доби після народження (P6), що відповідає перинатальному періоду людини.

Під час коагуляції анестезували тварин ізофлураном. Ізофлуран забезпечує відмінну глибоку анестезію, стабільну частоту серцевих скорочень та швидке прокидання тварин після анестезії. Ізофлуран подавався в суміші кисню і азоту: 3,0 % для індукції і 1,5 % під час операції з використанням маски для носа. Тривалість анестезії була менше,

ніж 5 хв. При такому інгаляційному наркозі з використанням ізофлурану летальність тварин становила 3 %.

Через годину після коагуляції тварин поміщали в герметичну камеру з 6,0 % O₂ протягом 35 хвилин.

Для створення гіпоксичного-ішемічного ушкодження у поєднанні із запаленням, тваринам було введено внутрішньочеревно 0,015 мл ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС, 1 мг/кг).

2.3.7. Моделювання ПВЛ у мишей *in vitro*

Для моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* використовували органотипову культуру зрізів головного мозку, яку отримували з мишей лінії FVB 7-денного віку. Після швидкої декапітації виділяли мозок, розділяли його на дві частини по серединній лінії та за допомогою автоматичного чоппера (McIlwain, Англія) нарізали зрізи завтовшки 350 мкм.

Зрізи культивували на пористих напівпроникних нітроцелюлозних мембранах (Millicell-CM, Millipore, MA), розміщених у CO₂-інкубаторі на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5% CO₂) та рідкого середовища (50 % MEM, 25 % збалансованого сольового розчину Хенкса, 25 % інактивованої кінської сироватки, 10 мМ Трис, 2 мМ NaHCO₃, 12,5 мМ HEPES, 15 мМ глюкози, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, pH 7,2) у 6-лункових планшетах при 35 °C. Середовище культивування змінювали на другий день інкубації та далі двічі на тиждень.

Перивентрикулярну лейкомаляцію моделювали шляхом киснево-глюкозної депривації (КГД) зрізів головного мозку з подальшим додаванням у культуральне середовище ендотоксину ліпополісахариду для імітації процесу запалення. КГД створювалась у спеціальній камері, де

газове середовище містило 95 % азоту (N_2) і 5 % CO_2 , а рідке середовище – PBS, 12,5 ммоль Нерес з додаванням сахарози (15 ммоль D-сахарози) замість глюкози. Тривалість КГД становила 30 хвилин, після чого зрізи двічі відмивалися і поверталися до нормальних умов культивування (нормоксична реоксигенація протягом 24 та 48 годин).

Після КГД у культуральне середовище додавали ЛПС (L4130, Sigma-Aldrich, США). Перед додаванням ЛПС досліджували концентраційну залежність впливу ліпополісахаридів на стан нервової тканини органотипових зрізів мозку. Для цього використовували три різні концентрації ЛПС: 10, 100 та 1000 нг/мл.

2.3.8. Кількісна оцінка цитозольного ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі.

Визначення змін відносної кількості ЛДГ у культуральному середовищі проводилося колориметричним методом за допомогою тест-набору G1780 (“Promega”, USA). Цитозольний фермент ЛДГ при пошкодженні клітинної мембрани вивільняється у культуральне середовище та характеризує ступінь ушкодження клітин. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості ферменту ЛДГ у середовищі культивування та обернено пропорційна життєздатності клітин у культурі.

Після проведення експериментів на органотипових зрізах мозку із впливом різних концентрацій ЛПС у комбінації з або без КГД, відбирали 200 мкл культурального середовища в 24-лунковий планшет. У кожному лунку додавали 200 мкл субстрату для визначення ЛДГ. Проби інкубували при кімнатній температурі в темряві протягом 30 хв. Потім додавали 200 мкл розчину, що зупиняв реакцію (набір G1780).

Оптичну щільність проб вимірювали за допомогою спектрофотометру uniSPEC 2 (LLG, Німеччина) у мікрокуветах при

довжині хвилі 492 нм. Проби відбиралися через 24 та 48 годин після експериментальних впливів (коли ефекти на життєздатність були достатньо виражені) у дублях та визначали середнє значень для кожної лунки. Як контроль використовували: 1 – середовище культивування з лунки, де не було органотипової культури (значення оптичної щільності якого віднімалися від показників, отриманих з експериментальних лунок); 2 – середовище культивування з лунки, де знаходилися необроблені ЛПС та КГД культури.

Зміни відносної кількості ЛДГ у культуральному середовищі виражали в умовних одиницях, що відповідали одиницям оптичної щільності розчину, нормалізованим до площі тканини у відповідній лунці.

2.4. Трансплантація стовбурових клітин

2.4.1. Ксеногенна трансплантація фетальної нервової тканини щурів

На першу добу після оклюзії ішемізованим піщанкам під каліпсол-ксилазиновим (75 та 2 мг/кг маси тіла відповідно, внутрішньом'язово) наркозом робили субокципітальне введення 2 мкл кріоконсервованої суспензії фетальної нервової тканини. Суспензію для трансплантації відігрівали безпосередньо перед трансплантацією на водяній бані при 40 °С.

2.4.2. Алогенна трансплантація суспензії клітин гіпокампа фетального мозку щурів

Стереотаксичну трансплантацію СКФМ проводили через 4 тижні після ішемії. Під внутрішньоочеревинним наркозом (кетамін („Каліпсовет

плюс”, ЗАТ „Біолік”, Україна) у дозі 70 мг/кг та ксилазин (“Xyla”, Interchemie, Нідерланди) у дозі 7,5 мг/кг), голову тварини фіксували у модифікованому стереотаксичному апараті СЕЖ-3 в положенні flat skull. Усі стереотаксичні маніпуляції виконували з використанням координат введення за атласом [226]. Стереотаксичну трансплантацію проводили в 4 точки (в мм): AP (–4,3 від брегми); L ($\pm 2,0$), V (2,5) і AP (–5,3 від брегми); L ($\pm 3,5$), V (3,0). За допомогою скляного капіляра діаметром 0,3 мм, з’єднаного з мікроін’єктором, протягом 3 хв в кожную точку вводили 10 мкл суспензії (100 000 клітин), для дифузії трансплантата капіляр залишали у каналі введення на 10 хв.

2.4.3. Сингенна трансплантація GFP-позитивних нейральних прогеніторів гіпокампа миші

Суспензію GFP-позитивних НПК ($2\text{--}2,5 \times 10^5$ клітин у 2 мкл середовища Neurobasal) стереотаксично трансплантували в гіпокамп експериментальних тварин (координати від брегми: lateral $\pm 1,5$ мм, posterior – 2,0 мм, dorsoventrally 1,7 мм) під комбінованим 2,2,2-трибромоетаноловим наркозом (125 мг/кг, інтраперитонеально) через 24 години після ішемії/реперфузії. Несправжньо-оперованим тваринам робили ін’єкцію 2 мкл середовища культивування Neurobasal у такі ж координати.

2.4.4. Сингенна трансплантація GFP-позитивних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин миші

Сингенна трансплантація суспензії GFP-позитивних ММСК семиденним (P7) тваринам з моделлю перинатального ушкодження головного мозку виконувалася стереотаксично (координати: А: 1,5 мм

каудально, L: 2,0 мм латерально щодо брегми; і V: 2,0 мм вентрально відносно поверхні черепа) монолатерально в праву півкулю головного мозку під інтраперитонеальним каліпсол-ксилазиновим наркозом через 24 години після ПВЛ.

Стереотаксично трансплантували 5×10^5 клітин у 2 мкл середовища. Життєздатність клітин після переведення адгезивної культури в суспензію для трансплантації становила 92,4 %. Тваринам контрольної групи вводили лише середовище культивування ММСК у відповідному об'ємі.

2.4.5. Ксеногенна трансплантація GFP-позитивних нейральних прогеніторних клітин, утворених з іПСК людини

Дорослі самці (220 г) атимічних голих щурів (n=16; Charles River) були використані для довготривалих (6 місяців) експериментів з ксенотрансплантації. Вони утримувалися в індивідуальних клітках за стандартних умов з 12 годинним циклом день/ніч та вільним доступом до їжі і води.

GFP-позитивні нейральні прогеніторні клітини, утворені з іПСК людини, стереотаксично трансплантували щурам після моделювання фокальної ішемії у головний мозок за такими координатами (від брегми та поверхні мозку): anterior/posterior: +1.5 мм; medial/lateral: -1.5 мм; dorsal/ventral: -2.0 мм; та anterior/posterior: +0.5 мм; medial/lateral: -1.5 мм; dorsal/ventral: -2.5 мм. Зубна планка була встановлена на рівні -3.3 мм.

2.4.6. Ін'єкція BrdU

Для виявлення клітин, що проліферують, тваринам перед забором матеріалу для морфологічних досліджень вводили 5-бромдезоксіуридин (BrdU). Ін'єкції BrdU (50 мг/кг) робили внутрішньоочеревинно протягом 2 діб перед забором матеріалу двічі на день.

2.4.7. Ін'єкція лентивірусного вектора

Перед ін'єкцією лентивірусного вектора новонароджених (P0) щурів Wistar наркотизували сумішшю ізофлуран (Foren; 100 %), 30 % O₂ і 70 % повітря. 2 мкл концентрованої суспензії лентивірусного вектора вводили в бічний шлуночок за допомогою шприца Hamilton (10 мкл Hamilton (Reno, NV) з голкою 28-го калібру) за такими координатами від брегми: 0,5 мм lateral, 0,5 мм anterior і 2 мм вглиб від поверхні мозку. Після ін'єкції та накладання швів тварин повертали до самиць.

2.5. Поведінкові тести

2.5.1. Тест "водний лабіринт Морріса"

Для оцінки когнітивних функцій (просторова пам'ять) використовували водний лабіринт Морріса (ВЛМ). Роль ВЛМ виконував чорний круглий басейн (150 см у діаметрі та 60 см заввишки), який містив прозору платформу з оргскла [199]. Протягом експериментів платформа залишилася на постійному місці. Температура води підтримувалася на рівні 28 °C.

Стіни басейну були позначені геометричними висококонтрастними зображеннями (квадрати, зірки, трикутники). Такі зовнішні візуальні орієнтири сприяли формуванню у тварин уявлення про просторове розташування платформи. Траєкторія і час плавання тварини контролювалися за допомогою цифрової відеокамери.

Тестування тварин у ВЛМ для перевірки їх здатності виконувати завдання, пов'язані з просторовою пам'яттю, було виконано згідно з процедурою, адаптованою для мишей [319]. Протягом чотирьох днів поспіль (з 12-ї по 15-у та з 86-ї по 89-у добу після ішемії) виконували

поведінкові тести, у ході яких миші навчались знаходити платформу, покладаючись на зовнішні візуальні орієнтири. Кожен сеанс складався з 2 циклів (по 4 спроби) на день, під час яких мишей поміщали до басейну і давали їм 60 с для пошуку платформи. Для кожної тварини з усіх груп експерименту визначали показник «час пошуку платформи» – середній для 8 спроб час (у секундах), витрачений мишею на пошук платформи в конкретну добу дослідження. Якщо протягом 60 с миша не знаходила платформу, то її саджали на платформу для запам'ятовування місця її розташування.

На п'яту добу тестування (16-а та 90-а доба після ішемії), прозора платформа була занурена на кілька мм від поверхні води, і кожну мишу поміщали до басейну для знаходження прихованої платформи.

2.5.2. Тест "діставання і виймання їжі"

Кортикоспинальну функцію тварин оцінювали за допомогою поведінкового тесту «діставання і виймання їжі» раз на тиждень протягом 4 тижнів, починаючи з 28 доби після народження (P28). Перед тестуванням їжа у тварин забиралася, але вода залишалася.

Для поведінкового тесту «діставання і виймання їжі» у камері з плексигласу була створена щілина 1,5 см × 0,5 см, за якою знаходилася крихта комбікорму на відстані 1 см від щілини, для гарантії, що тварина захопить їжу з використанням лапи, а не діставатиме її з використанням язика. Тваринам давалося 45 хвилин, щоб зробити до 60 спроб дістати і вийняти їжу. Відсоток успішних спроб розраховано таким чином: Успіх, % = (кількість успішних спроб/загальне число спроб) × 100, якщо тварина зробила 41–60 спроб протягом 45 хв, або Успіх, % = (кількість успішних спроб/40) × 100, якщо тварина зробила менше 40 спроб протягом 45 хв.

2.6. Морфологічні методи дослідження

2.6.1. Таймлапс аналіз EMMPRIN-трансформованих нейральних прогеніторних клітин

Для таймлапс (time-lapse) аналізу ефекту надекспресії EMMPRIN у НПК культуру трансформованих лентивірусами (EMMPRIN або контрольним) клітин поміщали в камеру флюоресцентного мікроскопа Eclipse TE2000-U (Nikon Corp., Zürich, Switzerland). У камері мікроскопа підтримувалися температура 37 °C і 5 % CO₂. Клітини фотографувалися протягом 6 годин з 5-ти хвилинними інтервалами. Зображення клітин були отримані за допомогою цифрової камери (Retiga EX: Qimaging, Burnaby, Канада) та програмного забезпечення OpenLab. Аналіз відстеження окремих клітин був виконаний за допомогою програмного забезпечення Metamorph (Molecular Devices, версія 7.4). Для кількісної оцінки випадковим чином обирали двадцять клітин на культуральну чашку.

2.6.2. Імуногістохімічний аналіз парафінових зрізів гіпокампа

Перед забором матеріалу для аналізу цитоархітекτονіки гіпокампа тварин наркотизували внутрішньом'язовим введенням каліпсолу (75 мг/кг) та інгаляційно – ефіром. Фіксацію тканини у тварин виконували методом транскардіальної перфузії-фіксації 4 % розчином формальдегіду на 0,1 М фосфатному буфері (ФБ) з рН 7,4. Тварин декапітували та виділяли гіпокампи, які заключали у парафін і депарафіновані зрізи завтовшки 7 мкм використовували для імуногістохімічного аналізу.

Для виявлення гліальної реакції використовували імуногістохімічний метод забарвлення з використанням антитіл до гліального фібрилярного кислого білка (GFAP), який є специфічним маркером астроцитів, або антитіл до Iba-1 – маркера мікрогліальних

клітин. Для цих досліджень депарафіновані зрізи гіпокампа мітили поліклональними кролячими антитілами, що специфічні до GFAP (1:500) (DAKO, Данія) або до Iba-1 (1:750) (WAKO, Японія), при 4 °C протягом 20 годин і 12 годин з вторинними антикролячими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому. Для візуалізації імуногістохімічного забарвлення використовували розчин діамінобензидину з додаванням 0,03 % розчину перекису водню. Зрізи дофарбовували розчином на основі 0,1 М ФБ, який містив 1 % толуїдинового синього, 0,5 % метиленового синього і 1 % тетраборнокислого натрія. Після забарвлення зрізи дегідратували і заключали у полістирол (Permount, США).

Забарвлені зрізи гіпокампа вивчали за допомогою світлового мікроскопа XSP-139A-TP з цифровою камерою Canon Power Shot G-6 (NNJOI Co. Ltd, Японія-Китай). У ході подальшого морфометричного аналізу на мікрофотографіях у збільшенні $\times 200$ підраховували лінійну щільність (ЛЩ) інтактних пірамідних клітин на 1 мм довжини CA1-зони гіпокампа та ширину променистого шару (ШПШ) у мкм.

2.6.3. Імуноцитохімічний аналіз адгезивної культури нейральних прогеніторних клітин

Для аналізу фенотипу НПК свіжоізольовані клітини висівалися на покривні скельця, покриті Matrigel (4×10^5 клітин на 35-мм культуральну чашку). На 3-ю добу культивування, культуральне середовище замінювалося охолодженим 4 % розчином формальдегіду (ФА) і після фіксації у ФА протягом години виконувалося імуноцитохімічне фарбування культури клітин. Клітини інкубувалися з первинним моноклональним мишачим антитілом до нестину (Chemicon, USA) у розчині 0,1 М ФБ із додаванням 0,5 % БСА та 0,3 % Тритон X-100 протягом 12 годин при 4 °C. Первинне антитіло візуалізували вторинним

антимішачим антитілом, кон'югованим з флюорохромом AlexaFluor488 (Invitrogen, США). Ядра клітин контрастували флюоресцентним барвником Hoechst33342 (Invitrogen, USA). Пофарбовану культуру клітин досліджували за допомогою конфокального скануючого мікроскопа FV1000-BX61WI (Olympus, Японія).

2.6.4. Імуногістохімічний аналіз вібротомних зрізів головного мозку

Забір матеріалу для імуногістохімічного аналізу проводили у тварин на 14 добу після трансплантації НПК. Перед забором матеріалу мишей наркотизували внутрішньом'язовим введенням каліпсоу (75 мг/кг) та інгаляційно – ефіром. Фіксацію тканини у тварин виконували методом транскардіальної перфузії-фіксації 4%-м розчином формальдегіду на 0,1 М фосфатному буфері (ФБ) з рН 7,4. За допомогою вібратома VT1000A (Leica, Німеччина) виготовляли фронтальні зрізи мозку завтовшки 40 мкм. Після промивки у 0,1 М ФБ зрізи блокували у розчині 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4) з додаванням 0,5 % бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та 0,3 % Тритон X-100. Для виявлення астроцитів використовували антитіла до GFAP (1:1500, DAKO», Данія); для донорських клітин – антитіла до GFP (1:750, Molecular Probes Inc., США), для попередників нейронів – антитіла до даблкортину (DCX) (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), для проліферуючих клітин – антитіла до бромдезоксіуридину (BrdU) (clone BU1/75 (1:100, Oxford Biotech). Перед імуногістохімічним фарбуванням антитілами до BrdU, зрізи інкубували протягом 30 хвилин при 37 °C у 2N HCl для денатурація ДНК, а далі за стандартним протоколом.

Візуалізацію первинних антитіл проводили за допомогою вторинних антитіл, кон'югованих з Alexa Fluor 488 та 555 (1:1000,

Molecular Probes Inc., США). Пофарбовані зрізи покривали середовищем Immu-MOUNT (Thermo Scientific, США).

Імуногістохімічно забарвлені зрізи мозку досліджували за допомогою конфокального скануючого мікроскопа FV1000-BX61WI (Olympus, Японія).

2.6.5. Електронно-мікроскопічні методи дослідження

2.6.5.1. Електронно-мікроскопічний аналіз адгезивних культур стовбурових клітин

Для ультраструктурного аналізу адгезивних культур ММСК або НПК клітини фіксували за допомогою 4 % розчину формальдегіду і 2,5 % розчину глутаральдегіду (Sigma-Aldrich, США). Після фіксації клітини промивали в 0,1 М фосфатному буфері (ФБ) та дофіксували в 1 % осмії на 0,1 М ФБ, зневоднювали у висхідних концентрацій спирту, а потім переносили в епоксидну смолу Епон.

Напівтонкі зрізи виготовляли за допомогою скляного ножа і фарбували 1% метиленовим синім. Ультратонкі зрізи нарізали за допомогою діамантового ножа і контрастували цитратом свинцю і ураніл ацетатом.

Зрізи досліджували на електронному мікроскопі JEOL 100-CX (JEOL, Японія) при 80 кВ.

2.6.5.2. Імуногістохімічний аналіз GFP-позитивних трансплантованих клітин на електронно-мікроскопічному рівні

Перед забором матеріалу для імуногістохімічного аналізу на електронно-мікроскопічному рівні щурів наркотизували

внутрішньоочеревинно розчином пентобарбіталу натрію (40 мг/кг) (Abbott Laboratories, США).

Фіксацію тканини у тварин виконували методом транскардіальної перфузії-фіксації охолодженим 2 % розчином формальдегіду та 0,2 % розчином глутаральдегіду (Sigma-Aldrich, США) на 0,1 М фосфатному буфері (ФБ), рН 7,4. Мізки після виділення промивали в 0,1 М ФБ.

За допомогою вібратора VT1000A (Leica, Німеччина) виготовляли фронтальні зрізи мозку завтовшки 150 мкм.

Зрізи інкубували протягом ночі з первинними козячими анти-GFP антитілами (1:500, Novus Biologicals) при 4 °С. Потім тканину інкубували при кімнатній температурі протягом 2 год з біотинілізованими кролячими анти-козячими вторинними антитілами (1:200, DakoCytomation).

Для візуалізації вторинних антитіл використовували авідин біотин пероксидазний комплекс (ABC) (Vector Laboratories) з подальшою інкубацією з 3,3'-діамінобензидином тетрахлоридом (DAB) і 0,015 % перекисом водню.

Після DAB реакції зрізи дофіксували в 1% розчині осмію (Sigma-Aldrich, США) на 0,1 М ФБ, у висхідних концентрацій спирту, а потім переносили в епоксидну смолу Епон.

Ультратонкі зрізи нарізали за допомогою діамантового ножа і контрастували цитратом свинцю і ураніл ацетатом.

Для ідентифікації GFP/DAB-мічених клітин і синаптичних контактів зрізи досліджували на електронному мікроскопі JEOL 100-CX (JEOL, Японія).

На електронограмах синапсами вважали структури, які мали як мінімум 2–3 синаптичні везикули в пресинаптичній терміналі, постсинаптичну щільність у постсинапсі та синаптичну щілину між ними.

2.7. Хімічні реактиви і розчини

Реагенти для культурального середовища для НПК:

№	Назва	Фірма-виробник, каталожний номер
1	Neurobasal medium	Invitrogen, 21103-049
2	B27 supplement	Invitrogen, 17504-044
3	GlutaMAX	Invitrogen, 35050-038
4	Na pyruvate	Sigma, P2256
5	N-Acetyl-L-cysteine	Sigma, A9165
6	PenStrep	Gibco, 15140-122
7	Фактор росту фібробластів FGF-2	Sigma, F0291
8	Hanks' balanced salt solution	Sigma, H4641
9	Percoll	GE HealthCare, 17-0891-01
10	Matrigel	BD Biosciences, 354234
11	PBS (phosphate buffered saline)	Gibco, 10010031

Склад культурального середовища (КС) для адгезивної культури нейральних прогеніторних клітин – 100 мл:

Neurobasal medium	97 мл
B27 supplement	2 мл
GlutaMAX	1 мл
Na pyruvate	100 мкл
N-Acetyl-L-cysteine	100 мкл
PenStrep	500 мкл

Первинні антитіла, що використовувалися для імуноцитотакимічного аналізу:

№	Назва	Фірма-виробник
1	Rabbit anti-Aquaporin-4 (AQP-4)	Abcam
2	Rat anti-BrdU, clone BU1/75	Oxford Biotech
3	Mouse anti-CD34	BD Biosciences
4	Mouse anti-CD44	BD Biosciences
5	Mouse anti-CD45	BD Biosciences
6	Mouse anti-CD73	BD Biosciences
7	Mouse anti-CD90	BD Biosciences
8	Mouse anti-CD117	BD Biosciences
9	Mouse anti-Desmin	Abcam
10	Goat anti-Doublecortin (DCX)	Santa Cruz
11	Rabbit anti-EGFR	Abcam
12	Mouse anti-human EMMPRIN	BD Bioscience
13	Goat anti-rat EMMPRIN	Santa Cruz Biotechnology
14	Rabbit anti-GFAP	DakoCytomation
15	Anti-human GFAP	RNDsystems
16	Goat anti-GFP	Novus Biologicals
17	Rabbit anti-Iba-1	Wako
18	anti-MBP	SigmaAldrich
19	Mouse anti-Nestin, clone rat-401	Chemicon
20	Mouse anti-NeuN, clone A60	Chemicon
21	Mouse anti-NG2	Millipore
22	Mouse anti-RECA-1, clone HIS52	Serotec
23	Mouse anti-Rip	Abcam
24	Goat anti-SOX2	Santa Cruz Biotechnology
25	Rabbit anti-Turbored	Evrogen JSC

2.8. Методи статистичного аналізу

Для обробки та статистичного аналізу результатів використовували такі програми: Statistica (версія 5, Statsoft, США) та XLSTAT 2009.4.06 (Addinsoft, США). Для аналізу вибірок визначали середнє значення, стандартну похибку середнього, стандартне відхилення середнього.

t-тест Стюдента використовували для визначення достовірності різниці у експериментальних групах, що відповідали нормальному розподілу. Нормальність розподілу всіх рядів отриманих значень у експериментах з трансплантацією фетальної нервової тканини перевіряли з використанням тесту Шапіро-Вілка.

Розподіл значень лінійної щільності (ЛЩ) інтактних пірамідних клітин на 1 мм довжини СА1 зони гіпокампа в експериментальних групах, в яких він не відповідав вимогам нормального, наведений у вигляді «медіана (I квартиль-III квартиль)». Значення ЛЩ порівнювали за допомогою U-критерія Манна-Вітні. Розподіл значень ширини променистого шару (ШПШ) у групах, де його вимірювання було можливим, задовольняв вимоги нормального розподілу. Тому значення ШПШ наведені у вигляді середнє \pm стандартне відхилення, порівняння проводили з використанням *t*-тесту Стюдента. Різницю вважали достовірною при $P < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ФЕТАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ (ФНТ) НА СТРУКТУРУ ГІПОКАМПА ГРИЗУНІВ ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ

3.1. Вплив трансплантації ФНТ на гліальні клітини гіпокампа піщанки після короткотривалої глобальної ішемії мозку

У першій серії експериментів досліджували реакцію гліальних клітин зони СА1 гіпокампа піщанки (*Meriones unguiculatus*) на трансплантацію фетальної нервової тканини після короткотривалої глобальної ішемії мозку.

Імуногістохімічне дослідження гіпокампа з використанням антитіл до GFAP показало, що в зрізах гіпокампа несправжньооперованих тварин GFAP-позитивні астроцити ідентифікувалися в усіх шарах зони СА1 гіпокампа. Астроцити мали соми діаметром порядку 10 мкм і звичайно від двох до шести відносно тонких відростків першого порядку в площині зрізу. Галуження відростків могло розпочинатися досить близько від соми (**Рис. 3.1А**) [351].

Імуногістохімічне дослідження показало, що після оклюзії сонних артерій відбувається активація гліальних клітин гіпокампа. Ступінь імунореактивності астроцитів і локалізація їх в шарах гіпокампа суттєво залежала від строку постішемичного періоду.

На 7 добу після оклюзії нейропіль СА1 зони гіпокампа був сильно вакуолізований, переважно через наявність великої кількості набряклих відростків астроцитів (**Рис. 3.1Б**). Для аналізу щільності локалізації гліальних клітин використовували індекс щільності (ІЩ) - сумарна кількість мічених клітин, яка була порашована у кожному шарі середньої частини СА1 зони гіпокампа на 100 мкм^2 площі зрізу.

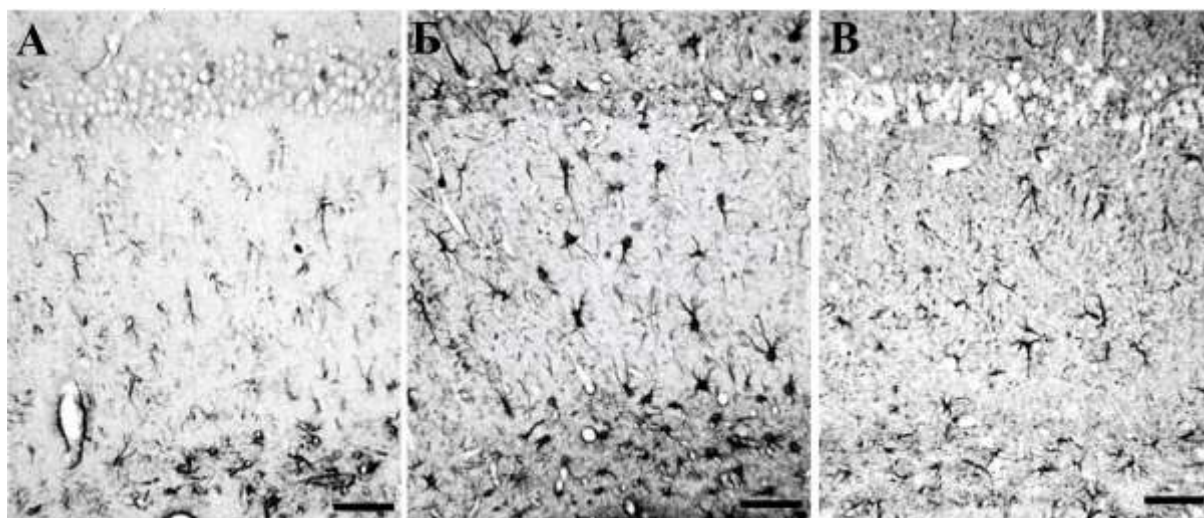


Рис. 3.1. Зона CA1 гіпокампа піщанок. (А) Несправжньооперовані тварини. (Б) Ішемізовані тварини. (В) Ішемізовані тварини після нейротрансплантації. Парафінові зрізи, імуногістохімічне забарвлення на GFAP – маркер астроцитів. Зрізи дофарбовували розчином, який містив 1 % толуїдинового синього, 0,5 % метиленового синього і 1 % тетраборнокислого натрія. Шкала = 50 мкм.

Морфометричний аналіз показав, що ІЩ GFAP-позитивних астроцитів у CA1 зоні гіпокампа на 7 добу після оклюзії був таким: *str. pyramidale* – $1,9 \pm 0,2$, *str. radiatum* – $2,5 \pm 0,1$, *lacunosum-moleculare* – $7,2 \pm 0,3$, *moleculare* – $5,2 \pm 0,1$, *hilus* – $2,4 \pm 0,2$ (Рис. 3.1Б) [351].

Результати імуногістохімічного дослідження Іба-1-позитивних мікрогліальних клітин показали, що після ішемії-реперфузії спостерігалась їх гіпертрофія завдяки збільшенню розміру соми та ретракції відростків; відбувалося також різке збільшення кількості мікрогліальних клітин у порівнянні з несправжньооперованими тваринами. У контрольній групі Іба-1-позитивні клітини виявлялися в усіх шарах зони CA1, але імуногістохімічне забарвлення таких клітин було слабким (Рис. 3.2А).

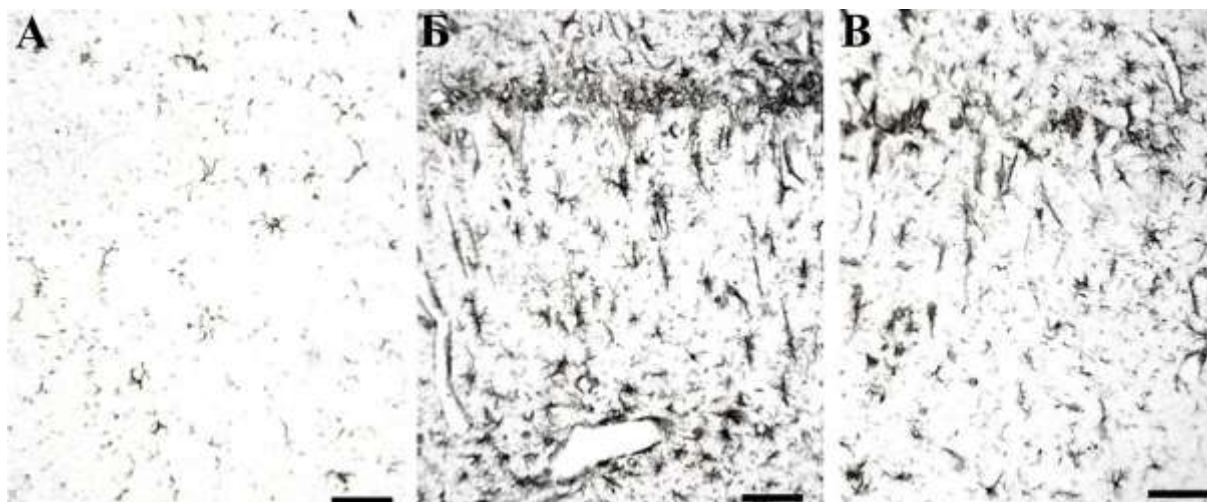


Рис. 3.2. Зона CA1 гіпокампа піщанок. (А) Несправжньооперовані тварини. (Б) Ішемізовані тварини. (В) Ішемізовані тварини після нейротрансплантації. Парафінові зрізи, імуногістохімічне забарвлення на Iba-1 – маркер мікрогліальних клітин. Шкала = 50 мкм.

Після ішемії-реперфузії мікроглія в шарі *str. radiatum* мала паличкоподібний вигляд і розташовувалася вздовж апікальних дендритів пірамідних нейронів. На 7-му добу мічені мікрогліальні клітини у своїй більшості концентрувались в *str. pyramidale* (ІЩ дорівнював $57,5 \pm 4,1$) біля тіл пірамідних нейронів (**Рис. 3.2Б**).

Імуногістохімічне дослідження гліальних клітин показало, що на 7-му добу після субокципітальної трансплантації фетальної нервової тканини у тварин з ішемією зменшувалась кількість гіпертрофованих астроцитів. Морфометричний аналіз, який проводили на парафінових зрізах, показав, що значення ІЩ GFAP-позитивних астроцитів зменшувалося в 1,6 рази порівняно з ішемізованими тваринами (**Рис. 3.2В**) [351].

Нейротрансплантація також суттєво зменшувала інтенсивність імунозабарвлення мікроглії у зоні CA1 гіпокампа піщанок в

постішемичному періоді. Морфометричний аналіз показав, що значення ІЩ Іba1-позитивних мікрогліальних клітин зменшувалося в 3,8 рази порівняно з ішемізованими тваринами (**Рис. 3.2В**) [351].

Таким чином, трансплантація ФНТ гальмувала розвиток реактивного гліозу, а також збільшувала кількість неушкоджених нейронів після ішемії-реперфузії.

3.2. Вплив пізньої трансплантації ФНТ на структуру гіпокампа щурів у віддаленому періоді після ішемічного ушкодження мозку

Як зазначалося вище, трансплантація фетальної нервової тканини у ранній період (1 доба) після ішемічного пошкодження головного мозку експериментальних тварин гальмувала розвиток реактивного гліозу в СА1 зоні гіпокампа. Відомо, що в цей ранній період мікрооточення в зоні ураження потенційного реципієнта є найбільш сприйнятливим до інтеграції трансплантату [26]. Однак перспектива клінічного застосування нейротрансплантації змушує наближати експериментальні умови до реальних. Адже часто після початку захворювання проходить тривалий час, як це має місце при нейродегенеративних захворюваннях та цереброваскулярній патології. При цьому в зоні ураження розвиваються незворотні процеси у вигляді формування гліального рубця, суттєвого погіршення васкуляризації, що несприятливо відображається на міграції трансплантованих клітин до ділянки пошкодження та їх інтеграції в нейрональні ланцюги реципієнта [288]. Відомо також, що пластичність головного мозку експериментальних тварин знижується з віком [320], а отже і зменшується здатність до спонтанної регенерації.

Тому у наступній серії експериментів досліджували вплив більш пізньої (через 30 діб після ішемічного ураження головного мозку)

трансплантації фетальної нервової тканини (ФНТ) на структуру гіпокампа дорослих лабораторних щурів у тривалі строки після трансплантації (до 6 міс). Для трансплантації використовували суспензію клітин СА1 зони та зубчастої звивини гіпокампа фетального мозку щурів.

Результати дослідження мікроскопічної будови гіпокампа експериментальних тварин наведено на **Рис. 3.3** [98].

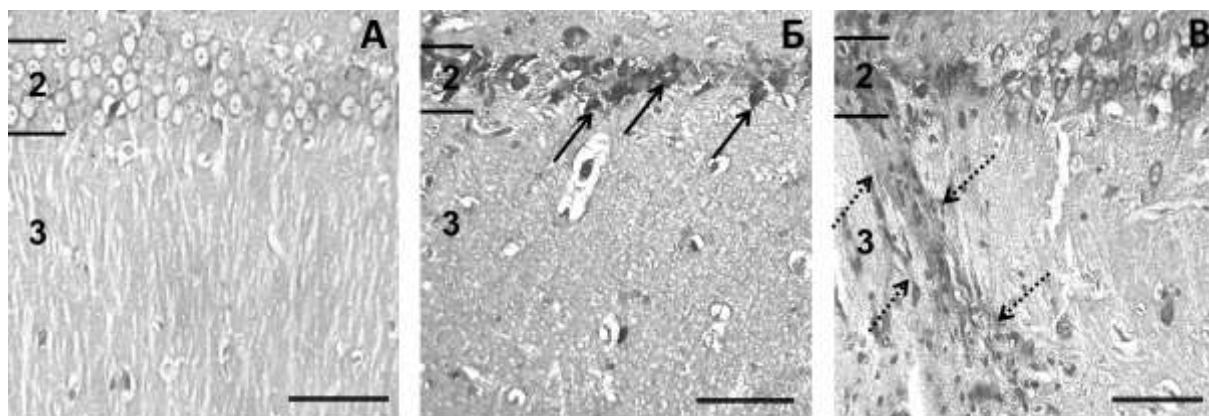


Рис. 3.3. Мікрофотографії гіпокампа. СА1 зона гіпокампа інтактної тварини (А), 2 місяці після ішемії (Б) та 1 місяць після трансплантації (В). 2 – пірамідний шар, 3 – променистий шар. Стрілками вказані пошкоджені клітини. Зрізи пофарбовані розчином, який містив 1 % толуюдинового синього, 0,5 % метиленового синього і 1 % тетраборнокислого натрія. Пунктирними стрілками позначений гліально-фіброзний рубець. Шкала = 50 мкм.

Встановлено, що пірамідний шар інтактних тварин складався із тіл пірамідних нейронів, компактно розташованих у 3–5 рядів (**Рис. 3.3А**). Клітини містили оточене тонким обідком гіперхромної цитоплазми велике округле світле ядро, в якому чітко розрізнялося ядереце. Медіальну межу СА1 зони визначали за шириною пірамідного шару та наявністю променистого шару, його зникнення відповідало переходу в *subiculum*.

Латеральною межею служив початок зони СА3, що містить візуально більші пірамідні клітини. Лінійна щільність (ЛЩ) пірамідних клітин СА1 зони становила 198 (182–208) кл/мм. Променистий шар складався із радіально орієнтованих рівнобіжних апікальних дендритів, його ширина (ШПШ) становила 682 ± 36 мкм.

Зубчаста звивина складалась із внутрішнього гранулярного та зовнішнього молекулярного шарів, взаємно розташованих V-подібно, у вигляді двох прямих «плечей». Гранулярний шар містив компактно розташовані у 4–6 шарів гранулярні клітини, морфологічно подібні до пірамідних клітин СА1 зони, однак дещо менших розмірів.

Через 2 місяці після ішемії виявлені зміни в пірамідному шарі СА1 зони суттєво варіювали в сенсі більшої або меншої кількості нефагоцитованих залишків пірамідних клітин. На частині зрізів гіпокампа виявлено повну дегенерацію пірамідного шару із утворенням залишкових порожнин та одиничними без'ядерними, різко гіперхромними компактизованими тілами нейронів, від яких місцями відходили тяж гіперхромні короткі базальні дендрити (**Рис. 3.3Б**) [98].

На інших зрізах дегенерація СА1-зони мала вигляд моношару описаних гіперхромних тіл із дещо довшими гіперхромними дендритами. ЛЩ незмінених пірамідних клітин становила 4 (3–9) клітин/мм. Променистий шар СА1 зони втратив притаманну йому будову, структура його стала гомогенною, а по всій довжині шару видно мікровакуолізацію, тому його морфометричний аналіз не проводили. У всіх випадках спостерігали інтенсивну інфільтрацію клітинами мікроглії пірамідного та променистого шарів СА1 зони. Цитоархітектоніка СА3 зони виглядала практично не зміненою.

Зміни зубчастої звивини спостерігали переважно у внутрішньому, прилеглому до СА1 зони плечі. Вони полягали у зменшенні в гранулярному шарі кількості рядів клітин, що супроводжувалось

анізоцитозом з деяким збільшенням розміру частини клітин при збереженні типової нейрональної морфології. Будова зовнішнього плеча зберігалась практично інтактною. У воротах зубчастої звивини виявлено практично повну дегенерацію пірамідних клітин.

На тлі вищеописаних змін пірамідного шару СА1 зони у постішемичних тварин, у щурів трансплантованої групи через 1 місяць після трансплантації виявляли відносно більшу ЛЩ інтактних пірамідних клітин – 23 (13–49) кл/мм (**Рис. 3.3В**) [98]. При цьому власне зона трансплантації зазнала трансформації у вигляді формування гліально-фіброзного рубця, навколо якого спостерігалось скупчення клітин з морфологією, характерною для пірамідних нейронів. У променистому шарі на фоні практично повної гомогенізації та мікровакуолізації спостерігали поодинокі ділянки нормальної волокнистої будови. Вони розташовувались безпосередньо поруч з пірамідним шаром, який містив морфологічно нормальні пірамідні нейрони. З огляду на невелику кількість таких ділянок морфометричний аналіз променистого шару також не проводили.

У переважної більшості трансплантованих тварин кількість рядів клітин у гранулярному шарі внутрішнього плеча зростала до 9–10 при збереженні характерної морфології гранулярних клітин. Лише у однієї тварини виявили спустошення гранулярного шару внутрішнього плеча та зменшення кількості клітин у зовнішньому плечі. Жодних ознак дегенерації пірамідного шару у воротах зубчастої фасції не виявляли.

Через 4 місяці після ішемії у пірамідному шарі СА1 зони виявляли як поодинокі гіперхромні компактизовані некротичні тіла нейронів, так і морфологічно нормальні пірамідні клітини з ЛЩ 87 (72–98) кл/мм (**Рис. 3.4А**).

Розташування пірамідних нейронів в один, і лише місцями в 2 ряди, хоч і нагадувало пірамідний шар у контрольних тварин, однак було досить хаотичним. Променистий шар порівняно з контрольними

тваринами був істотно більш розрідженим. Характерну рівнобіжність апікальних дендритів спостерігали рідко, переважно їхні волокна розташовані під більшим чи меншим кутом одне до одного. Мікровакуолізована частина променистого шару була зміщена до лакунозно-молекулярного шару. Ширина чітко диференційованого променистого шару становила 390 ± 59 мкм (дані отримано при морфометричному аналізі 31 поля зору). Суттєво меншою також була і мікрогліальна інфільтрація променистого і пірамідного шарів гіпокампа [98].

При аналізі зубчастої звивини у гранулярному шарі як зовнішнього, так і внутрішнього плечей спостерігали гіперхромні некротизовані тіла гранулярних нейронів. Проте, якщо у зовнішньому плечі також виявляли і масивний перицелюлярний набряк навколо гранулярних клітин із компактизацією їхнього ядра, то у внутрішньому плечі переважна більшість гранулярних клітин мала незмінену морфологію. У пірамідному шарі спостерігали виражену дегенерацію при наявності лише поодиноких інтактних пірамідних нейронів.

Через 3 місяці після трансплантації ФНТ пірамідний шар CA1 зони складався із чітко диференційованих 1–2 рядів пірамідних нейронів з лінійною щільністю 132 (112–154) кл/мм (**Рис. 3.4В**) [98]. Некротизованих тіл нейронів не виявлено. У місці введення трансплантату спостерігали гліально-рубцеві зміни. Власне зона введення капіляра мікроін'єктора не містила пірамідних клітин, але вони розташовувались навколо цієї зони. Променистий шар зберігав виражені ознаки розрідження і мікровакуолізації, ширина чітко диференційованого шару з характерною радіальною будовою становила 535 ± 73 мкм (70 полів зору).

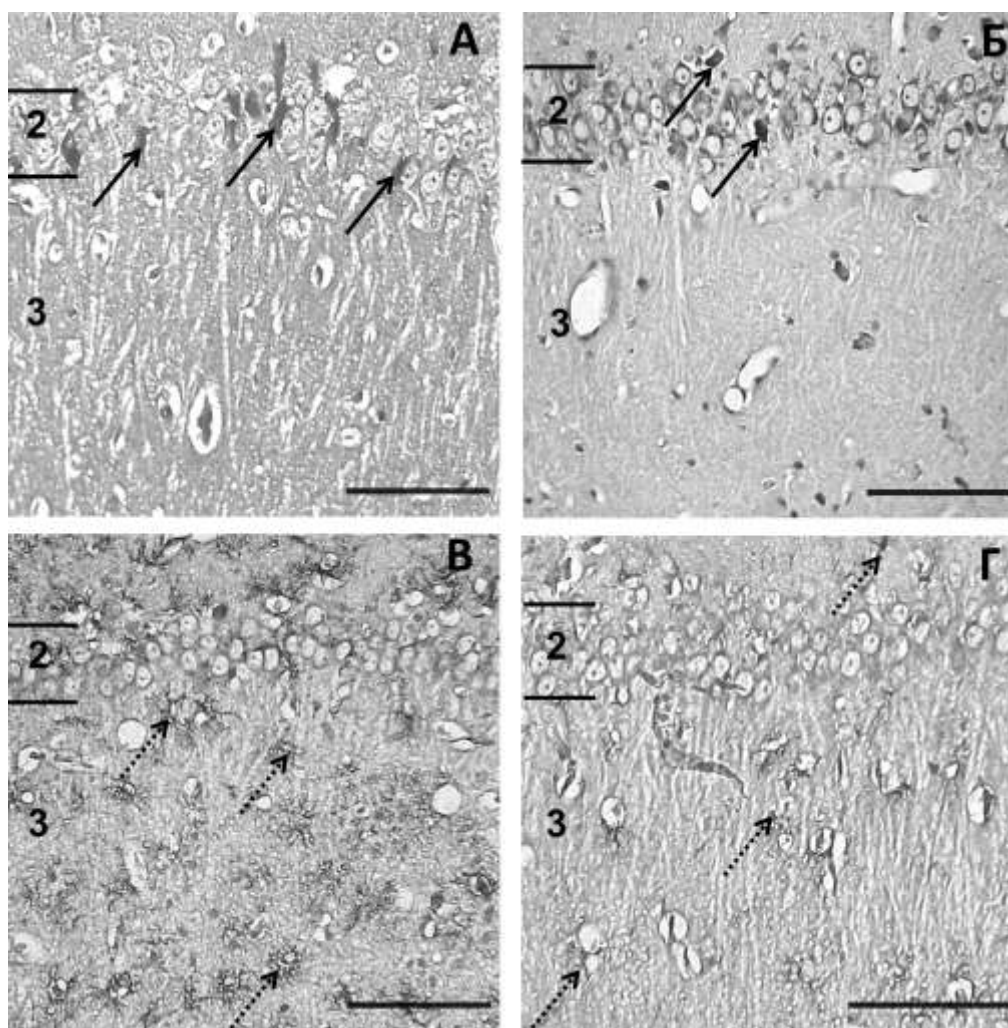


Рис. 3.4. Мікрофотографії CA1 зони гіпокампа. (А) 4 місяці після ішемії. (Б) 7 місяців після ішемії. (В) 3 місяці після трансплантації ФНТ. (Г) 6 місяців після ФНТ. 2 – пірамідний шар, 3 – променистий шар. Стрілками вказані пошкоджені клітини. Пунктирними стрілками позначені GFAP-позитивні астроцити. Зрізи дофарбовували розчином, який містив 1 % толюїдинового синього, 0,5 % метиленового синього і 1 % тетраборнокислого натрія. Шкала = 50 мкм.

У зубчастій звивині спостерігали як збільшення кількості рядів гранулярного шару внутрішнього плеча, так і його спустошення. У воротах зубчастої звивини виявляли незмінені пірамідні клітини.

При вивченні зрізів гіпокампа, забарвлених поліклональними антитілами до GFAP, виявляли інтенсивну проліферацію астроцитів переважно у внутрішньому плечі зубчастої звивини з поширенням її в ділянку введення трансплантату.

Через 7 місяців після ішемії пірамідні нейрони в СА1 зоні гіпокампа були розташовані у 2–3 ряди з ЛЩ 134 (117–154) кл/мм (**Рис. 3.4Б**). Нейропіль, зокрема в променистому шарі, містив достатньо обширні ділянки мікровакуолізації ближче до лакунозно-молекулярного шару, однак структура променистого шару наближалась до нормальної. Ширина променистого шару (ШППШ) становила 432 ± 108 мкм (60 полів зору).

У будові зубчастої звивини порівняно з контролем суттєвих особливостей не виявлено.

Через 6 місяців після трансплантації ФНТ пірамідний шар трансплантованих тварин містив нормальні пірамідні нейрони з ЛЩ 150 (128–168) кл/мм (**Рис. 3.4Г**) [98].

У ділянках введення трансплантату спостерігали розрідження пірамідного шару, яке повністю нівелювалось на відстані 60–70 мкм від точки трансплантації.

Структура нейропіля променистого шару відповідала нормальній, зі збереженням рівнобіжності волокон, ШППШ становила 582 ± 130 мкм (145 полів зору). Ділянки мікровакуолізації поодинокі.

У зубчастій звивині більшості тварин відмічали дегенерацію гранулярного шару внутрішнього плеча при практично інтактних зовнішньому плечі та пірамідному шарі.

Кількість GFAP-позитивних клітин, порівняно з групою тварин через 3 місяці після трансплантації, була меншою, однак подібно до цієї групи також відмічались їх скупчення у дегенерованому плечі зубчастої звивини та в зоні введення трансплантату.

Порівняльний аналіз. Аналізували такі групи тварин: через 2 місяці (група І1, $n = 14$), 4 місяці (група І2, $n = 12$) та 7 місяців (група І3, $n = 11$) після оклюзії, а також – через 1 місяць (група Т1, $n = 15$), 3 місяці (група Т2, $n = 13$) та 6 місяців (група Т3, $n = 12$) після трансплантації.

Отримані при морфометричному аналізі пірамідного шару СА1 зони гіпокампа ряди значень ЛЩ у групах І1 і Т1 не задовольняли вимогам нормального розподілу. Тому для міжгрупового порівняння значень ЛЩ використовували непараметричний метод Манна-Вітні.

При попарному порівнянні відповідних постішемічних та трансплантованих груп (І1-Т1, І2-Т2 та І3-Т3) ЛЩ пірамідних клітин та ШПШ були достовірно вищими у трансплантованих групах (**Табл. 3.1**).

При порівнянні значень ЛЩ пірамідних клітин СА1-зони гіпокампа між постішемічними групами відмічали достовірне збільшення цього показника протягом всього часу спостереження.

Так, ЛЩ із значення 4 (3-9) в групі І1 зростала до 87 (72–98) в групі І2 ($U = 1248$, $U_p = 624$, $P < 1 \times 10^{-9}$) і до 134 (117–154) в групі І3 (порівняння І2–І3: $U = 52$, $U_p = 360$, $P = 1,24 \times 10^{-9}$).

Аналогічно виявляли достовірне зростання ЛЩ у групах трансплантованих тварин: із значення 23 (13–49) в групі Т1 – до 132 (112–154) у групі Т2 ($U = 206$, $U_p = 3960$, $P < 1 \times 10^{-9}$) і до 150 (128–168) у групі Т3 (порівняння Т2–Т3: $U = 3315$, $U_p = 4608$, $P = 5,01 \times 10^{-4}$).

Однак навіть через 7 міс після ішемії та через 6 міс після ТФНТ значення ЛЩ були достовірно нижчими, ніж у контрольної групи (198 (182–208)): І3–К – $U = 210$, $U_p = 105$, $P = 9,71 \times 10^{-8}$; Т3–К – $U = 836$, $U_p = 448$, $P = 3,46 \times 10^{-6}$ (**Табл. 3.1**).

Також спостерігали достовірне зростання ШПШ у тих постішемічних групах, де його вимірювання було можливим.

Таблиця 3.1.

Результати міжгрупового попарного порівняння значень лінійної щільності (ЛЩ) пірамідних клітин та ширини променистого шару (ШПШ) СА1 зони гіпокампа

Групи тварин	Лінійна щільність, клітин/мм	Порівняння ЛЩ, U-критерій Манна-Вітні	Ширина променистого шару, мкм	Порівняння ШПШ, t-тест Стьюдента
I1	4 (3–9)	U = 619, U _p = 2860 $P < 1 \times 10^{-9}$	не проводили	не проводили
T1	23 (13–49)			
I2	87 (72–98)	U = 235, U _p = 864 $P = 4,9 \times 10^{-9}$	390 ± 59	$t = -9,75$, $t_{\text{крит}} = 1,66$ $P < 1 \times 10^{-9}$
T2	132 (112–154)		535 ± 73	
I3	134 (117–154)	U = 1414, U _p = 1920 $P = 0,012$	432 ± 108	$t = -7,88$, $t_{\text{крит}} = 1,65$ $P < 1 \times 10^{-9}$
T3	150 (128–168)		582 ± 130	
K	198 (182–208)		682 ± 36	

U-критерій Манна-Вітні: U – фактичне значення, U_p – математичне очікування значення; t-тест Стьюдента: t - фактичне значення; t_{крит} – критичне значення. З огляду на особливості використаного програмного забезпечення значення P менші, ніж 10^{-9} , не обчислювались. Такі величини позначені як $P < 1 \times 10^{-9}$.

Значення ШПШ з 390 ± 59 мкм у групі I2 зростало до 432 ± 108 мкм у групі I3 ($t = -1,99$, $t_{\text{крит}} = 1,66$, $P = 2,47 \times 10^{-2}$). У тварин з трансплантованих груп відмічали зростання ШПШ зі значення 535 ± 73 мкм у групі T2 до 582 ± 130 мкм у групі T3 ($t = -2,82$, $t_{\text{крит}} = 1,65$, $P = 2,62 \times 10^{-3}$). Але значення ШПШ в групах I3 та T3 були достовірно нижчими, ніж у контрольній (682 ± 36 мкм): I3–K – $t = -15,17$, $t_{\text{крит}} = 1,66$, $P < 1 \times 10^{-9}$; T3–K – $t = -5,24$, $t_{\text{крит}} = 1,65$, $P = 2,18 \times 10^{-7}$ (Табл. 3.1).

Отже, транзиторна глобальна ішемія головного мозку дорослих щурів призводить до практично тотальної загибелі пірамідних клітин СА1

зони гіпокампа та викликає гіперпроліферацію у гранулярному шарі зубчастої звивини. Такі зміни чітко проявляються через 2 місяці після ішемії. У подальшому спостерігається спонтанне поступове відновлення структури СА1 зони та нормалізація стану зубчастої звивини. Проте і через 7 місяців після ішемії лінійна щільність клітин у пірамідному шарі та ширина променистого шару не сягають контрольних значень.

Пізня, через 30 діб після ішемії, трансплантація суспензії фетальної нервової тканини, що містить клітини СА1 зони та зародкової зубчастої звивини, спричиняє тривале стимулювання репаративних процесів у гіпокампі і прискорює відновлення його цитоархітекtonіки.

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НЕЙРАЛЬНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН (НПК) НА СТАН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ ТА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ МИШЕЙ ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ.

Як зазначалося вище, трансплантація суспензії фетальної нервової тканини спричиняє тривале стимулювання репаративних процесів у гіпокампі і прискорює відновлення його цитоархітекτονіки. Але виникає питання: завдяки чому відбуваються ці репаративні процеси – структурній та функціональній інтеграції трансплантованих клітин у нейронні мережі реципієнта та довготривалого їх виживання чи завдяки гуморальному ефекту – короткотривалому існуванню донорських клітин, їх загибелі і вивільнені нейропротекторних факторів?

Для відповіді на це питання необхідно помітити трансплантовані клітини для дослідження їх міграції, інтеграції та можливого диференціювання у тканині реципієнта. Тому в подальших експериментах ми використовували НПК, мічені зеленим флюоресцентним білком (GFP).

4.1. Характеристика нейральних прогеніторних клітин *in vitro*

Перед трансплантацією ми аналізували фенотипічні особливості нейральних прогеніторних клітин. Для цього використовували адгезивні культури клітин, отримані з фетального гіпокампа мишей, та культивували їх у вигляді моношару у безсироватковому середовищі з додаванням FGF-2.

Методом проточної цитометрії на лазерному цитофлюориметрі-сортері FACS Aria («Becton Dickinson», США) визначали відсоток життєздатних свіжоізолюваних нейральних прогеніторних клітин після

інкубації суспензії клітин з 7-аміноактиноміцином (7-AAD). Відсоток життєздатних клітин після виділення з гіпокампа і очищення становив від 89,8 % до 93,5 %. Вміст GFP-позитивних клітин серед життєздатних у даній фракції становив від 97,5 % до 99,6 % (Рис. 4.1) [310].

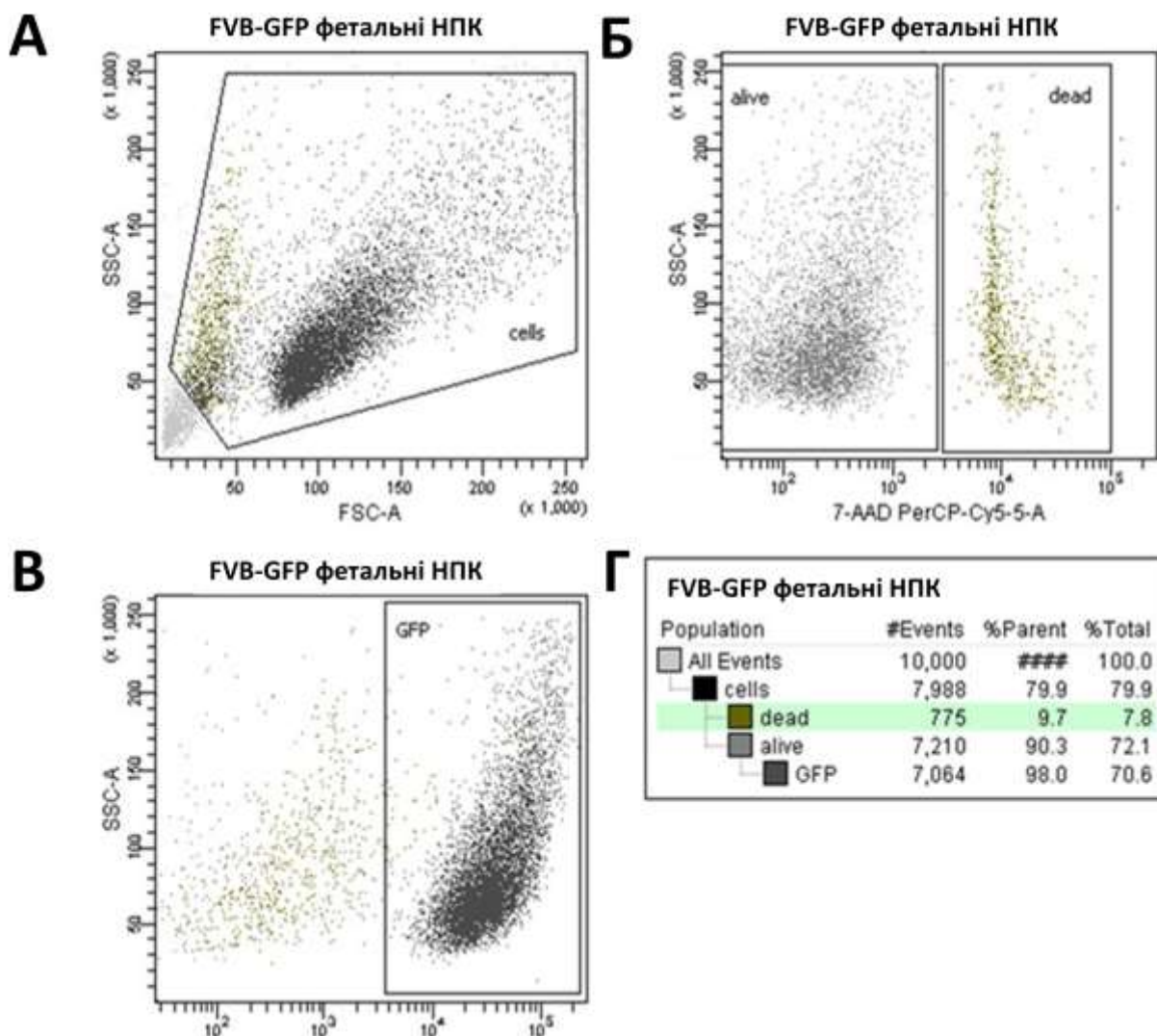
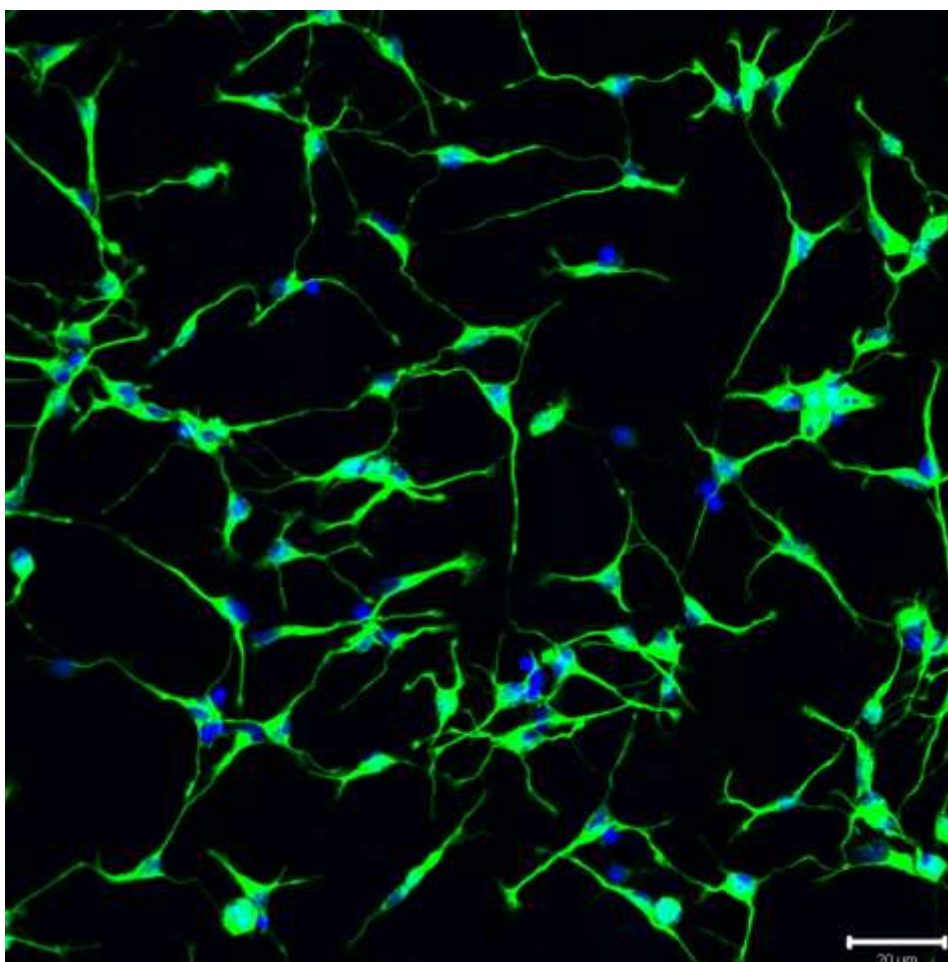


Рис. 4.1. Визначення за допомогою лазерного цитофлюориметра-сортера FACSaria кількості життєздатних і GFP-позитивних клітин у суспензії клітин. А – відбір популяції непошкоджених клітин; Б – виявлення загиблих клітин на каналі флюоресценції PerCP-Cy5.5 за поглинанням 7-AAD; В – виявлення GFP-позитивних живих клітин на каналі флюоресценції FITC; Г – абсолютна та відносна кількість проаналізованих клітин за ієрархією аналізу.

На третю добу культивування нейральні прогенітори з фетального гіпокампа миші мали переважно округлу або біполярну форму і тонкі відростки (**Рис. 4.2**) [310].

Імуноцитохімічний аналіз показав, що більшість клітин (95.2 ± 2.4 %) експресували Nestin (**Рис. 4.2**) [310], що характерно для нейральних клітин-попередників [148].



***Рис. 4.2.** Конфокальна мікрофотографія культури нейральних прогеніторів. Більшість клітин імунопозитивні на Nestin (зелений колір). Ядра контрастовані Hoechst 33342 (синій колір). Шкала = 20 мкм.*

Слід зазначити, що прогеніторні клітини в присутності Matrigel

не генерували нейросфери, а проліферували, утворювали колонії і, на 6-у добу культивування, розподілялися рівномірно по чашці Петрі, формуючи моношар. Така адгезивна культура створює умови для більш рівномірного доступу FGF-2 до клітин, що сприяє формуванню гомогенної популяції недиференційованих прогеніторних клітин.

Наступним кроком у характеристиці НПК був ультраструктурний аналіз адгезивної культури з використанням трансмісійного електронного мікроскопа.

Електронно-мікроскопічний аналіз показав, що НПК гіпокампа та прогенітори з СВЗ у культурі мали схожі ультраструктурні характеристики. На 3 добу культивування НПК з фетального гіпокампа мали велике ядро та цитоплазму з малою кількістю недорозвинених органел (**Рис. 4.3А**) [306]. Жодна з проаналізованих клітин не мала ультраструктурні характеристики, типові для зрілих нейронів (такі як синаптичні контакти), астроцитів (пучки проміжних філаментів і гранули глікогену) або епендимоцитів (множинні війки і мікроворсинки).

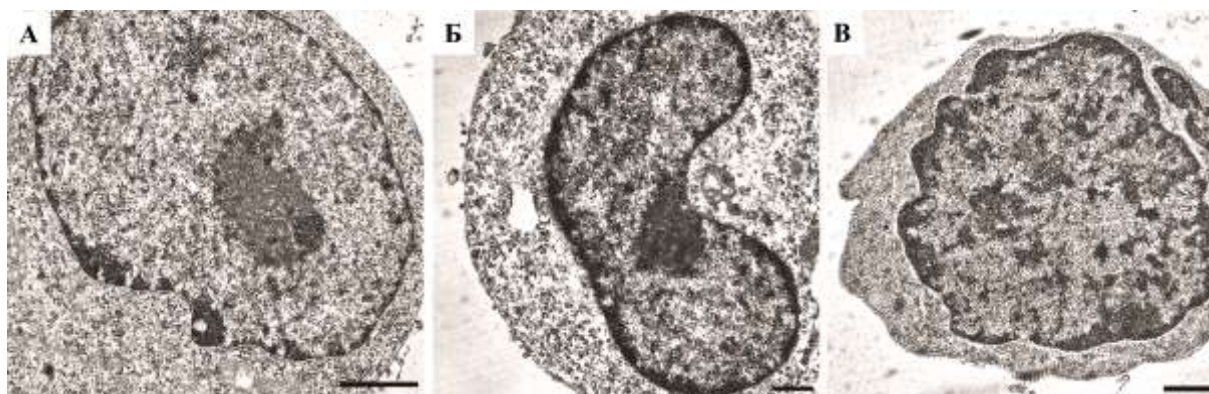


Рис. 4.3. Електронограми, що демонструють різні форми ядер НПК. НПК в адгезивній культурі мали округле (А), ниркоподібне (Б) або неправильної форми (В) ядро. Шкала = 1 мкм.

Більшість НПК, як правило, мали тільки одне еухроматинове

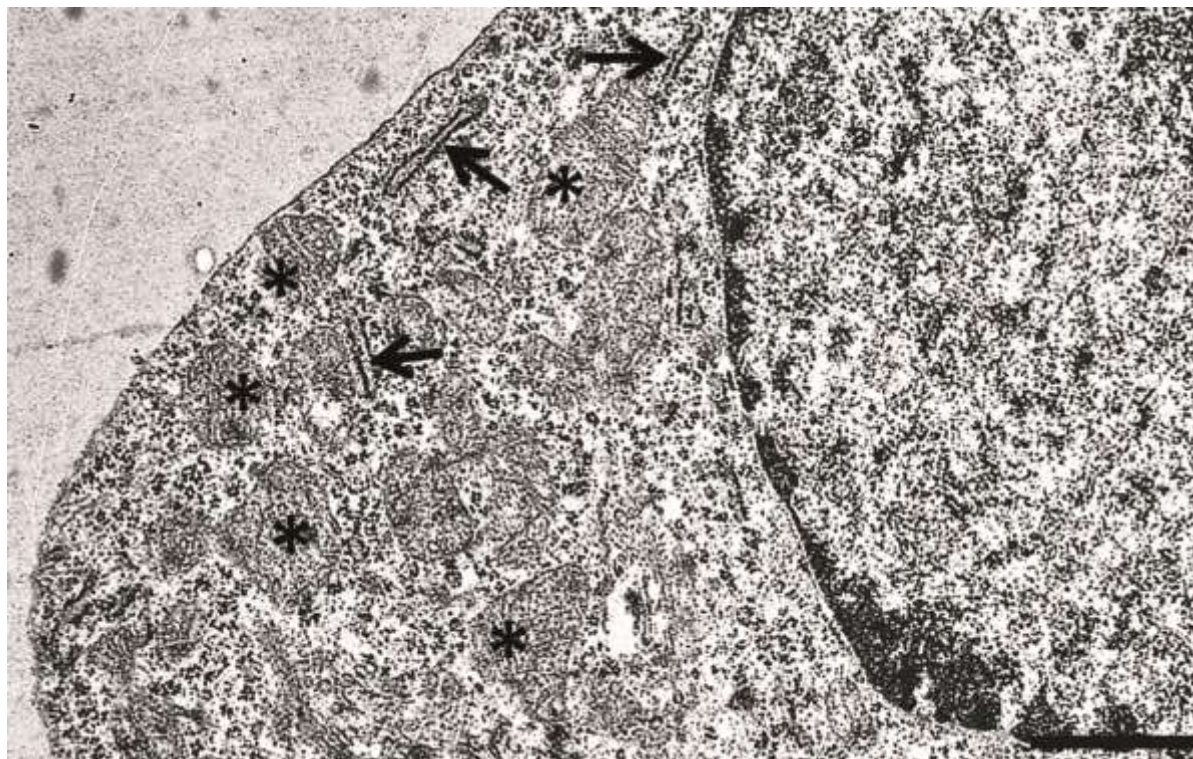
ядро округлої (**Рис. 4.3А**) або ниркоподібної форми (**Рис. 4.3В**). Деякі клітини мали ядра неправильної форми (**Рис. 4.3С**). НПК мали високе ядерно-цитоплазматичне співвідношення, діаметр соми був $10,71 \pm 2,5$ мкм, а ядра – $8,66 \pm 0,8$ мкм. Ядра були відокремлені від цитоплазми ядерною оболонкою, яка мала дві мембрани (зовнішню і внутрішню) з чітким простором між ними (**Рис. 4.4**) [306].



***Рис. 4.4.** Ультраструктурна організація ядра НПК. Стрілки показують комплекси ядерних пор. Шкала = 1 мкм.*

Слід зазначити, що добре візуалізувався комплекс ядерних пор з невеликою кількістю хроматину в безпосередній близькості від них (**Рис. 4.4**). НПК зазвичай мали лише одне ядерце, рідше два або більше (**Рис. 4.4**).

Ультраструктурний аналіз показав, що мітохондрії НПК мали округлу або овоїдну форму (**Рис. 4.5**).



***Рис. 4.5.** Електронограма, що демонструє цитоплазму НПК. Цитоплазма нейральних прогеніторів містила мітохондрії (зірочки), гранулярний ендоплазматичний ретикулум (стрілки) і значну кількість рибосом. Шкала = 1 мкм.*

На гранулярному ендоплазматичному ретикулумі спостерігали значну кількість полісом (**Рис. 4.5**). Крім того, НПК мали велику кількість вільних рибосом, більшість з яких були об'єднані у полісоми, розподілені по всій цитоплазмі. Такі вільні полісоми, як правило, склалися з декількох (5 або 6) рибосом, тоді як мембранні полісоми мали більшу кількість (до 20) рибосом [306].

Варто зазначити, що у цитоплазмі нейральних прогеніторів були

наявні первинні та вторинні лізосоми (**Рис. 4.6**).

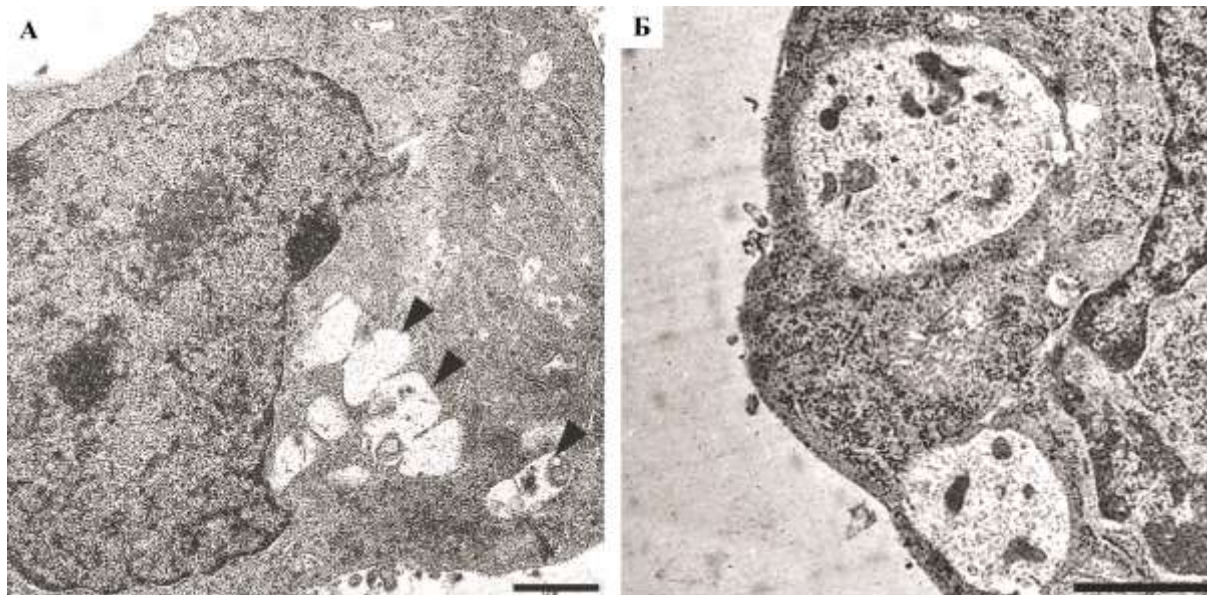


Рис. 4.6. Лізосоми (стрілки) в цитоплазмі НПК (А). Б - лізосоми при збільшенні. Шкала = 1 мкм.

Серед клітин моношару було чітко видно клітини, які діляться, що підтверджує добре встановлений факт, що НПК – це активно проліферуючі клітини. Мітотичні клітини мали різні ультраструктурні характеристики залежно від фази клітинного циклу.

Під час анафази, ядерна оболонка в цих клітинах була дезінтегрована і хромосоми поділені, а під час телофази хроматин розподілявся серед двох дочірніх ядер і навколо них формувалися ядерні оболонки.

Після каріокінезу спостерігався цитокінез з формуванням материнської та дочірньої клітини (**Рис. 4.7**) [306].

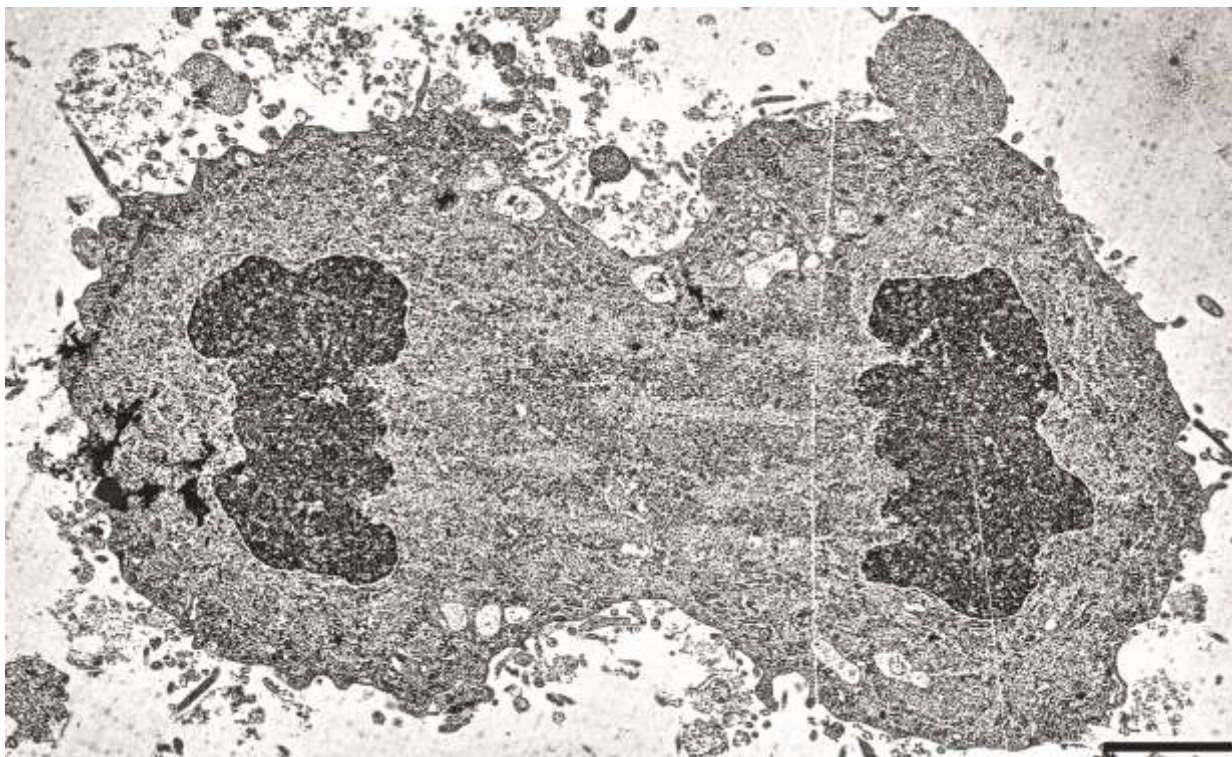


Рис. 4.7. Цитокінез нейральної прогеніторної клітини. Хромосоми рухаються до протилежних полюсів клітини. Шкала = 2 мкм.

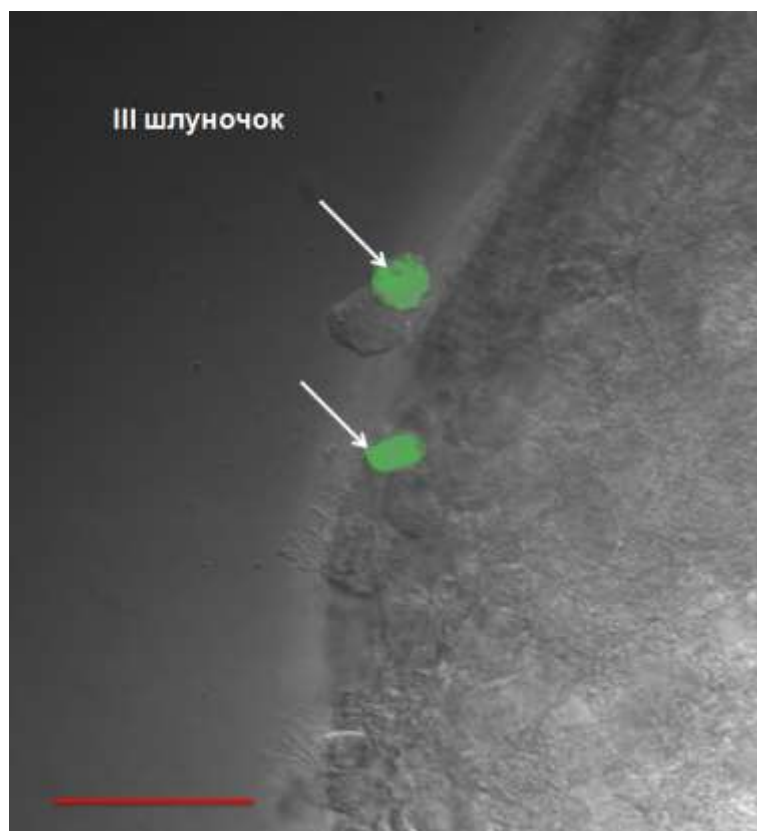
Таким чином, електронно-мікроскопічний аналіз виявив ультраструктурні характеристики нейральних прогеніторів фетального гіпокампа в культурі і показав, що ці клітини є недиференційованими клітинами з проліферативною активністю.

4.2. Міграція та диференціювання трансплантованих фетальних нейральних клітин у мозку ішемізованих тварин

Для дослідження міграції та диференціювання фетальних нейральних клітин ішемізованим тваринам субокципітально вводили свіжовиділені GFP-позитивні фетальні НПК на 1 добу після оклюзії. Трансплантовані клітини візуалізувалися за допомогою імуногістохімічного фарбування зрізів мозку з використанням антитіл до

GFP.

На 7-му добу після трансплантації фетальних НПК основна кількість GFP-позитивних клітин знаходилась на епендимальній поверхні 3-го шлуночка мозку і була представлена округлими клітинами без відростків (**Рис. 4.8**) [310].



***Рис. 4.8.** Трансплантовані GFP-позитивні нейральні фетальні клітини (відмічені стрілками) на 7-му добу після трансплантації контактують з епендимальною поверхнею 3-го шлуночка. Поєднання зображень фазового контрасту та імуногістохімічного фарбування. Шкала – 50 мкм.*

Також спостерігалось скупчення GFP-позитивних клітин в медіальному ганглії повідка таламуса безпосередньо за епендимальним шаром. Здебільшого це були клітини витягнутої форми з відростком.

Імуногістохімічне дослідження таких клітин показало, що деякі з них все ще експресували Nestin – маркер нейральних прогеніторних клітин, що свідчить про їх недиференційований стан. У цей термін була виявлена міграція незначної кількості GFP-позитивних клітин в зону ішемії.

На 14-ту добу після трансплантації GFP-позитивні клітини мігрували у зону ішемічного ушкодження та вбудовувалися в СА1 зону гіпокампа.

Імуногістохімічне фарбування показало, що GFP-позитивні клітини диференціювалися в клітини з нейрональним (експресія маркера NeuN) (**Рис. 4.9А**) та гліальним (GFAP-позитивні) (**Рис. 4.9Б**) фенотипом [310].

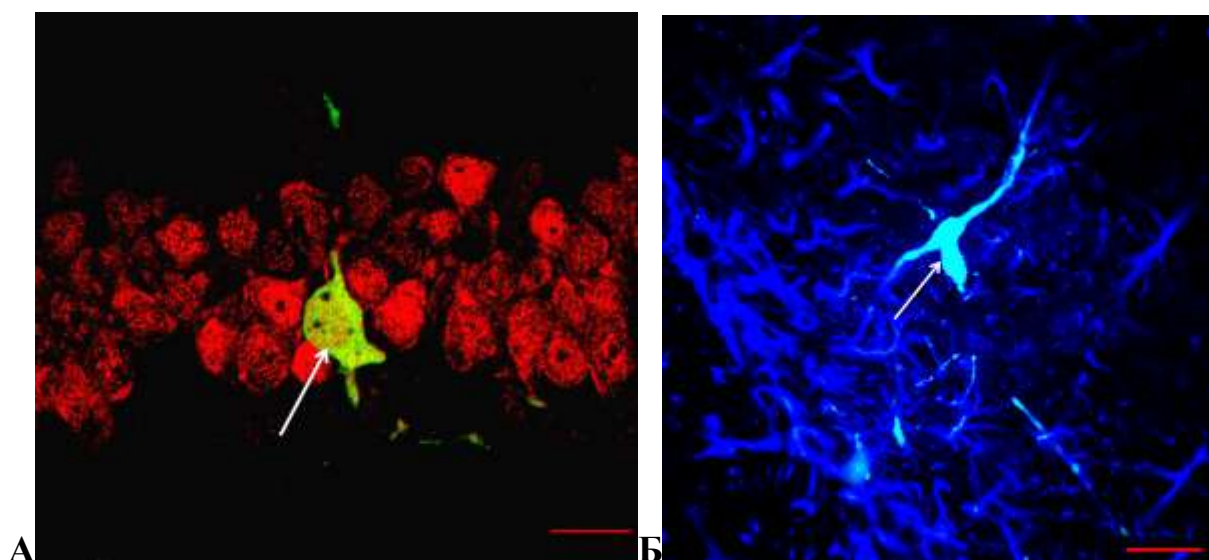
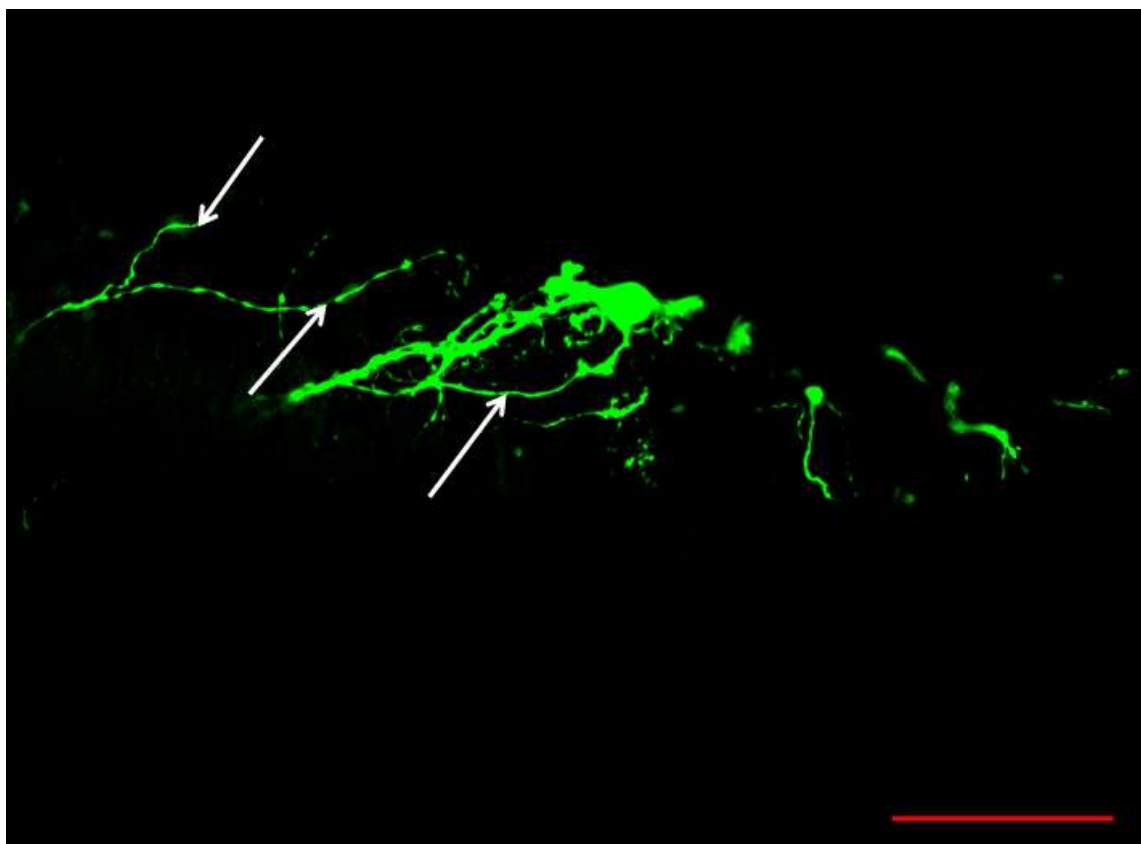


Рис. 4.9. СА1 зона гіпокампа на 14-ту добу після трансплантації. (А) Стрілкою вказана GFP-позитивна клітина (зелений колір) у пірамідному шарі, що експресує NeuN (червоний колір) – маркер зрілих нейронів. (Б) Стрілкою вказана GFP-позитивна клітина, що експресує GFAP (синій колір) – маркер астроцитів. Шкала – 20 мкм.

На 28-му добу у значної кількості GFP-позитивних клітин, які експресували NeuN, спостерігалася арборизація дендритних відростків (**Рис. 4.10**) [310].



***Рис. 4.10.** GFP-позитивні нейрони з добре розгалуженими відростками (вказані стрілками) у СА1 зоні гіпокампа на 28-му добу після трансплантації. Шкала – 50 мкм.*

На 90-ту добу після трансплантації GFP-позитивні нейрони мали розгалужене дендритне дерево (**Рис. 4.11**) [310].

На дендритах виявлялись чітко виражені шипики (**Рис. 4.11, вставка**), що може свідчити про утворення синаптичних контактів між

трансплантованими клітинами та нейронами гіпокампа реципієнта.

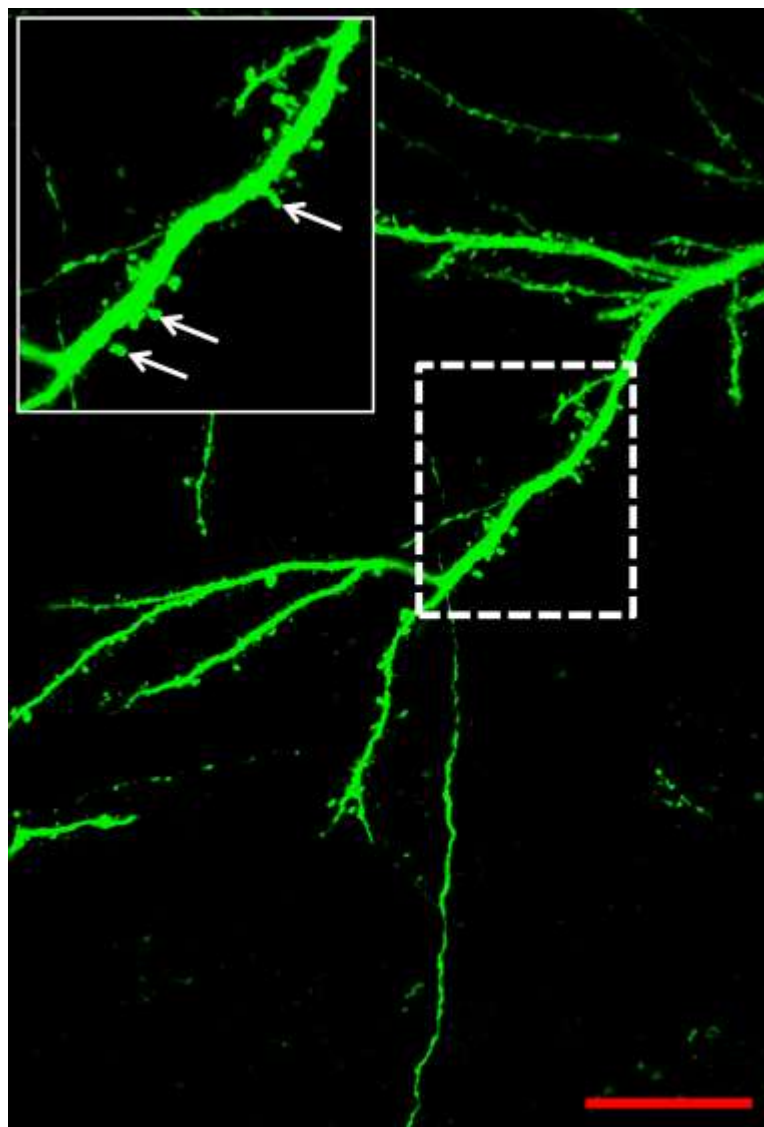


Рис. 4.11. Конфокальне зображення GFP-позитивних дендритів. На 90-ту добу після трансплантації GFP-позитивні дендрити мають добре розвинені шипики (вставка). Вставка відповідає збільшеному зображенню дендритів з шипиками (стрілки). Шкала = 10 мкм.

Таким чином, ми дослідили можливість довгострокового виживання фетальних НПК у мозку ішемізованих тварин. Наші результати

свідчать про те, що GFP – це надійний нетоксичний маркер, який дозволяє ідентифікувати донорські клітини навіть до 90 діб після трансплантації. Трансплантовані фетальні нейральні клітини здатні виживати у мозку ішемізованих тварин навіть до 90 діб після трансплантації. На 7 та 14 доби після трансплантації фетальні НПК мігрували в ушкоджені ділянки зони СА1 гіпокампа та диференціювалися як в астроцити, так і в зрілі нейрони з добре розвиненими дендритами та шипиками.

4.3. Утворення синаптичних контактів між трансплантованими НПК та нейронами гіпокампа реципієнта після ішемічного ушкодження мозку

У попередній серії експериментів на моделі ішемічного ушкодження *in vivo* було показано, що трансплантовані GFP-позитивні клітини диференціювалися у зрілі нейрони та мали добре розгалужене дендритне дерево з численними шипиками, що може свідчити про утворення синаптичних контактів між трансплантованими клітинами та нейронами гіпокампа реципієнта. Для підтвердження цієї гіпотези ми використовували імуногістохімічний аналіз на електронно-мікроскопічному рівні. Ультраструктурний аналіз підтвердив, що GFP/DAB-позитивні постсинаптичні структури утворювали контакти із GFP-негативними пресинапсами (Рис. 4.12А,Б) [311].

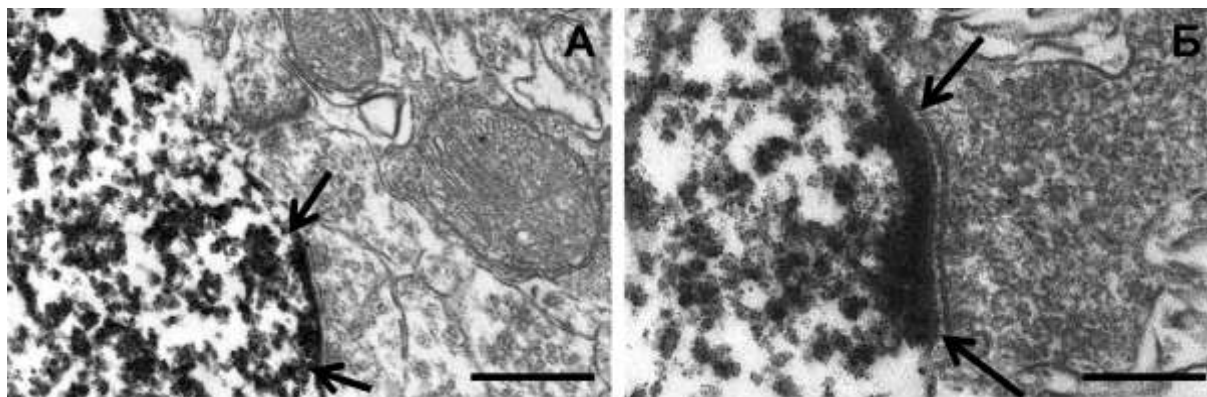


Рис. 4.12. (А-Б) Електронограми синаптичних контактів (стрілки). Шкала: А=0.5 мкм, Б=0.2 мкм.

Для визначення синаптичних контактів використовували такі критерії: наявність синаптичних везикул (СВ) у пресинапсі, синаптичної щілини та постсинаптичної щільності (ПЩ) (Рис. 4.13).

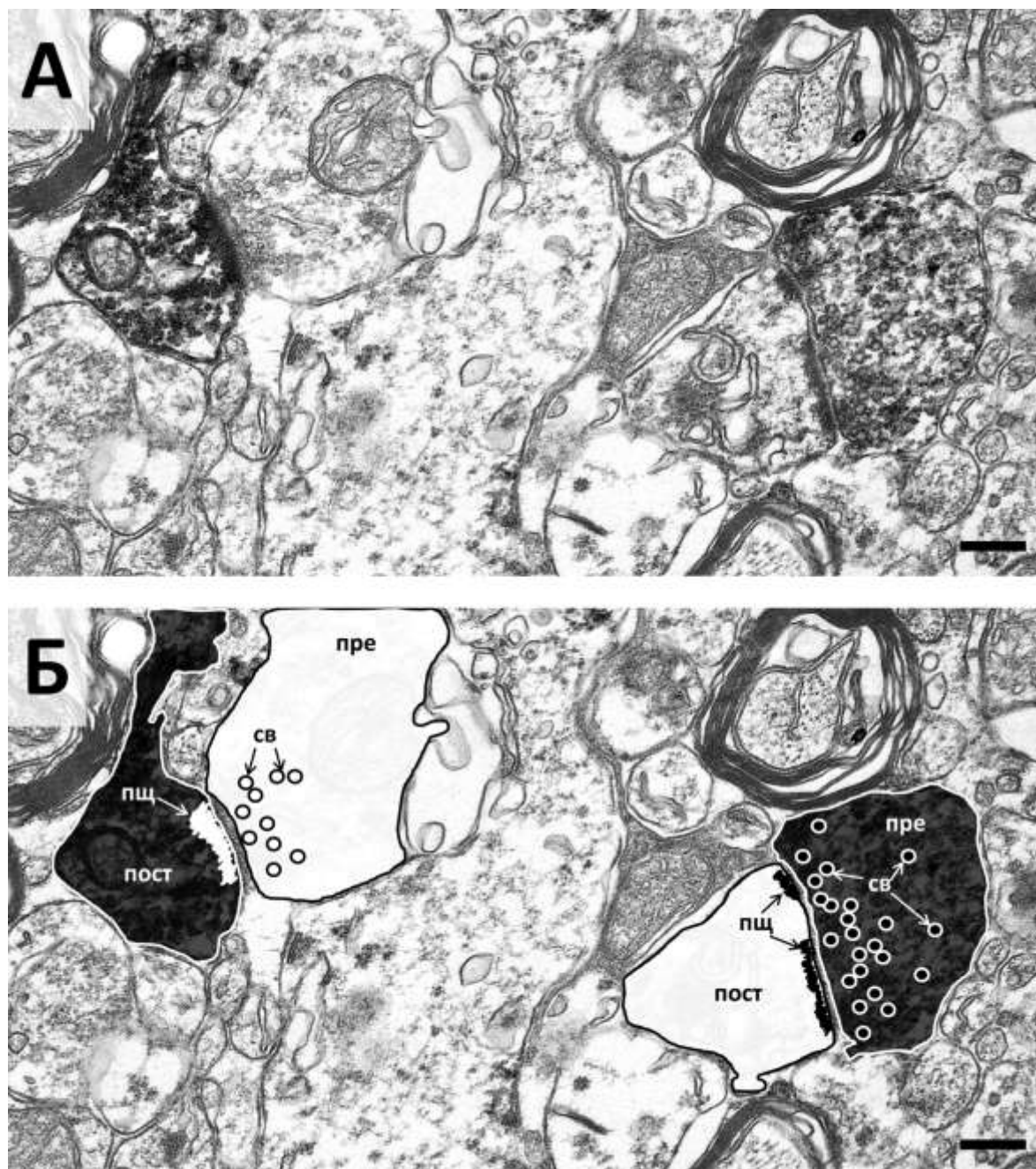


Рис. 4.13. Електронно-мікроскопічні зображення GFP/DAB-позитивних синаптичних контактів. (А) Два GFP/DAB-позитивні синаптичні контакти. Зліва – простий синапс з безперервною

постсинаптичною щільністю (ПЩ) у GFP/DAB-позитивній постсинаптичній структурі (ПОСТ), що контактує з GFP-негативною пресинаптичною терміналлю (ПРЕ). Справа – перфорований синапс з чітким перериванням ПЩ (вказано стрілками) у GFP/DAB-негативній постсинаптичній структурі (ПОСТ), що контактує з GFP-позитивною пресинаптичною терміналлю (ПРЕ). (Б) Схематичне зображення електронограми (А). Чорним кольором позначені GFP/DAB-позитивні структури, білим – GFP/DAB-негативні. ПРЕ – пресинаптична терміналь, ПОСТ – постсинаптична структура, ПЩ – постсинаптична щільність, СВ – синаптичні везикули. Шкала = 0,2 мкм.

Ультраструктурні характеристики синаптичних контактів, утворених донорськими клітинами, не відрізнялися від синапсів у гіпокампі реципієнта. Спостерігали різні типи синаптичних контактів: прості, що мали безперервну ПЩ (**Рис. 4.13** лівий синапс) і перфоровані з переривчастою ПЩ (**Рис. 4.13** правий синапс) [356].

Ми також спостерігали не лише постсинаптичну локалізацію GFP+, а також і пресинаптичну (**Рис. 4.13**) [356].

Таким чином, імуногістохімічне фарбування на електронно-мікроскопічному рівні із використанням антитіл проти GFP дає можливість не тільки ідентифікувати GFP-позитивні трансплантовані клітини у тканині реципієнта, але й в деяких випадках проаналізувати потенційне диференціювання конкретної донорської клітини, уникаючи подвійного чи потрійного імуногістохімічного фарбування.

Крім того, електронна мікроскопія також дозволяє аналізувати взаємодію GFP-позитивних донорських клітин із клітинами реципієнта або інші морфологічні аспекти, які важко виявляти за допомогою конфокальної мікроскопії. Як було показано [356], електронна мікроскопія дозволяє дослідити утворення синаптичних контактів між трансплантованими GFP-

позитивними клітинам та нейронами реципієнта, а також аналізувати ультраструктурні характеристики таких контактів.

Також результати електронно-мікроскопічного аналізу свідчать про те, що GFP – це зручний маркер для мічення донорських GFP-позитивних клітин, який дозволяє візуалізувати їх не лише на світловому рівні, а й на електронно-мікроскопічному із збереженням ультраструктурних характеристик трансплантованих клітин.

Отже, ультраструктурний аналіз показав, що субокципітальна трансплантація GFP-позитивних фетальних нейральних клітин сприяла утворенню синаптичних контактів між донорськими клітинами та нейронами реципієнта на 90 добу після трансплантації ішемізованим тваринам.

4.4. Вплив трансплантації НПК на ендogenous нейрогенез у мишей після ішемічного ушкодження мозку

Крім паратопічної трансплантації (введення нейротрансплантату в лікворний простір головного мозку шляхом субокципітальної пункції) досить поширеною є ортотопічна – інтрацеребральне введення нейротрансплантату в певні структури головного мозку за допомогою стереотаксичної техніки [112, 284, 329]. Тому у подальших наших експериментах ми використовували стереотаксичну нейротрансплантацію у гіпокамп.

Відомо, що гіпокамп – структура мозку, в якій нейрогенез динамічно регулюється протягом усього життя [77]. Тому для дослідження впливу ішемічного ушкодження на нейрогенез ми обрали саме гіпокамп.

Для створення експериментальної глобальної ішемії головного мозку ми використовували двосудинну оклюзію загальних сонних артерій у мишей лінії FVB дикого типу. Така модель призводить до ушкодження

пірамідних нейронів гіпокампа разом із активацією гліальних клітин (**Рис. 4.14**) [300].

Ми спостерігали ре-експресію Nestin GFAP-позитивними астроцитами (**Рис. 4.14В**) [300], що свідчить про перехід астроцитів із нормального стану в реактивний [51].

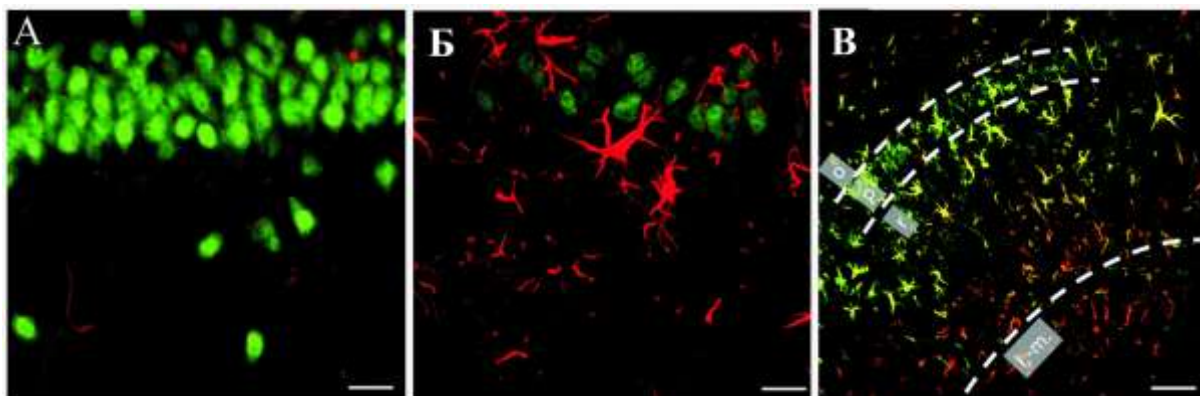


Рис. 4.14. Конфокальне зображення CA1 зони гіпокампа контрольної (А) та ішемізованої (Б, В) тварини. (А) NeuN-позитивні нейрони (зелений колір) були компактно розташовані в пірамідному шарі, а GFAP-позитивні астроцити (червоний колір) мали тонкі та довгі відростки. (Б) Ішемія-реперфузія призводила до значної втрати NeuN-позитивних нейронів (зелений колір) і гіпертрофії астроцитів (червоний колір) на 7 добу після ішемії. (В) Подвійне імуногістохімічні фарбування на GFAP (червоний колір) та Nestin (зелений колір) показало, колокалізацію (жовтий колір) GFAP та Nestin на 7 добу після ішемії-реперфузії. о – str. oriens, p – str. pyramidale, r – str. radiatum, l.-m. – str. lacunosum-moleculare. Шкала: А, Б = 20 мкм, В = 50 мкм.

Через 24 години після двобічної оклюзії загальних сонних артерій експериментальним тваринам 3-ї групи стереотаксично трансплантували у гіпокамп свіжоізольовані GFP-позитивні нейральні прогеніторні клітини.

Кількість GFP+ НПК була підрахована на 7, 14, 30 і 90 добу після трансплантації з використанням програмного забезпечення ImageJ. Загальну кількість GFP+ клітин оцінювали для кожного мозку в ділянках, що містили трансплантат, в 5 послідовних зрізах. Сумарна кількість GFP-позитивних клітин наведена у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка середнього.

На 7-му добу після трансплантації GFP-позитивні клітини спостерігалися в CA1 зоні гіпокампа і не мігрували далеко від місця ін'єкції (Рис. 4.15Б), кількість GFP+ НПК становила $632 \pm 33,8$ клітин (Рис. 4.15В).

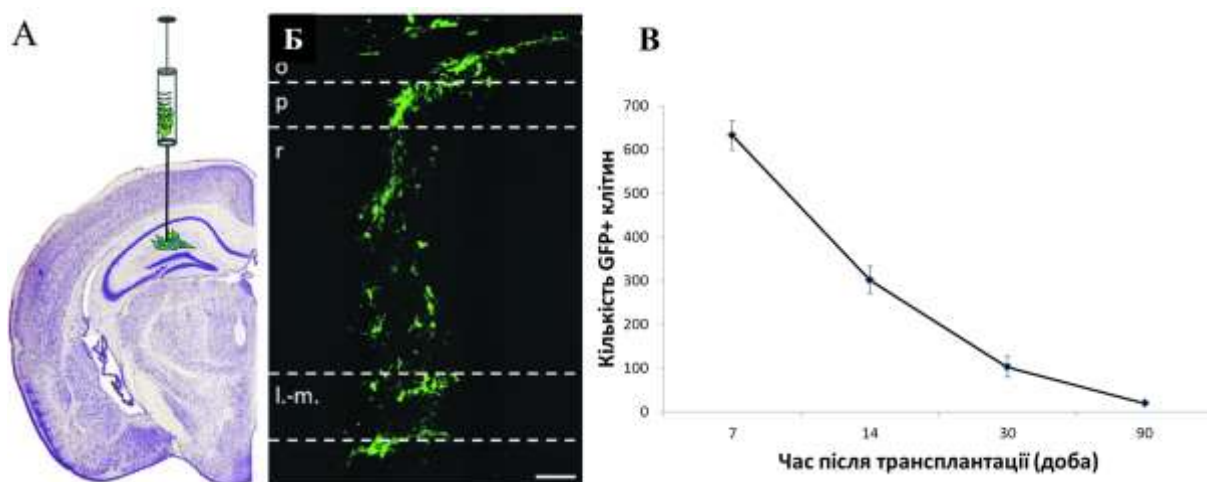


Рис. 4.15. Підрахунок кількості GFP-позитивних НПК після стереотаксичної трансплантації. (А) Схематичне зображення стереотаксичної трансплантації GFP+ НПК у CA1 зону гіпокампа. (В) Кофокальне зображення місця введення GFP-позитивних НПК у CA1 зону гіпокампа на 7-му добу після стереотаксичної трансплантації. (С) Кількість GFP-позитивних клітин у різні часові інтервали після трансплантації. Середнє значення \pm стандартна похибка середнього (SEM). o – str. oriens, p – str. pyramidale, r – str. radiatum, l.-m. – str. lacunosum-moleculare. Шкала = 100 мкм.

Ця величина була значно вищою за всі значення в будь-який інший день після трансплантації. На 14, 30 і 90-у добу GFP+ клітини мігрували від місця ін'єкції і були розподілені по всій CA1 зоні гіпокампа. На 90-у добу після трансплантації кількість GFP + клітин становила $19 \pm 2,5$ клітин (**Рис. 4.15B**) [300].

За дві доби до забору матеріалу для морфологічних досліджень тваринам з усіх експериментальних груп вводили BrdU – синтетичний нуклеозид, здатний замінювати тимідин у процесі реплікації ДНК, вбудовуючись в нову ДНК, що дозволяло виявляти пул проліферуючих клітин (**Рис. 4.16**).

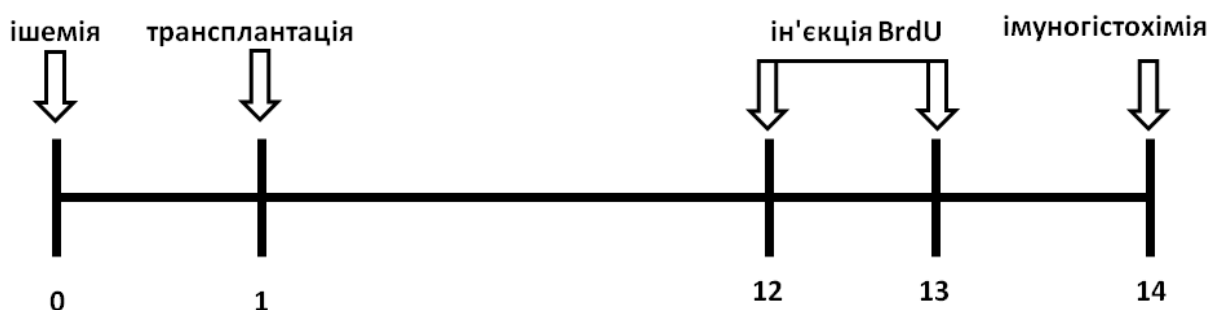


Рис. 4.16. Схема експерименту.

Кількість BrdU-позитивних клітин підраховували в зубчастій звивині гіпокампа в кожному п'ятому фронтальному зрізі мозку (координати: від 1,7 мм до 2,3 мм *posterior* від брегми). Усього було досліджено по 5 зрізів на тварину і сумарна кількість імунопозитивних клітин наведена у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка середнього.

Імуногістохімічне дослідження зрізів мозку з використанням антитіл до BrdU показало, що в гіпокампі несправжньооперованих тварин

спостерігався базовий рівень включення BrdU в клітини субгранулярної зони зубчастої звивини і кількість BrdU-позитивних клітин становила $24,33 \pm 2,06$ (Рис. 4.17А, 4.18) [355].

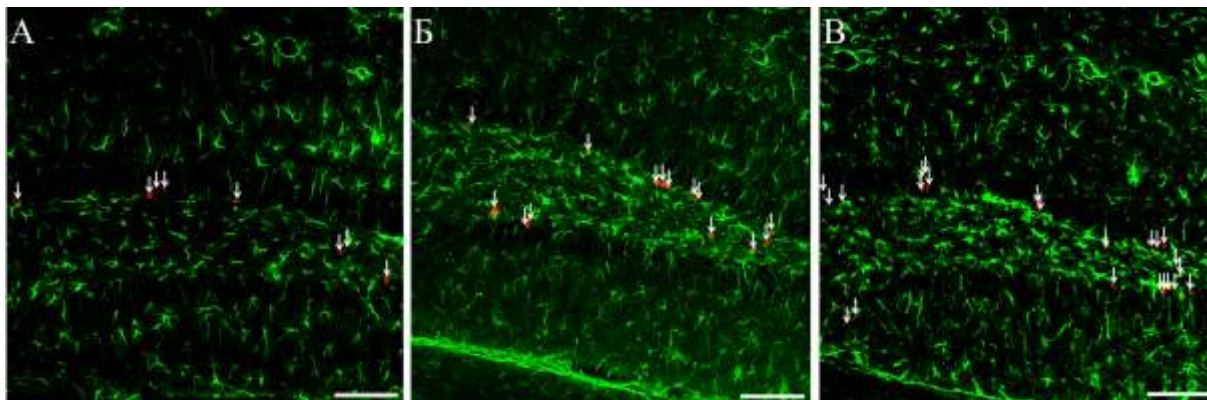
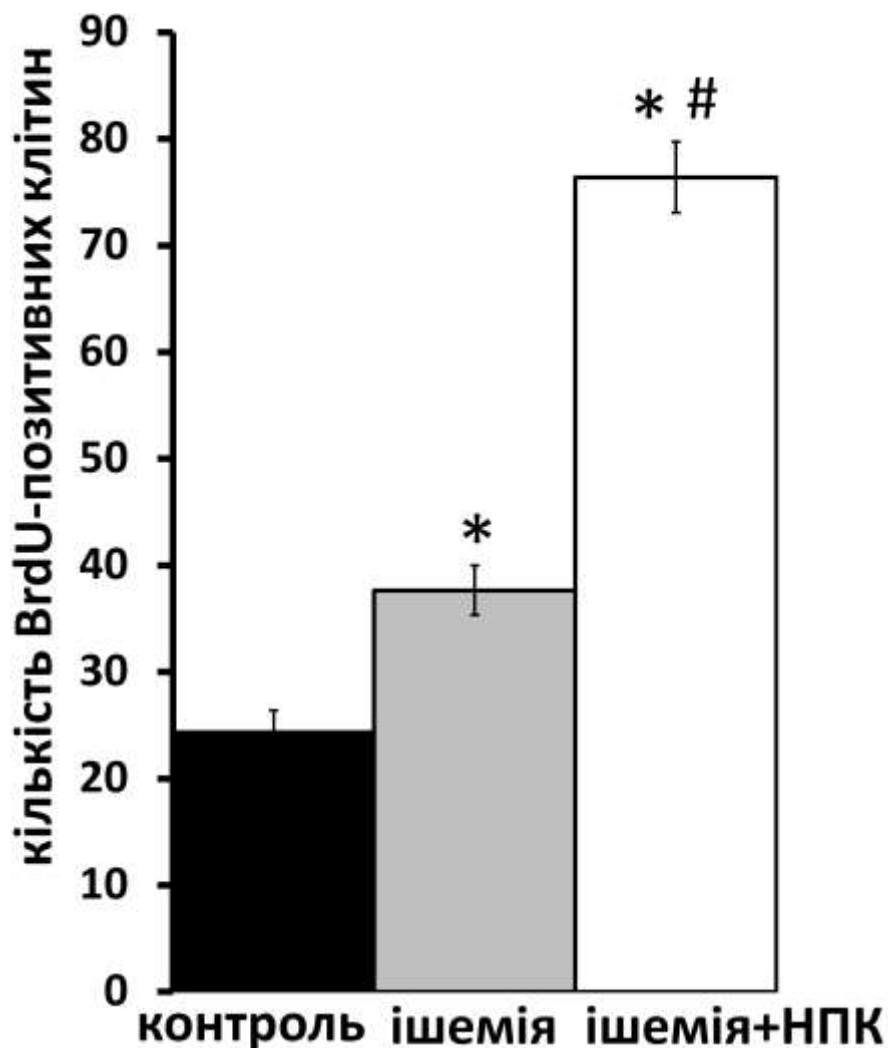


Рис. 4.17. Подвійне імуногістохімічне фарбування на BrdU (червоний колір) та GFAP (зелений колір) зубчастої звивини гіпокампа. А – контроль, Б – ішемія мозку + введення культурального середовища, В – ішемія мозку + трансплантація НПК. BrdU-позитивні клітини (вказані стрілками) розташовувалися у субгранулярній зоні зубчастої звивини. Шкала = 100 мкм.

Після експериментальної ішемії-реперфузії мозку у мишей лінії FVB спостерігалось збільшення кількості BrdU-мічених ядер і їх значення сягало $37,66 \pm 2,33$ (Рис. 4.17Б, 4.18) [355].

Стереотаксична трансплантація нейральних прогеніторних клітин збільшувала кількість BrdU-позитивних клітин у субгранулярній зоні зубчастої звивини вдвічі порівняно із групою ішемізованих тварин і становила $76,4 \pm 3,33$ (Рис. 4.17В, 4.18) [355].



*Рис. 4.18. Кількість BrdU-мічених клітин у зубчастій звивині гіпокампа тварин контрольної групи, ішемічної та групи ішемізованих тварин, яким трансплантували НПК (ішемія+НПК). * – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$), # – статистично достовірна відмінність порівняно з групою ішемізованих тварин ($P < 0,05$).*

BrdU-позитивні клітини у тварин усіх експериментальних груп утворювали проліферативні кластери у субгранулярній зоні (**Рис. 4.19**), що

є характерним для клітин-попередників зубчастої звивини [107].

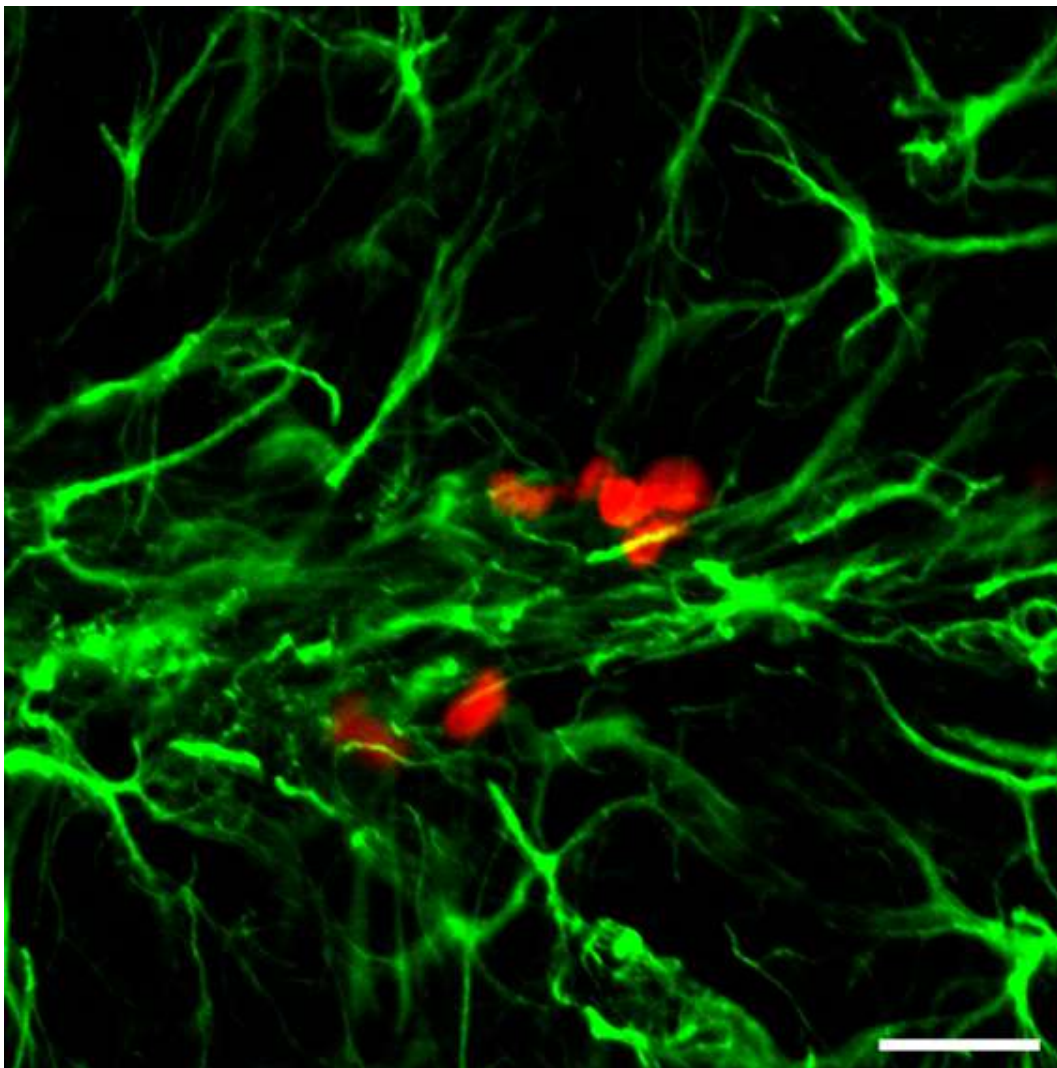


Рис. 4.19. Подвійне імуногістохімічне фарбування на BrdU (червоний колір) та GFAP (зелений колір) зубчастої звивини гіпокампа тварини з ішемією мозку та трансплантацією НПК. BrdU-позитивні клітини утворювали проліферативні кластери у субгранулярній зоні зубчастої звивини. Шкала = 20 мкм.

Для з'ясування фенотипу клітин, які утворювали проліферативні кластери у зубчастій звивині гіпокампа, ми використали імуногістохімічне фарбування на даблкортин (DCX). Цей фосфопротейн, асоційований із

мікротрубочками, експресується в незрілих нейронах і використовується як маркер нейрогенезу [337].

Імуногістохімічний аналіз показав, що DCX-позитивні клітини спостерігалися у субгранулярній зоні (СГЗ) зубчастої звивини. Ці клітини утворювали численні кластери та мали добре розвинені відростки, які були спрямовані в молекулярний шар зубчастої звивини (**Рис. 4.20**) [305].

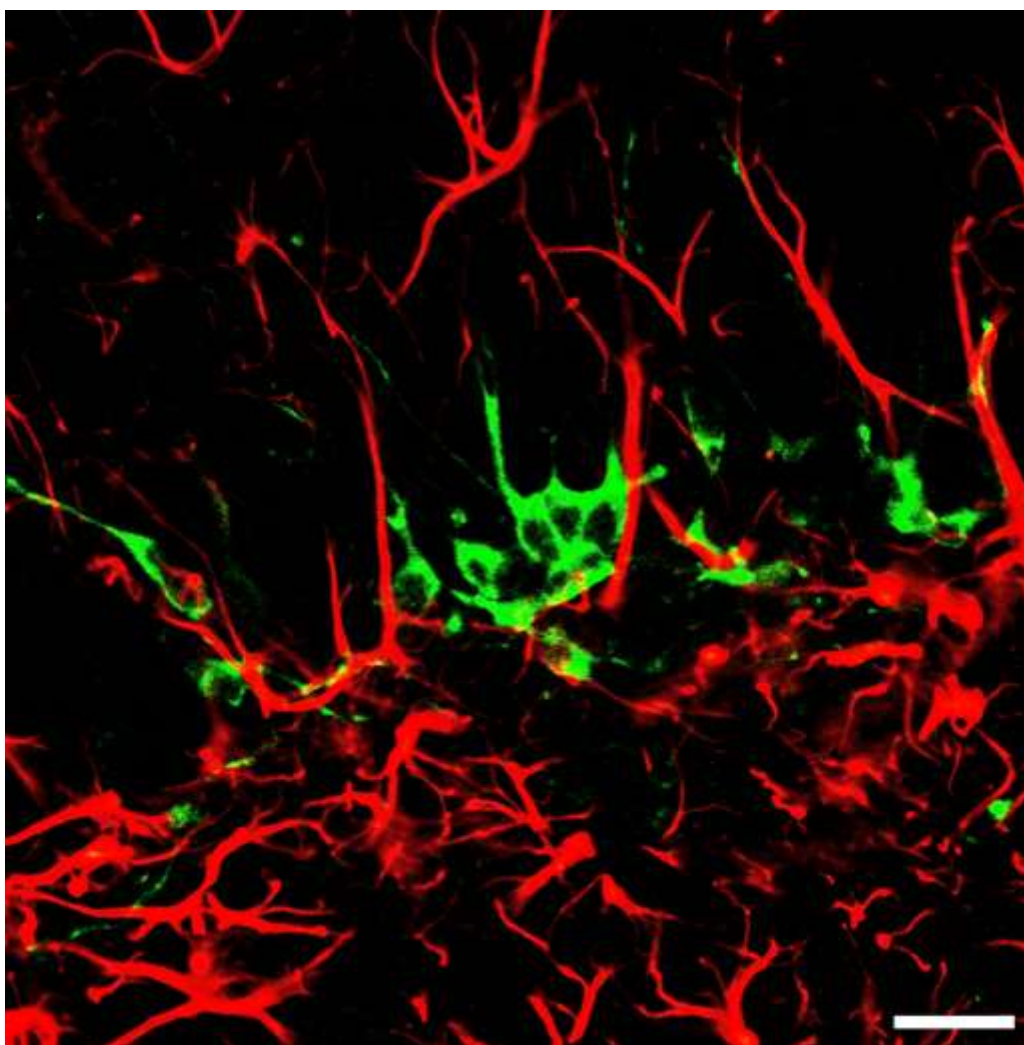


Рис. 4.20. Подвійне імуногістохімічне фарбування на DCX (зелений колір) та GFAP (червоний колір) зубчастої звивини гіпокампа тварини з ішемією мозку та трансплантацією НПК. DCX-позитивні клітини утворювали кластери у субгранулярній зоні зубчастої звивини. Шкала = 20 мкм.

Після ішемії-реперфузії спостерігалось збільшення кількості DCX-позитивних клітин ($227,67 \pm 10,27$) у тварин 2-ої групи (ішемія мозку+введення культурального середовища) порівняно із контрольною групою, в якій кількість DCX-позитивних клітин становила $136,33 \pm 6,36$ (Рис. 4.21А,Б; 4.22) [354].

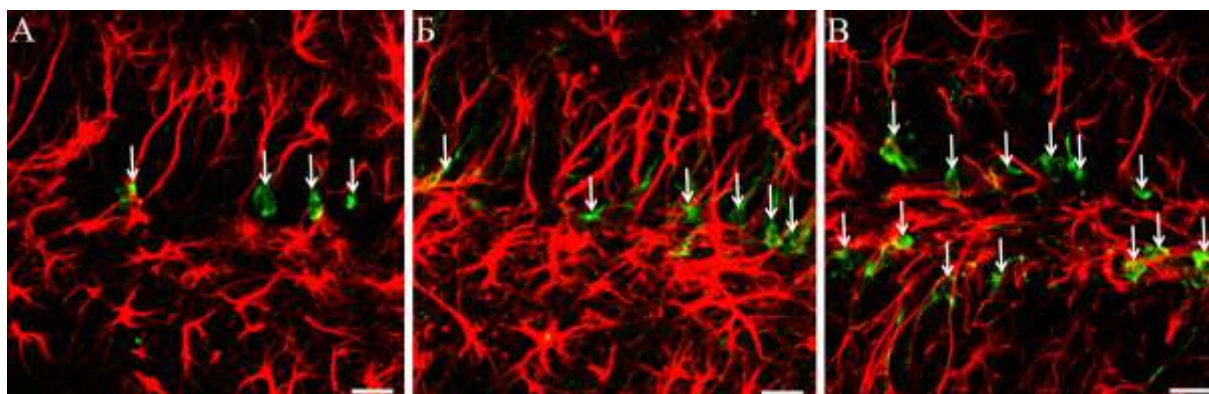


Рис. 4.21. Подвійне імуногістохімічне фарбування на DCX (зелений колір) та GFAP (червоний колір) зубчастій звивині гіпокампа. А – контроль, Б – ішемія мозку + введення культурального середовища, В – ішемія мозку + трансплантація НПК. DCX-позитивні клітини (вказані стрілками) розташовувалися у субгранулярній зоні зубчастій звивини. Шкала = 20 мкм.

У тварин 3-ї групи (ішемія мозку+трансплантація НПК) кількість DCX-позитивних клітин у субгранулярній зоні зубчастій звивини збільшувалась в 1,6 рази порівняно із 2-ю групою тварин і становила $362,6 \pm 18,56$ (Рис. 4.21Б,В; 4.22) [354].

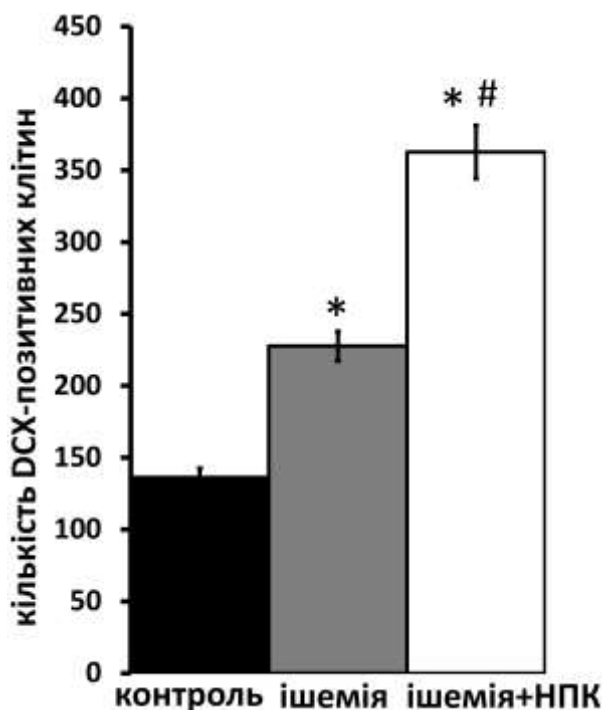


Рис. 4.22. Кількість DCX-мічених клітин у зубчастій звивині гіпокампа тварин контрольної групи, ішемічної та групи ішемізованих тварин, яким трансплантували НПК (ішемія+НПК). * – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$), # – статистично достовірна відмінність порівняно з групою ішемізованих тварин ($P < 0,05$).

Отже, нейральні прогеніторні клітини, стереотаксично трансплантовані в гіпокамп ішемізованих мишей, здатні стимулювати ендогенний нейрогенез у субгранулярній зоні зубчастої звивини і тим самим сприяти відновленню втрачених функцій.

4.5. Інтеграція трансплантованих гіпокампальних НПК у мозок миші після ішемічного ушкодження мозку

Для дослідження можливого диференціювання трансплантованих НПК використовували імуногістохімічні фарбування фронтальних зрізів гіпокампа на нейральні маркери (NeuN, GFAP). На 14-у добу після

стереотаксичної трансплантації GFP+ НПК локалізувалися в СА1 зоні гіпокампа і диференціювалися як в нейрони так і в гліальні клітини. Подвійне імуногістохімічне фарбування на NeuN (маркер зрілих нейронів) та GFP (маркер трансплантованих клітин) показало, що більшість GFP-позитивних клітин ($57,3 \% \pm 5,2 \%$) експресувала NeuN (**Рис. 4.23**) [300].

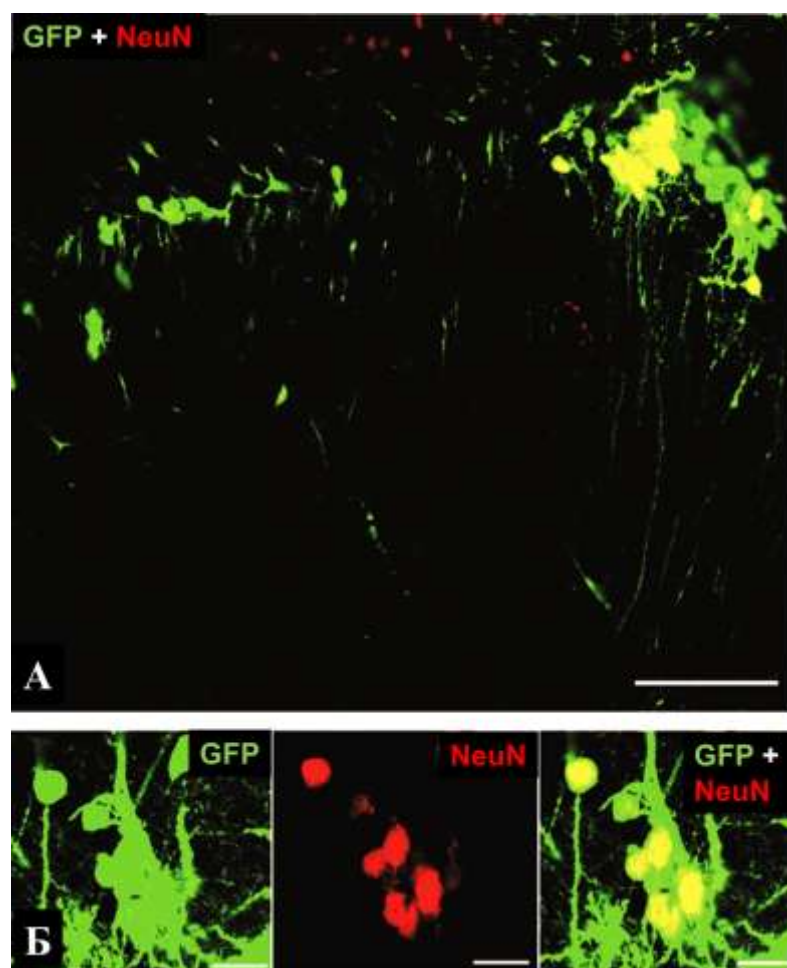


Рис. 4.23. Конфокальне зображення фронтального зрізу СА1 зони гіпокампа на 14-у добу після трансплантації. (А) GFP-позитивні трансплантовані клітини були орієнтовані перпендикулярно пірамідному шару і мали численні розгалужені дендритні відростки у шарі *str.radiatum*. (Б) GFP+ клітини (зелений колір) експресували маркер зрілих нейронів NeuN (червоний колір). Шкала: А = 100 мкм, Б = 20 мкм.

На 90-у добу після трансплантації GFP/NeuN-позитивні клітини

мали морфологічні особливості пірамідних нейронів гіпокампа, були орієнтовані перпендикулярно пірамідному шару та мали численні розгалужені дендритні відростки у *str.radiatum* (Рис. 4.24А). На дендритних відростках спостерігалися численні шипики (Рис. 4.24Б, В) [300]. Наявність дендритних шипиків може вказувати на те, що ці GFP-позитивні нейрони, утворені із трансплантованих НПК, формували синаптичні контакти із нейронами реципієнта.

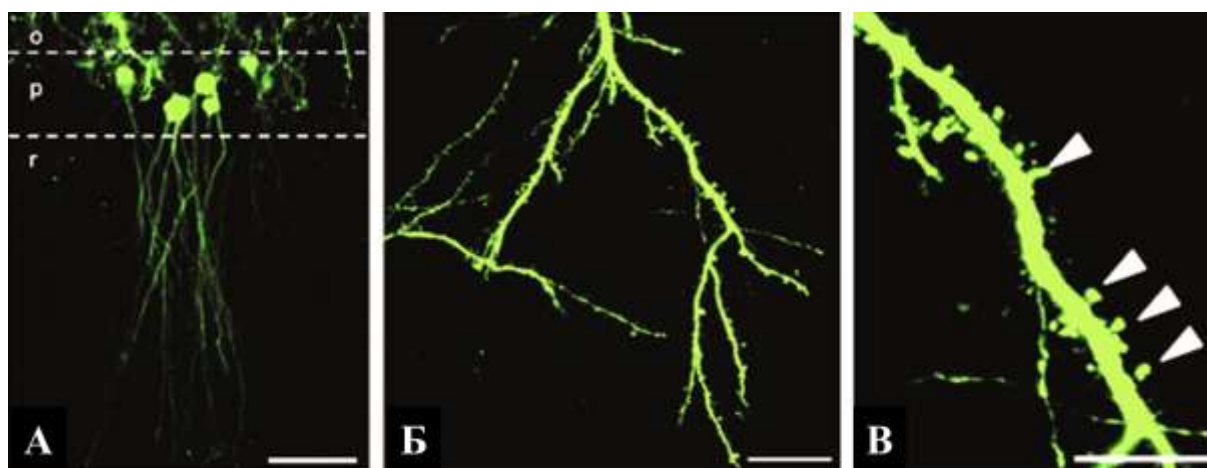


Рис. 4.24. Конфокальне зображення GFP-позитивних трансплантованих клітин в CA1 зоні гіпокампа на 90-у добу після трансплантації. (А) GFP-позитивні клітини мали морфологічні особливості пірамідних нейронів гіпокампа. (Б, В) GFP-позитивні дендрити мали численні шипики (стрілки).

Ми також спостерігали GFP/GFAP-позитивні ($25,3 \pm 6,2\%$, Рис. 4.25) та GFP/Olig-2-позитивні ($1,7 \pm 0,4\%$) клітини, що свідчить про те, що трансплантовані НПК також диференціювалися в астроцити і олігодендроцити відповідно [300].

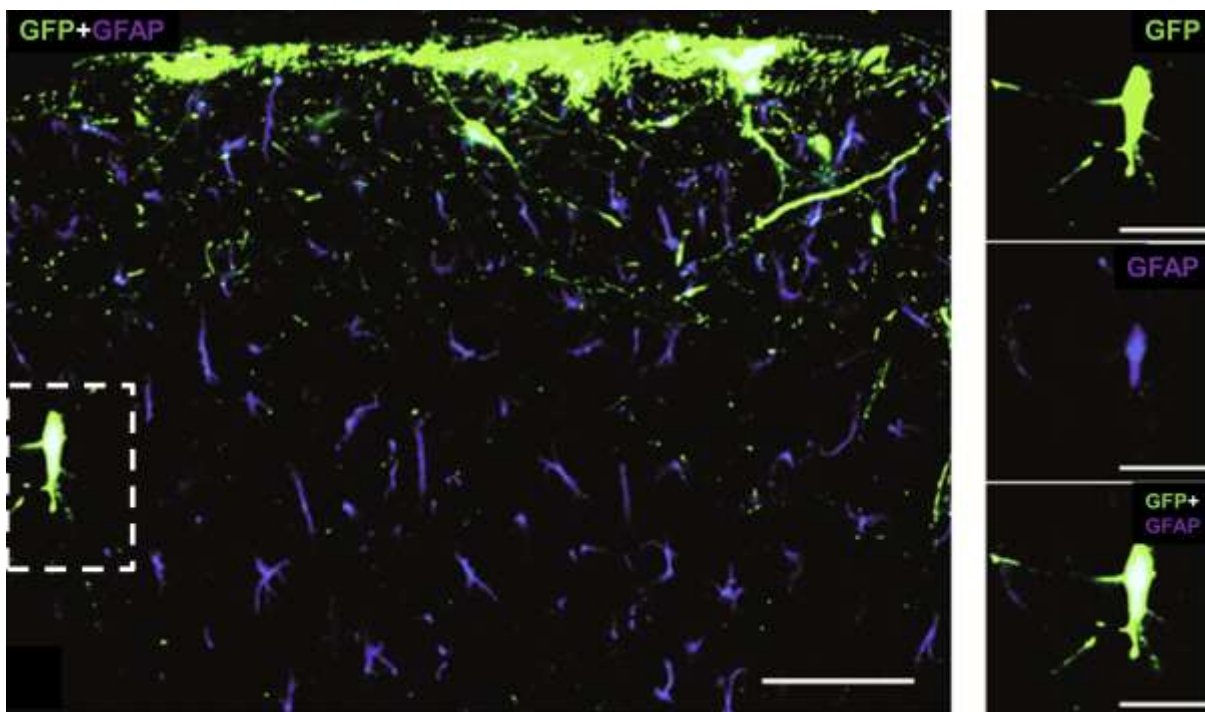


Рис. 4.25. Конфокальне зображення GFP-позитивних трансплантованих клітин в CA1 зоні гіпокампа на 14-у добу після трансплантації. Деякі GFP-позитивні клітини (зелений колір) експресували GFAP (синій колір). Шкала = 50 мкм, праві вставки = 20 мкм.

Імуногістохімічний аналіз не виявив GFP-позитивних клітин, які б експресували Iba-1 – маркер мікрогліальних клітин. Крім того, на 7-му та 14-ту добу після трансплантації ми спостерігали GFP-позитивні клітини, які не експресували жоден із маркерів зрілих нейральних клітин, що може вказувати на їх незрілий (недиференційований) стан.

Ці незрілі GFP-позитивні клітини не були виявлені на 90-ту добу після трансплантації, що може свідчити про те, що вони піддалися диференціюванню або загинули. Жодних ознак аномальної проліферації, пов'язаних із трансплантатами, не виявилось на 90-ту добу після трансплантації. Загалом ці дані імуногістохімічного аналізу показали, що трансплантовані в ішемізований мозок нейральні прогеніторні клітини

диференціювалися у три основні нейральні фенотипи: нейрони, астроцити та олігодендроцити.

Для оцінки можливого формування синаптичних контактів між трансплантованими клітинами і нейронами реципієнта, ми вирішили проаналізувати GFP-позитивні клітини на ультраструктурному рівні на 90-ту добу після трансплантації НПК. GFP/DAB-позитивні клітини легко візуалізувалися за рахунок темної цитоплазми і відростків (**Рис. 4.26**) [300].



Рис. 4.26. GFP/DAB-мічені нейрони в CA1 зоні гіпокампа. Шкала = 20 мкм.

Після вибору потрібної ділянки, ми аналізували GFP/DAB-позитивні клітини за допомогою електронної мікроскопії.

Ультраструктурний аналіз показав, що в цитоплазмі GFP/DAB-позитивних клітин спостерігалася інтенсивно-чорна DAB-реакція, в той час як ядро і мітохондрії були DAB-негативні (**Рис. 4.27**) [300].

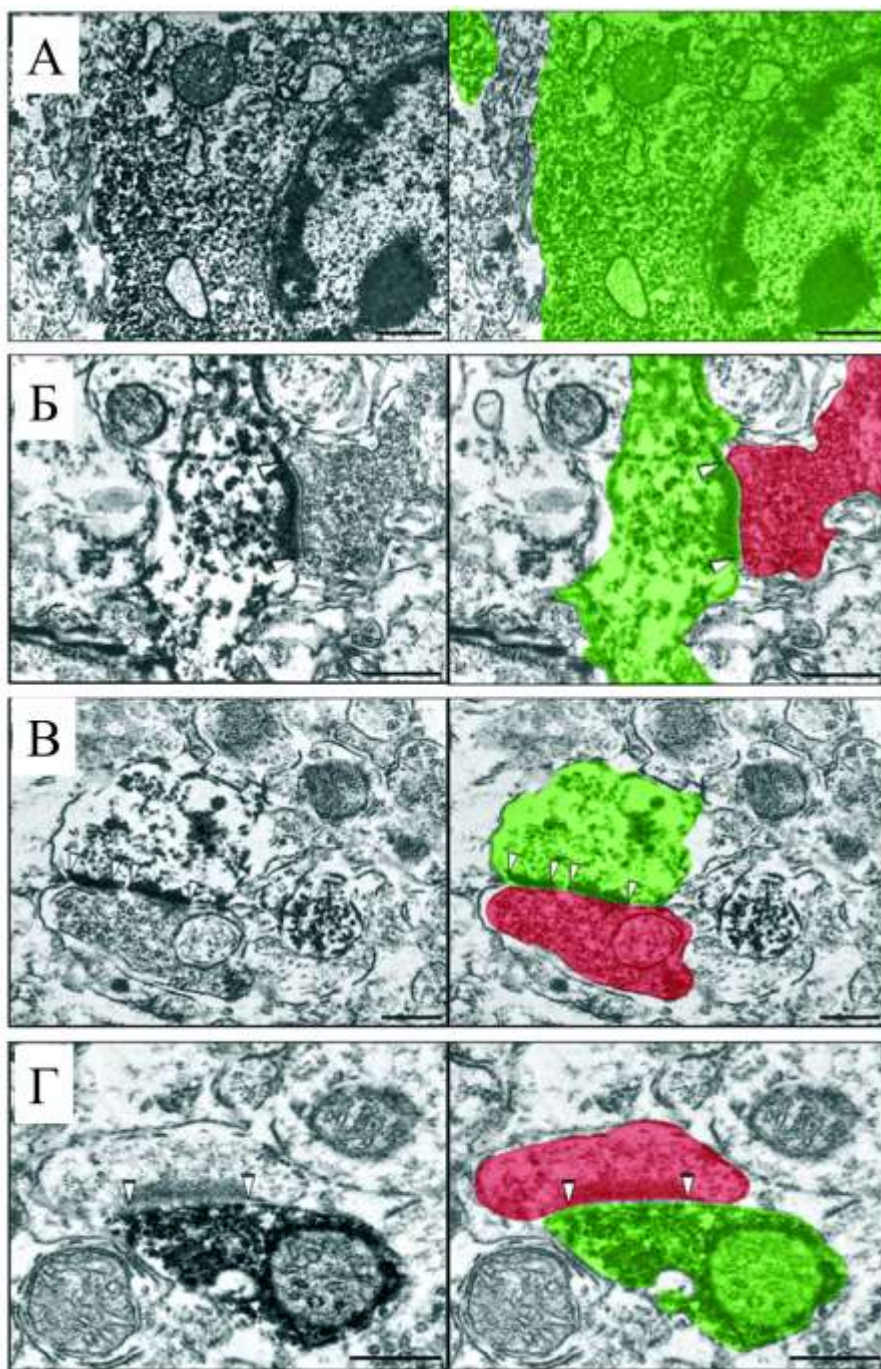


Рис. 4.27. Електронно-мікроскопічні зображення GFP/DAB-позитивних трансплантованих клітин. (А) GFP/DAB-позитивна клітина з

DAB-негативним ядром і мітохондріями. (Б) Простий синапс з безперервною постсинаптичною щільністю (ПСЩ) (вказано стрілками) у GFP/DAB-позитивній постсинаптичній структурі, що контактує з GFP-негативною пресинаптичною терміналлю. (В) Перфорований синапс з чітким перериванням ПСЩ (вказано стрілками). (Г) GFP+ пресинаптична терміналь контактує з GFP-негативною постсинаптичною структурою з безперервною ПСЩ (вказано стрілками). Зелений колір - GFP-позитивна терміналь, червоний колір - клітина-реципієнт. Шкала: А = 1 мкм, В-Г = 0,4 мкм.

Далі, ми досліджували GFP/DAB-позитивні синаптичні контакти. Синапси визначали за наявністю таких структур: синаптичні везикули в пресинаптичному бутоні, синаптична щілина і постсинаптична щільність (ПСЩ) (**Рис. 4.28**) [300].

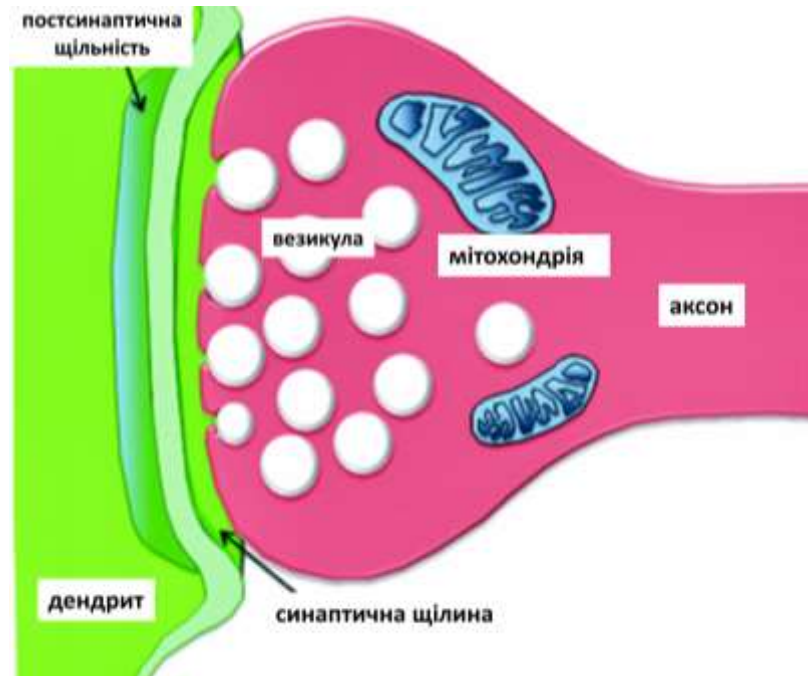


Рис. 4.28. Схематичне зображення синаптичного контакту між GFP-позитивною клітиною (зелена) і пресинаптичною терміналлю реципієнта (червона).

Електронно-мікроскопічне дослідження показало, що GFP/DAB-позитивні постсинаптичні структури контактували з GFP-негативними пресинаптичним бутонами, що містили везикули (**Рис. 4.27Б, В**). Ми спостерігали різні типи синаптичних контактів: простий синапс, що має безперервну ПСЦ (**Рис. 4.27Б**), і перфорований синапс з перервною ПСЦ (**Рис. 4.27В**). Цікаво, що ми спостерігали не лише постсинаптичну локалізацію GFP-позитивних дендритів, а й також виявляли пресинаптичний GFP-позитивний синаптичний контакт (**Рис. 4.27Г**).

Таким чином, ультраструктурний аналіз показав, що трансплантовані нейральні прогеніторні клітини здатні диференціюватися в зрілі нейрони та інтегруватися в нейрональну мережу гіпокампа реципієнта після ішемічного ушкодження мозку.

4.6. Вплив трансплантації НПК на когнітивні функції мишей після церебральної ішемії-реперфузії

Вплив ішемічного ушкодження головного мозку на когнітивні функції і можливий нейропротекторний ефект трансплантації нейральних стовбурових клітин у нашій роботі були оцінені за допомогою поведінкового тесту – водний лабіринт Морріса (ВЛМ).

Тварин з кожної експериментальної групи тестували протягом 5 днів, починаючи з 12-ї доби після операції. Час, витрачений на пошук платформи протягом перших 4-х діб тестування знизився у тварин усіх експериментальних груп. Незважаючи на зменшення часу, витраченого на пошук платформи, у всіх групах, цей параметр у групі тварин з ішемією був значно більший, ніж у несправжньо-оперованих мишей (контроль) та у групі тварин з ішемією плюс трансплантація НПК.

У тварин контрольної групи, час пошуку платформи становив $35,3 \pm 3,4$ с на 12-у добу, а потім зменшувався до $20,3 \pm 2,1$ с на 15-ту добу (**Рис. 4.29.**) [300].

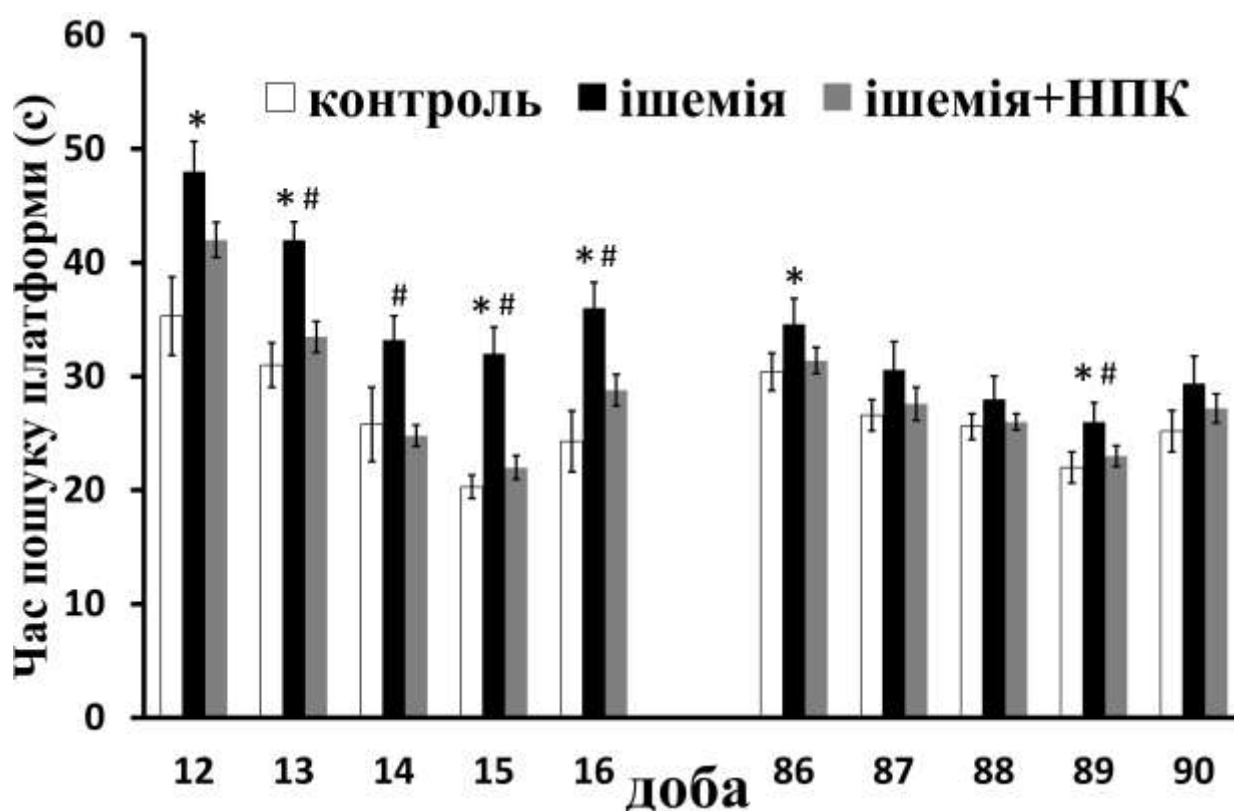


Рис. 4.29. Час пошуку платформи у водному лабіринті Морріса. Графік демонструє середній час пошуку платформи тваринами у контрольній групі, ішемічній та групі ішемізованих тварин, яким трансплантували НПК (ішемія+НПК). * – $P < 0.05$ порівняно з контрольною групою, # – $P < 0.05$ порівняно з групою тварин з ішемією плюс трансплантація НПК.

У порівнянні з контрольними, ішемізовані тварини мали більш високі показники, що свідчило про дефіцит просторової пам'яті і здатності до навчання. Час пошуку платформи у цій групі тварин також зменшувався з 12-ої доби до 15-ої доби і становив $48 \pm 2,7$ с і $32 \pm 2,3$ с, відповідно (**Рис. 4.29**).

У групі тварин з трансплантацією НПК після ішемічного ушкодження мозку спостерігався більш швидкий регрес когнітивних

порушень, зокрема зниження дефіциту просторової пам'яті й здатності до навчання. Час пошуку у цій групі зменшувався з 12-ї доби до 15-ї доби і становив $42 \pm 1,5$ с і $22 \pm 1,0$ с, відповідно (**Рис. 4.29**) [300].

На 16-ту добу, коли платформа була занурена під поверхню води, час пошуку платформи збільшився у всіх групах тварин і становив $24,3 \pm 2,7$, $36 \pm 2,3$ і $28,8 \pm 1,4$ с у контрольних, ішемізованих та групі з ішемією плюс трансплантація НПК, відповідно.

З 86-ї по 89-ту добу час пошуку платформи знижувався у всіх експериментальних групах тварин, а на 90-ту добу, коли платформа була занурена, час збільшувався у всіх групах і становив $25,2 \pm 1,8$, $29,4 \pm 2,4$ і $27,2 \pm 1,3$ у контрольних, ішемізованих та групі з ішемією плюс трансплантація НПК, відповідно. У цей проміжок часу не спостерігалось статистично достовірних відмінностей в усіх експериментальних групах, за винятком 86-та і 89-та доби [300].

Не існувало жодних статистично достовірних відмінностей між контрольними тваринами і групою «ішемія плюс трансплантація НПК» у всі часові інтервали.

Таким чином, виходячи з отриманих даних можна зробити висновок, що двостороння оклюзія загальних сонних артерій може викликати порушення когнітивних функцій (просторової пам'яті). Стереотаксична трансплантація нейральних прогеніторних клітин сприяє відновленню просторової пам'яті у тварин після ішемічного ушкодження мозку.

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ММСК НА СТАН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ І ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ МИШЕЙ ПІСЛЯ ПВЛ

Як зазначалося вище, трансплантація НПК позитивно впливає на стан нервової тканини та поведінкові реакції тварин після ішемічного ушкодження мозку. У попередніх експериментах для моделювання ішемічного інсульту ми використовували дорослих тварин. Але проблема ішемічного ушкодження головного мозку актуальна не лише для дорослого населення. Однією з найбільш актуальних медико-соціальних проблем сучасної неврології та педіатрії є перинатальна патологія ЦНС, яка становить 49,8 % всіх неврологічних захворювань у дітей [97]. Зараз активно вивчаються можливості застосування клітинної терапії з використанням стовбурових клітин різного генезу у лікуванні і реабілітації пацієнтів з перинатальною патологією ЦНС [23].

Тому в наступній серії експериментів ми досліджували вплив трансплантації стовбурових клітин на стан нервової тканини і поведінкові реакції експериментальних тварин при перинатальній патології ЦНС.

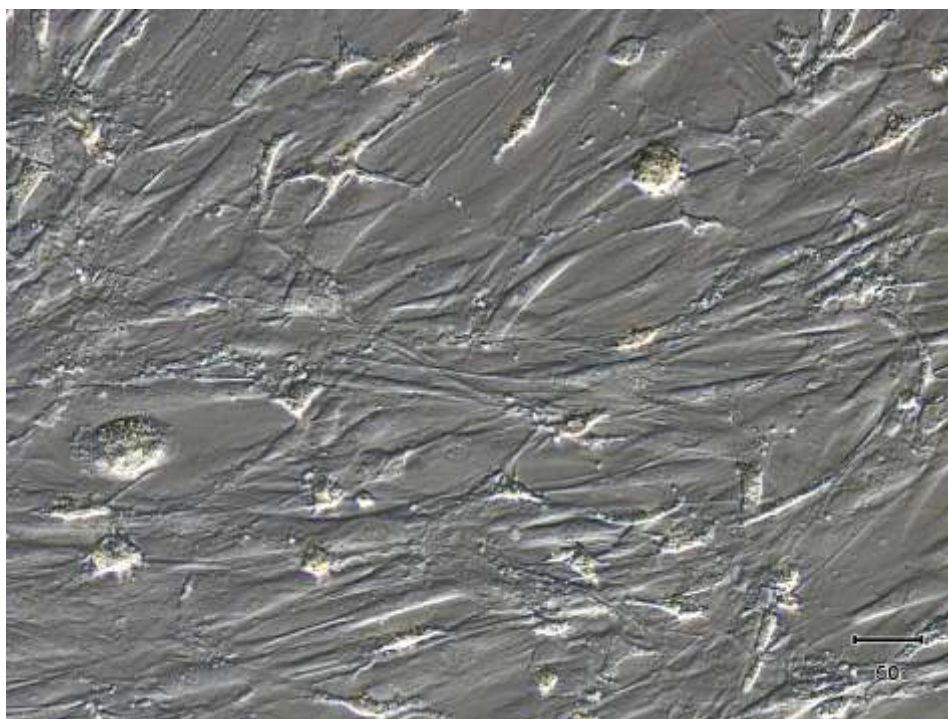
5.1. Характеристика мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) *in vitro*

Перспективним клітинним агентом у регенеративній медицині є мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК). Показано, що ММСК мають тропність до зони пошкодження, можуть пригнічувати надмірні запальні процеси та підтримувати гомеостаз імунної системи завдяки фізичній та/або хімічній взаємодії з клітинами імунної системи [6]. Вони забезпечують толерантність імунної системи реципієнта до алогенних клітин, власне для самих себе. При цьому використання аутологічних

ММСК дозволило б вирішити питання імунологічної сумісності трансплантованого матеріалу і тестування його на інфекції, а також уникнути етичних та юридичних проблем з приводу фетального донорського матеріалу [50]. Тому в наших подальших експериментах із моделюванням перинатальної патології ЦНС ми використовували ММСК.

Адгезивну культуру ММСК отримували з жирової клітковини мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J.

На 2-му пасажі переважали фібробластоподібні клітини з високою адгезивністю, діаметром до 80 мкм, що містили значну кількість вакуолей і гранул (**Рис. 5.1**) [309].



***Рис. 5.1.** Мікрофото культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) з жирової клітковини мишей, 2-й пасаж.*

При фенотипуванні культури ММСК жирової клітковини методом проточної цитометрії виявлено високий рівень експресії маркерів CD44, CD73, CD90, при цьому відносний вміст клітин з експресією гемопоетичних маркерів CD45 та CD117 становив менше 2 % (**Рис. 5.2**)

[309]. Експресія маркера CD34 на ранніх пасажах коливалась в межах 8–12 %, що є типовим для ММСК жирової клітковини і може бути ознакою більш високого потенціалу диференціювання клітин в ендотеліальному напрямку.

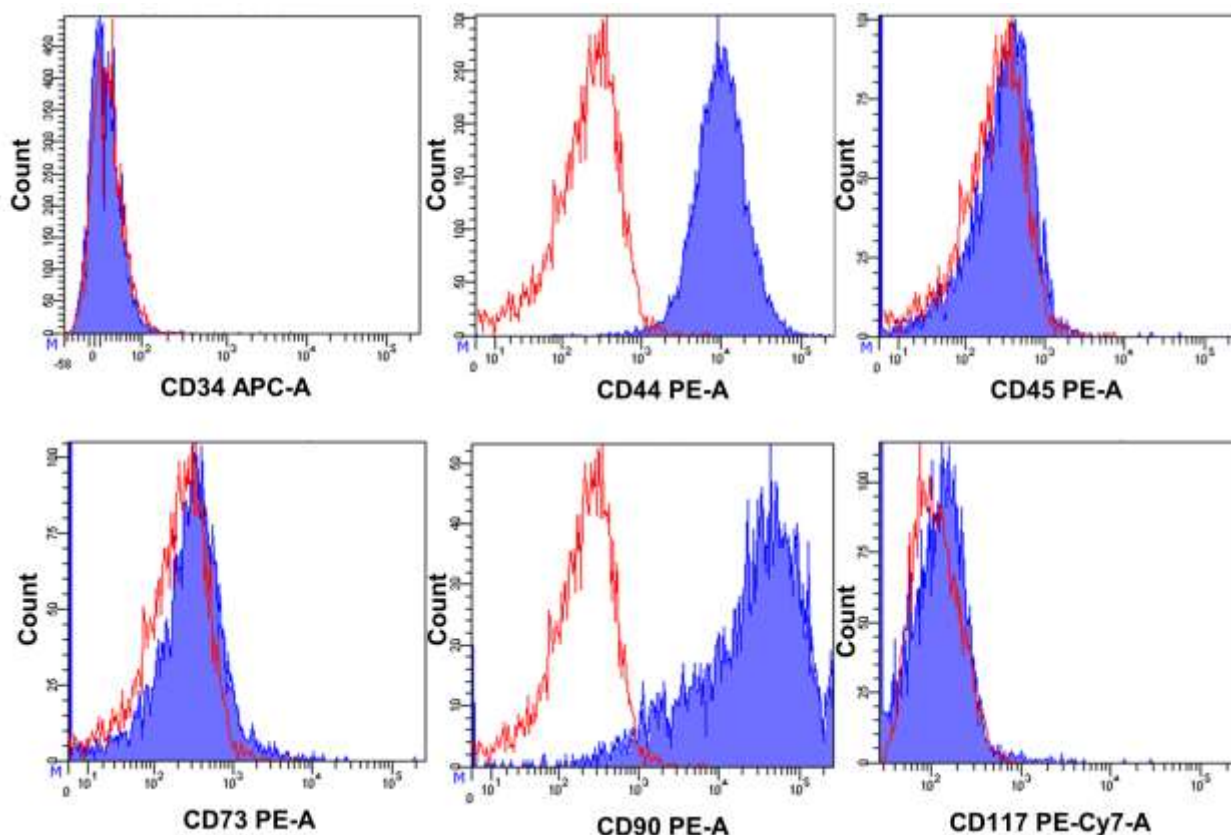


Рис. 5.2. Експресія маркерів CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117 в культурі ММСК жирової клітковини, пасаж 2.

Для того, щоб стандартизувати дослідження з використанням стовбурових клітин, Міжнародне товариство клітинної терапії (ISCT) запропонувало мінімальні критерії для ідентифікації ММСК [75]. По-перше, ММСК повинні бути адгезивними до пластику при стандартних умовах культивування; по-друге, ММСК повинні експресувати CD105, CD73, CD90 та не експресувати CD45, CD34, CD14 або CD11b, CD79 α або

CD19 та HLA-DR; по-третє, мати здатність диференціюватися в остеогенному, адипогенному та хондрогенному напрямках в умовах *in vitro* [75]. Ми показали, що отримана нами культура ММСК відповідала першим двом критеріям Міжнародного товариства клітинної терапії. Далі ми перевіряли третій критерій – здатність отриманої культури ММСК до направлено диференціювання в остеогенному напрямку.

У постнатальному онтогенезі основним джерелом ММСК є строма кісткового мозку. Тому для відпрацювання методики остеогенного диференціювання та методу виявлення відкладень солей кальцію в позаклітинному матриксі, використовували культуру ММСК, отриману з кісткового мозку мишей [349].

Фарбування препаратів на солі кальцію барвником Alizarine Red S не виявило специфічної реакції у культурах недиференційованих ММСК, тоді як культури ММСК, диференційовані в остеогенному напрямку, на 21-ту добу культивування інтенсивно зафарбовувалися в червоний колір, що свідчило про відкладення солей кальцію в позаклітинному матриксі (**Рис. 5.3**) [349].

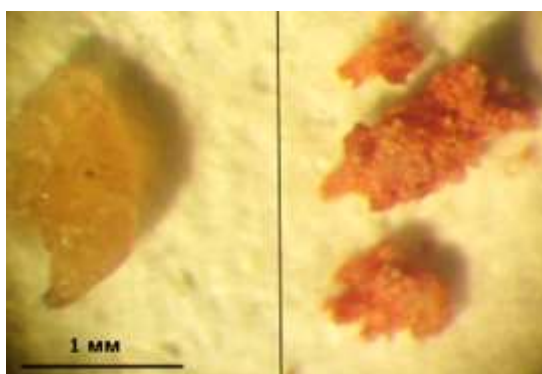


Рис. 5.3. Мікрофотографія препаратів культури мікромаси ММСК, 21 доба культивування. Зліва – культура недиференційованих ММСК, справа – культура ММСК, диференційована в остеогенному напрямку (позитивне фарбування на солі кальцію – червоний колір). Цитохімічне фарбування Alizarine Red S на солі кальцію. Шкала = 1 мм.

Таким чином, була відпрацьована методика остеогенного диференціювання ММСК та метод фарбування для виявлення відкладень солей кальцію в позаклітинному матриксі з використанням барвника Alizarine Red S. Цю методику ми використали для аналізу адгезивної культури ММСК, яку отримували з жирової клітковини мишей.

На 10-ту добу після додавання факторів остеогенного диференціювання у культуру ММСК, отриману з жирової клітковини мишей, відмічено відкладання солей кальцію в екстрацелюлярному матриксі та продукцію лужної фосфатази окремими групами клітин (**Рис. 5.4**) [309].

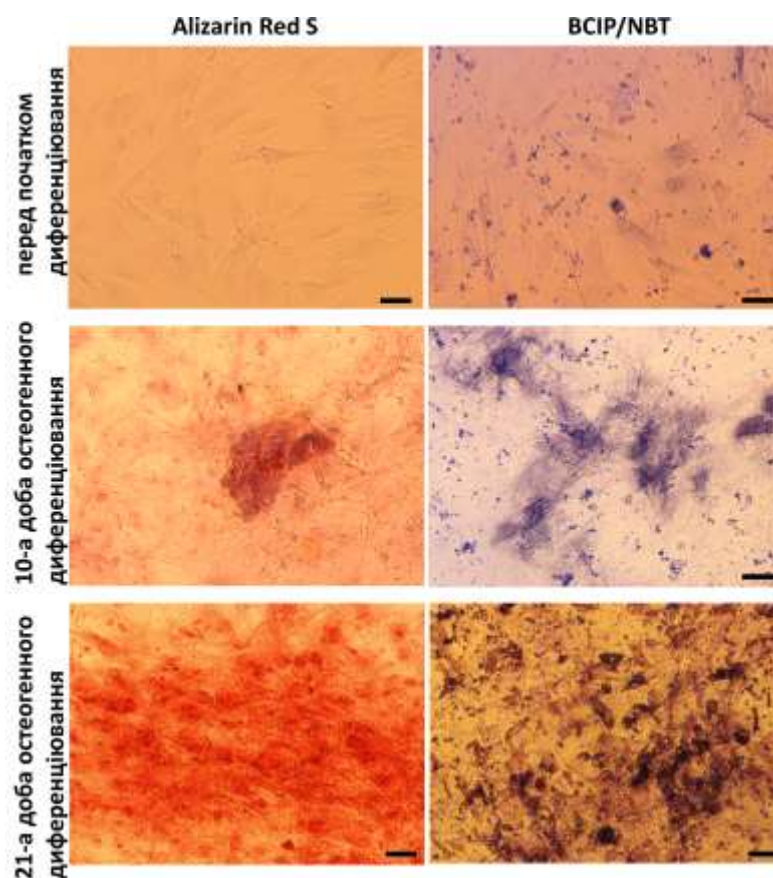


Рис. 5.4. Мікрофотографії препаратів культур ММСК жирової клітковини мишей, диференційованих в остеогенному напрямку. Цитохімічне фарбування Alizarine Red S на солі кальцію (червоний колір) та BCIP/NBT на лужну фосфатазу (чорний колір). Шкали = 50 мкм.

На 21-у добу особливо виражене відкладання солей кальцію спостерігали навколо кластерів клітин і практично усі клітини в культурі експресували лужну фосфатазу (**Рис. 5.4**).

Ультраструктурний аналіз є важливим інструментом для морфологічних, фізіологічних і біохімічних досліджень ММСК. Ультраструктурний аналіз показав, що ММСК мали еухроматичне ядро, нерівну поверхню мембрани через численні цитоплазматичні виступи (**Рис. 5.5А**) [309].

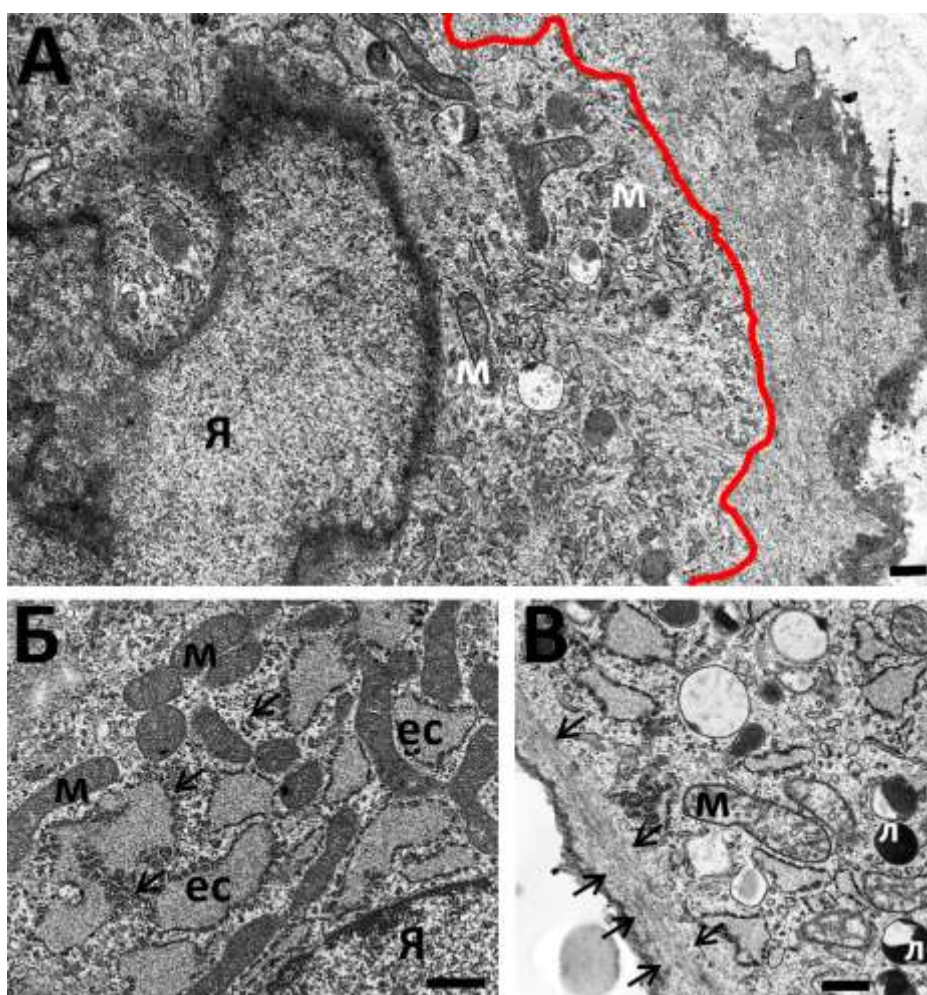


Рис. 5.5. Електронограма ММСК жирової клітковини у культурі, пасаж 2. (А) Клітина з еухроматиновим ядром і нерівною поверхнею

цитоплазматичної мембрани. Чітко візуалізуються дві цитоплазматичні ділянки (позначено червоною лінією): внутрішня – багата на органели, тоді як периферійна частина майже їх немає. (Б) Цитоплазма має велику кількість вільних рибосом і полірибосом (стрілки). (В) Проміжні філаменти (стрілки) розташовані на периферії цитоплазми. Я - ядро, ес – гранулярна ендоплазматична сітка, м - мітохондрії, л - лізосоми. Шкала = 0.5 мкм.

На ультраструктурному рівні в ММСК чітко візуалізувалися дві цитоплазматичні ділянки: внутрішня була багата на органели (численні округлі і подовжені електронно-щільні мітохондрії, гранулярний ендоплазматичний ретикулум), тоді як периферійна – майже не містила органел (**Рис. 5.5А**) [309].

Цікаво, що гранулярний ендоплазматичний ретикулум часто був розширений і містив матеріал низької електронної щільності (**Рис. 5.5Б**).

Цитоплазма виглядала гранульованою через велику кількість вільних рибосом і полірибосом (**Рис. 5.5Б**).

Крім того, електронно-мікроскопічний аналіз показав наявність значної кількості проміжних філаментів на периферії цитоплазми ММСК (**Рис. 5.5В**) [309].

Цитоплазма була надзвичайно багатою на ендосомальні елементи, як мали типові мультиламелярні та мультивезикулярні структури (**Рис. 5.6А**). Також були виявлені ліпідні краплі в цитоплазмі ММСК.

Багато тонких цитоплазматичних відростків відходило від поверхні мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (**Рис. 5.6Б**) [309].

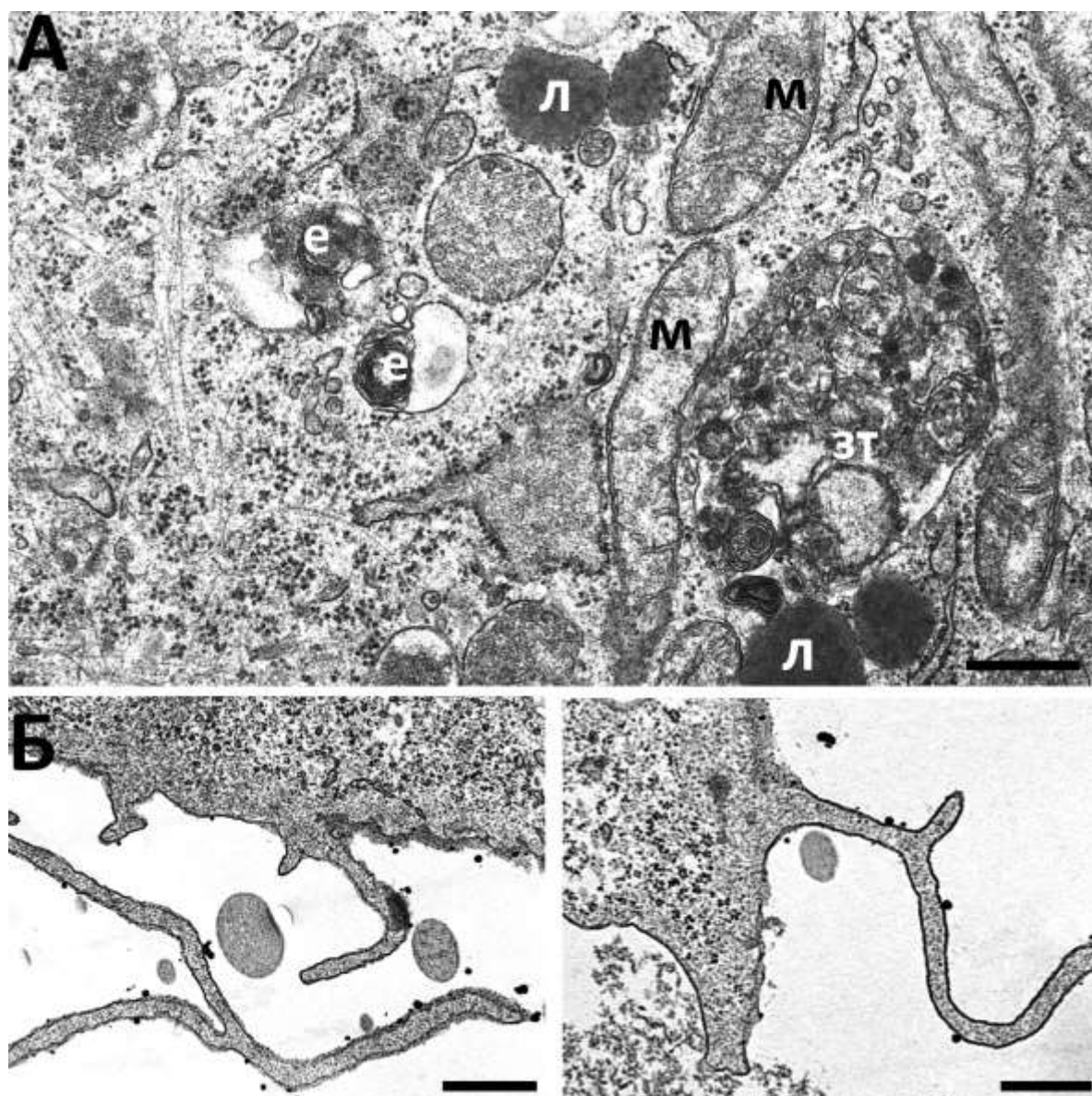


Рис. 5.6. Електронограма ММСК жирової клітковини у культурі, пасаж 2. (А) Цитоплазма клітин містить велику кількість ендосомальних/везикулярних елементів і лізосом. (Б) ММСК жирової клітковини має множинні тонкі цитоплазматичні відростки. М - мітохондрії, л - лізосоми, е - ендосоми/везикулярні елементи, зт - залишкові тільця. Шкала = 0,5 мкм.

Електронно-мікроскопічний аналіз показав, що недиференційовані ММСК мали гранулярний ендоплазматичний

ретикулум з розширеними цистернами, подовжені мітохондрії, ендосомальні елементи і ліпідні гранули, що може свідчити про високу метаболічну активність клітин.

5.2. Вплив трансплантації ММСК на поведінкові реакції мишей при моделюванні ПВЛ

Для дослідження впливу трансплантації ММСК на поведінкові реакції мишей використовували модель перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo*. Після моделювання ПВЛ прооперовані тварини відставали у розвитку у порівнянні із контрольними неоперованими мишами. Тварини з моделлю ПВЛ мали меншу вагу і зріст (**Рис. 5.7**) та розлади статокінетичного рефлексу, що забезпечує збереження рівноваги тіла при активному чи пасивному зміщенні його в просторі [302].



Рис. 5.7. Миші на 3 добу після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ). Зліва – миша з ПВЛ, справа – контрольна тварина.

Поведінковий тест «діставання і виймання їжі» показав, що у порівнянні з контрольними, тварини з ПВЛ мали більш низькі показники успішних спроб. Успіх у контрольних тварин становив $58 \pm 3 \%$, а у тварин з ПВЛ – $23 \pm 4 \%$ (Рис. 5.8) [302].

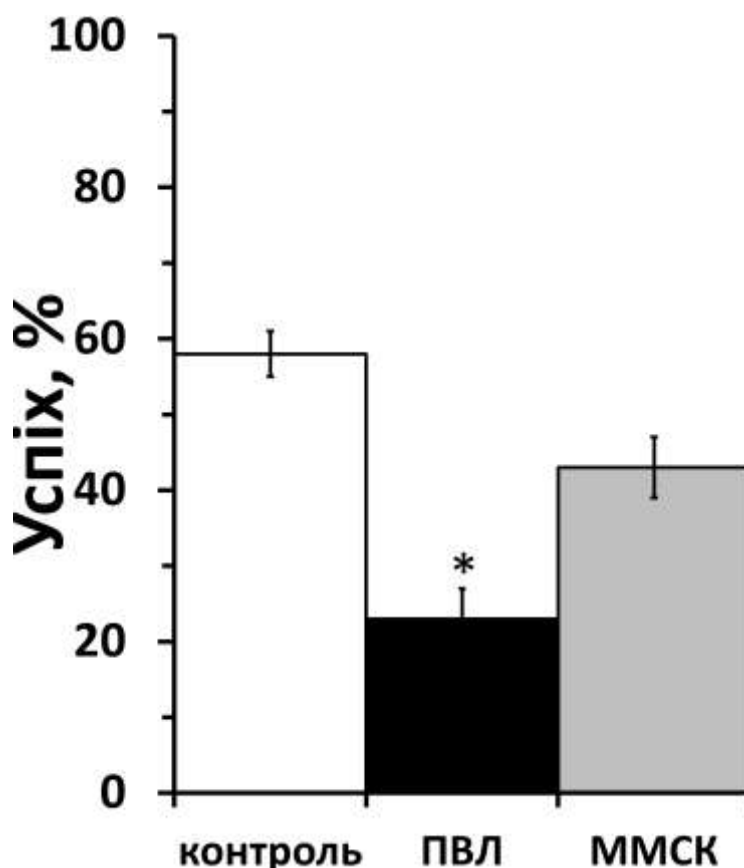


Рис. 5.8. Оцінка кортикоспинальної функції за допомогою поведінкового тесту «діставання і виймання їжі». ПВЛ – перивентрикулярна лейкомаляція, ММСК – мультипотентні мезенхімальні стовбурові клітини. * – $P < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

У групі тварин з трансплантацією ММСК після моделювання ПВЛ спостерігалася відновлення кортикоспинальної функції і кількість успішних спроб становила $43 \pm 4 \%$ (Рис. 5.8) [302].

Отже, сингенна стереотаксична трансплантація ММСК жирової клітковини сприяла відновленню поведінкових реакцій у мишей із змодельованою перивентрикулярною лейкомаляцією.

5.3. Вплив трансплантації ММСК на стан нервової тканини мишей при моделюванні ПВЛ *in vivo*

Імуногістохімічний аналіз показав, що на 30-ту добу після трансплантації GFP-позитивні ММСК були локалізовані над мозолистим тілом в безпосередній близькості від місця ін'єкції (**Рис. 5.9**) [302].

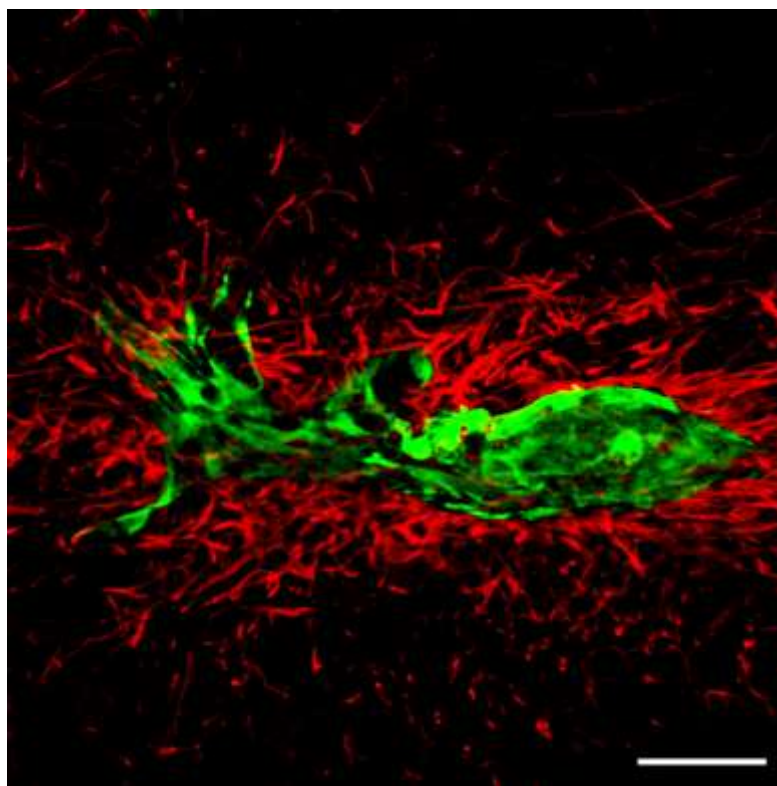


Рис. 5.9. Конфокальна мікрофотографія фронтального зрізу головного мозку миші на 30 добу після трансплантації GFP-позитивних ММСК. Трансплантовані ММСК були локалізовані біля зони ін'єкції. Зелений колір - GFP-позитивні ММСК, червоний - GFAP-позитивні астроцити. Шкала = 50 мкм.

Для оцінки ступеня ушкодження, спричиненого ПВЛ, використовували імуногістохімічне фарбування зрізів мозку на основний білок мієліну (МВР) і шкалу від 0 до 5 [269].

Імуногістохімічний аналіз показав, що у контрольних тварин мозолисте тіло інтенсивно зафарбовувалося антитілами до основного білка мієліну і за шкалою оцінки відповідало 0 (**Рис. 5.10А**).

Після перивентрикулярної лейкомаляції інтенсивність фарбування на МВР зменшувалася і відповідала за шкалою оцінки пошкодження від 3 до 4 (**Рис. 5.10Б**), а після трансплантації ММСК – від 1 до 2 (**Рис. 5.10В**) [302].

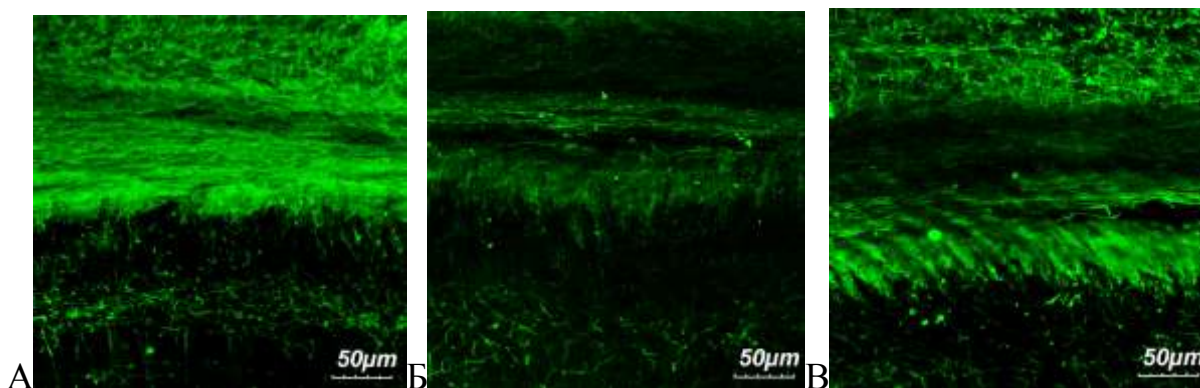


Рис. 5.10. Конфокальні мікрофотографії фронтальних зрізів головного мозку миші, пофарбованого на основний білок мієліну (МВР). А - контрольна тварина, Б - тварина з ПВЛ, В - тварина з ПВЛ та трансплантацією ММСК (30 доба після трансплантації).

Трансплантація ММСК також гальмувала розвиток як мікро- так і астрогліозу (**Рис. 5.11**) [302].

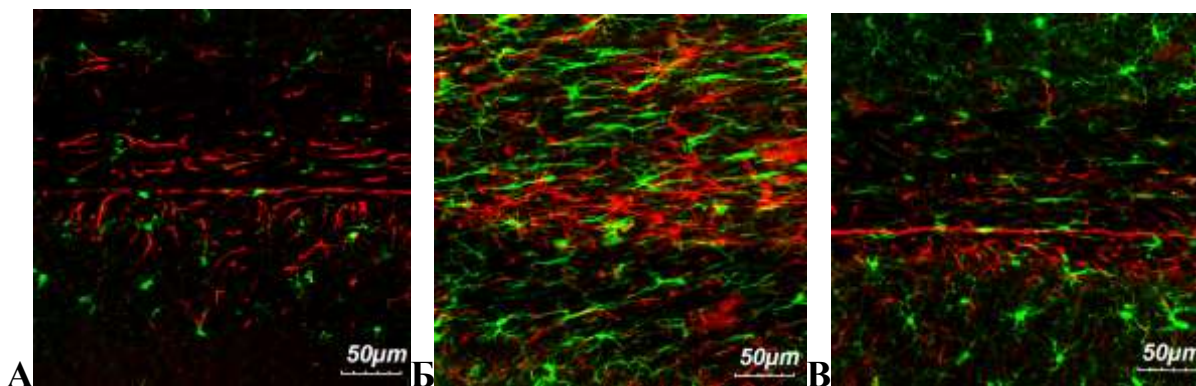


Рис. 5.11. Конфокальні мікрофотографії фронтальних зрізів головного мозку миші, пофарбованих на маркер мікроглії - Iba-1 (зелений колір) та маркер астроцитів - GFAP (червоний колір). А - контрольна тварина, Б - тварина з ПВЛ, В - тварина з ПВЛ та трансплантацією ММСК (30 доба після трансплантації).

Таким чином, моделювання перивентрикулярної лейкомаляції може викликати порушення кортикоспинальної функції, що є результатом ушкодження мієлінової оболонки нервових волокон (деградації основного білка мієліну) і активації астро- і мікроглії. Сингенна стереотаксична трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин сприяє відновленню кортикоспинальної функції у тварин після ПВЛ, зменшує деградацію МВР і гальмує розвиток гліозу.

5.4. Моделювання ПВЛ *in vitro* на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші

Для оцінки терапевтичного ефекту фармакологічних засобів та регенеративного потенціалу різних типів стовбурових клітин при захворюваннях ЦНС актуальним залишається вибір адекватних моделей пошкодження нервової тканини *in vitro* та *in vivo*.

У попередній серії експериментів на моделі ПВЛ *in vivo* було показано, що найбільш чутливими клітинами, які пошкоджуються при ПВЛ, є олігодендроцити. Тому в більшості випадків, як *in vitro* модель ПВЛ, використовується культура олігодендроцитів або попередників олігодендроцитів із додаванням ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС) – індуктора нейрозапалення – у культуральне середовище [172]. Але недоліками такої культури є те, що клітини більше не є складовою частиною первинної нейрональної мережі, змінюється їх морфологія, метаболізм та реакції на ті чи інші впливи [263].

Найбільш прийнятними для моделювання патологічних процесів *in vitro* та розробки стратегій їх корекції є органотипові культури.

Органотипова культура зрізів головного мозку дедалі частіше стає альтернативою експериментам *in vivo*. В органотиповій культурі головного мозку зберігаються цитоархітектоніка, типи клітин та шарів, первинні міжклітинні зв'язки, синаптична організація, розташування рецепторів тощо [191]. До переваг такої культури також належить можливість локальної електричної чи хімічної стимуляції певних частин нейронів (тіла, аксону, дендритів); тонкої хірургічної маніпуляції зі зрізом (ізоляція окремих частин, розсічення аферентних шляхів, виділення відростків від тіл клітин).

Крім того, в органотиповій культурі присутній прямий доступ до позаклітинного простору, що дозволяє, з одного боку, легко контролювати умови життєдіяльності тканини, а з іншого – надає можливість прямого впливу на тканину різноманітними речовинами потрібної концентрації [126].

Тому метою подальших експериментів була розробка моделі перивентрикулярної лейкомаляції на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

Для отримання органотипової культури зрізів головного мозку

використовували мишей лінії FVB 7-денного віку. Після виділення головного мозку, розділяли його на дві частини по серединній лінії та нарізали фронтальні зрізи (350 мкм) у передньо-задньому (anterior-posterior) напрямі: від брегма 1,10 до брегма -0,10 (**Рис. 5.12А**) [303]. Зрізи, отримані з відповідної зони кожної півкулі мозку (**Рис. 5.12Б**), переносили для культивування на пористі напівпроникні мембрани (**Рис. 5.12В**).

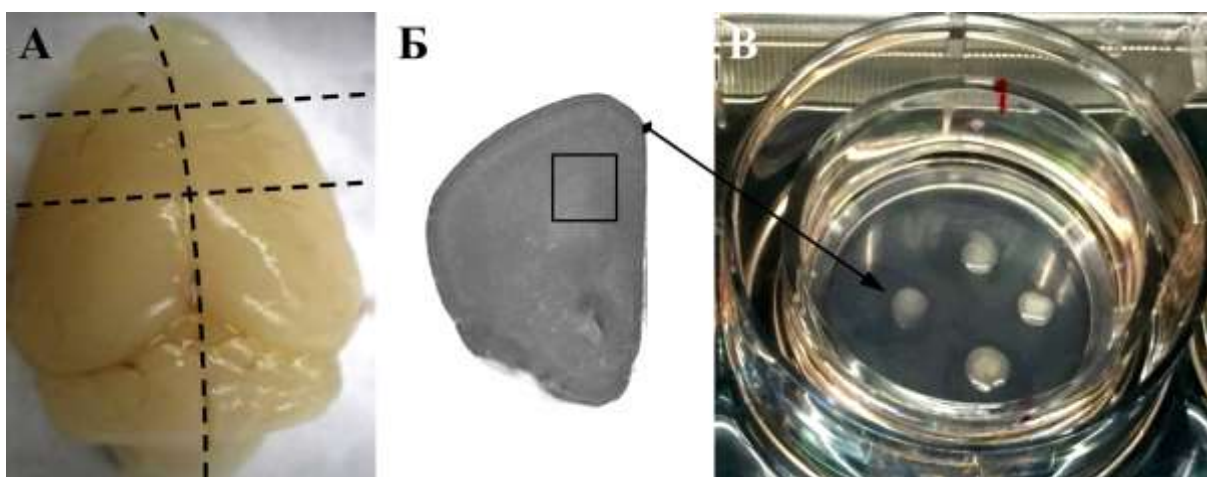


Рис. 5.12. Отримання органотипової культури зрізів головного мозку мишей. *А* – фото головного мозку миші. Переривчастою лінією показано ділянки, з яких виготовляли фронтальні зрізи для органотипової культури головного мозку. *Б* – фото половини фронтального зрізу. Квадратом позначена зона, яку брали для імуногістохімічного аналізу. *В* – фото культивованих зрізів головного мозку на напівпроникній мембрані.

Відомо, що при перивентрикулярній лейкомаляції найбільше пошкоджуються мієлінізовані нервові волокна мозолистого тіла, які сполучають великі півкулі головного мозку [70]. Тому ми аналізували імуногістохімічне забарвлення саме у зоні бокових шлуночків із мозолистим тілом (**Рис. 5.12Б**, позначено квадратом).

У попередній серії експериментів було показано, що для

моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo*, крім гіпоксично-ішемічного ушкодження нервової тканини додатково потрібно моделювання нейрозапалення. Саме тому при моделюванні ПВЛ *in vitro* ми, крім КГД, також додавали ендотоксин ЛПС для створення умов, що імітують нейрозапалення.

Були проведені пілотні дослідження впливу декількох концентрацій ліпополісахариду на органотипову культуру зрізів головного мозку (10, 100, 1000 нг/мл). Доза ЛПС 10 нг/мл мала слабкий вплив на відносну кількість ЛДГ у культуральному середовищі порівняно із контролем, а дози 100 і 1000 нг/мл мали подібний ефект на життєздатність культур (дані не показані). У подальших дослідженнях ми використовували дозу 100 нг/мл. Таким чином, аналізували такі варіанти впливів на органотипову культуру зрізів головного мозку миші: КГД, ЛПС (100 нг/мл) та спільна дія КГД і ЛПС.

Спектрофотометричний аналіз показав, що через 24 години після додавання ЛПС у культуральне середовище збільшувалася відносна кількість ЛДГ і становила $0,76 \pm 0,05$ у.о. порівняно із контролем – $0,430 \pm 0,04$ у.о. (**Рис. 5.13**) [303].

КГД мала ще більший пошкоджуючий ефект на тканину культивованих зрізів і відносна кількість ЛДГ у культуральному середовищі становила $0,929 \pm 0,03$ у.о. Спільна дія КГД і ЛПС призводила до ще більшого зростання відносної кількості ЛДГ і через 24 години вона сягала значення $1,299 \pm 0,07$ у.о. [303].

Через 48 годин показники кількості ферменту ЛДГ значно збільшувалися і становили $1,050 \pm 0,14$ у.о. після додавання ЛПС, $1,253 \pm 0,20$ у.о. після КГД і $2,164 \pm 0,49$ у.о. після спільної дії КГД і ЛПС [303].

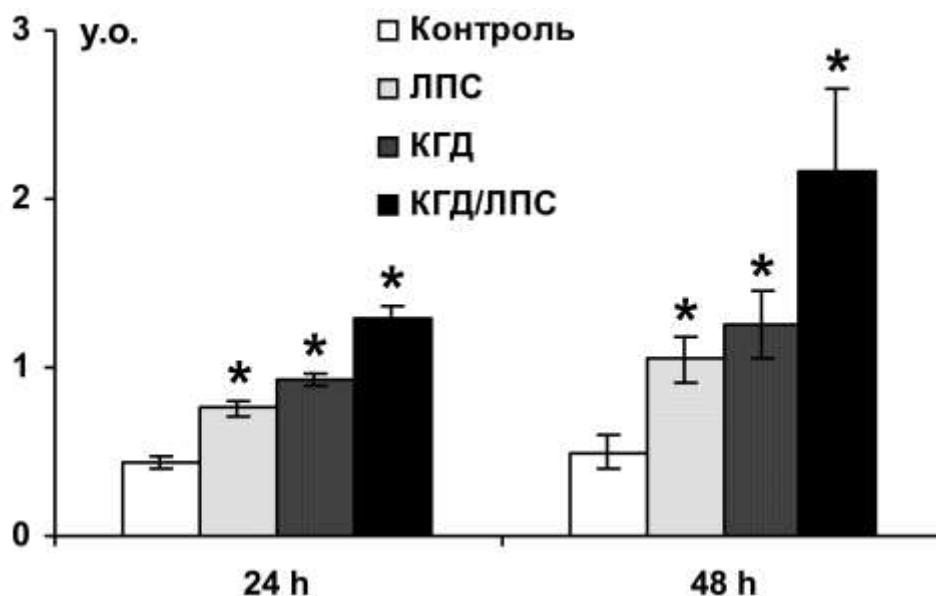


Рис. 5.13. Відносна кількість ферменту ЛДГ у культуральному середовищі органотипових зрізів через 24 та 48 годин після КГД, додавання ЛПС або спільної дії КГД і ЛПС. * - статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$).

Таким чином, результати спектрофотометричного аналізу продемонстрували, що після сумісної дії КГД та ЛПС пошкоджуючий вплив на органотипові зрізи суттєво більший, ніж при їх окремому використанні. Ефекти були виражені через 24 години і посилювалися через 48 годин.

Основною ознакою перивентрикулярної лейкомаляції є ураження білої речовини головного мозку біля бокових шлуночків.

Тому наступним етапом нашого дослідження був імуногістохімічний аналіз олігодендроцитів в органотиповій культурі зрізів головного мозку.

Імуногістохімічний аналіз проводили через 48 годин після впливів, коли ефекти на життєздатність (за результатами визначення відносної кількості ЛДГ) були найбільш вираженими (**Рис. 5.14**) [303].

Виявлено, що додавання ендотоксину ЛПС у культуральне середовище зменшувало Рір-імунореактивність зрізів мозку порівняно із контролем ($5,92 \pm 1,05$ у.о.) і становила $2,67 \pm 0,28$ у.о. (**Рис. 5.15**) [303].

Дія КГД також мала негативний вплив на стан нервової тканини, інтегральна щільність флюоресценції дорівнювала $2,93 \pm 0,53$ у.о. (**Рис. 5.15**).

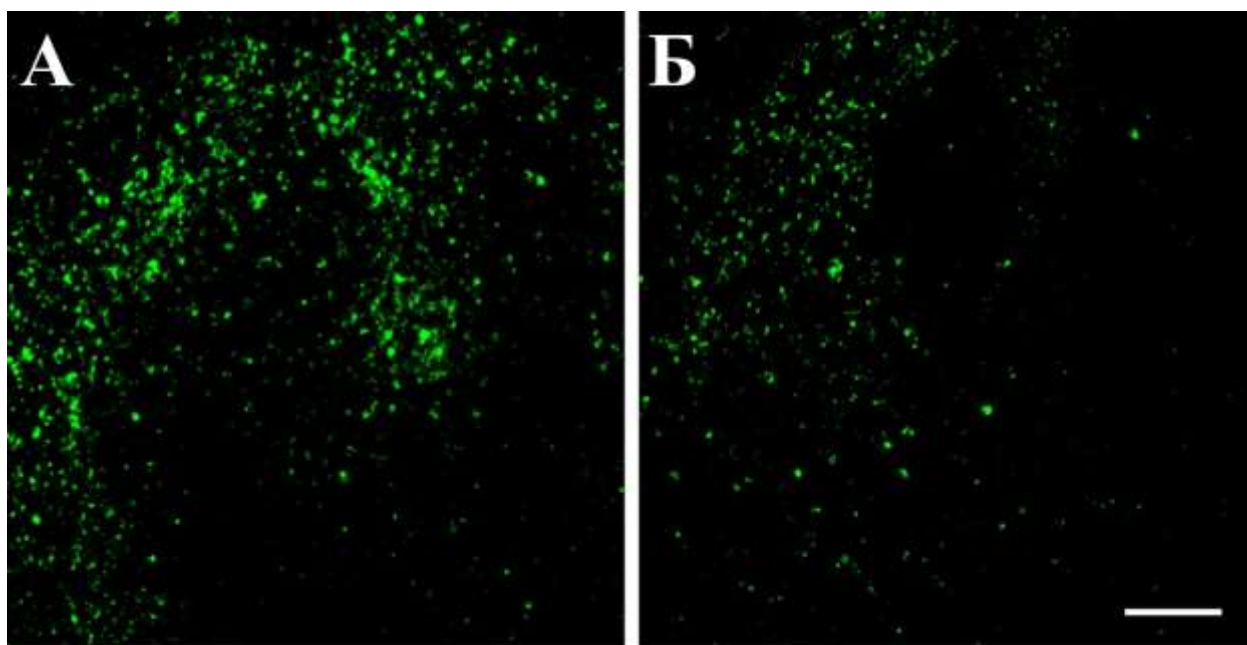


Рис. 5.14. Імуногістохімічний аналіз олігодендроцитів в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. А - конфокальне зображення зрізів, пофарбованих на маркер олігодендроцитів (Rір) у контролі. Б – конфокальне зображення зрізів через 48 год після впливу КГД/ЛПС. Шкала = 500 мкм.

Рір-імунореактивність зрізів мозку була найнижчою в умовах сумісної дії КГД/ЛПС та становила $1,90 \pm 0,35$ у.о., що відповідає суттєвому пошкодженню білої речовини головного мозку при ПВЛ (**Рис. 5.15**).

Реактивний гліоз – це реактивні зміни гліальних клітин (астроцитів і мікроглії) у відповідь на пошкодження нервової тканини, які зазвичай характеризуються проліферацією і/або гіпертрофією гліальних клітин [231]. На моделі перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo* було показано, що ПВЛ супроводжується вираженим реактивним гліозом.

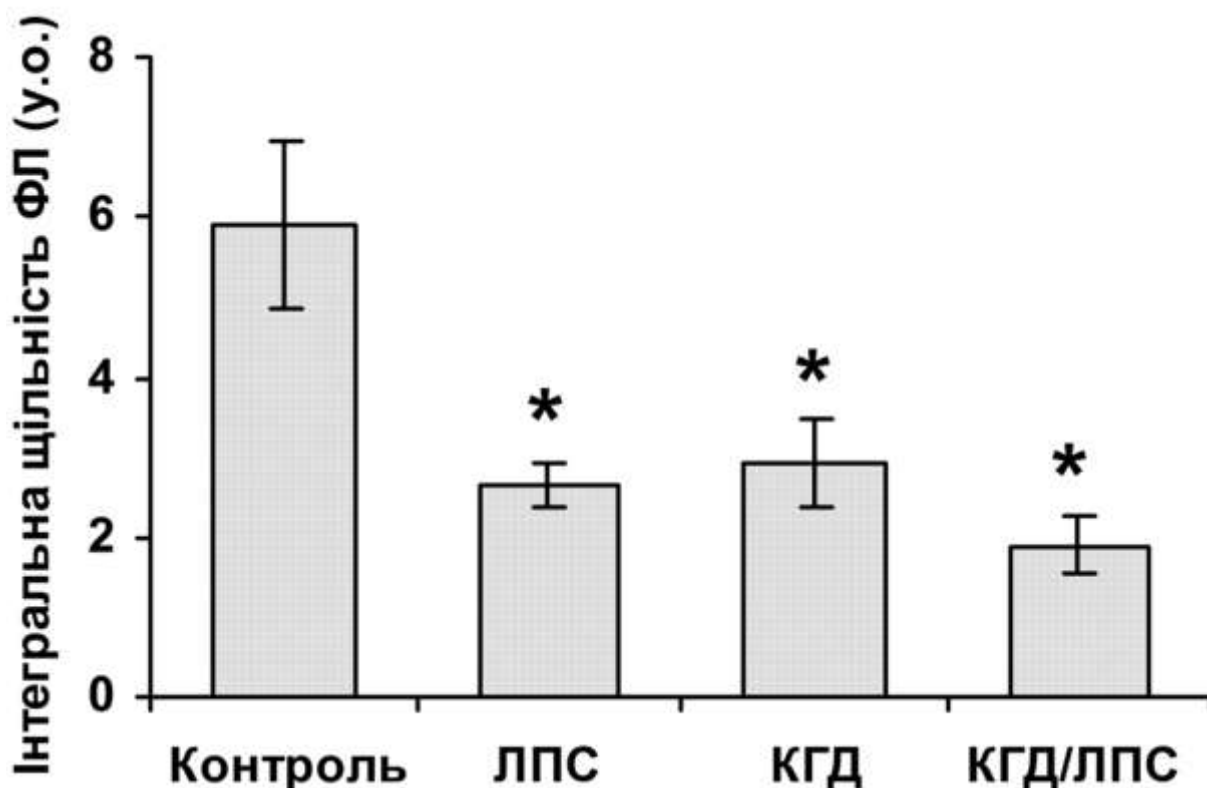


Рис. 5.15. Гістограма інтегральної щільності флюоресценції Kir-позитивних олігодендроцитів в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. * - статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$). Шкала - 500 мкм.

Тому для оцінки реактивного гліозу на моделі ПВЛ *in vitro* ми провели імуногістохімічне дослідження зрізів мозку з використанням маркерів астроцитів (GFAP) та мікрогліальних кліти (Iba-1).

Імуногістохімічне дослідження органотипової культури зрізів мозку показало, що після додавання ЛПС або дії КГД відбувалося збільшення інтенсивності забарвлення GFAP-позитивних астроцитів у порівнянні із контрольною групою (**Рис. 5.16**) [303].

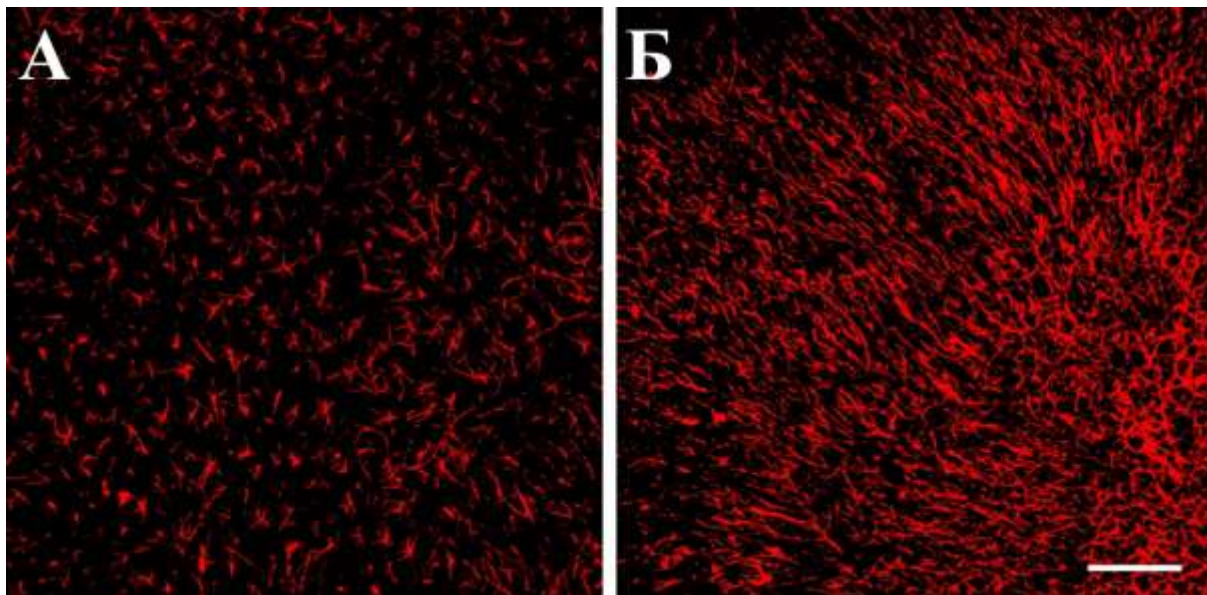


Рис. 5.16. Імуногістохімічний аналіз астроцитів в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. А – конфокальне зображення зрізів, пофарбованих на маркер астроцитів (GFAP) у контролі. Б – конфокальне зображення зрізів через 48 год після впливу КГД/ЛПС. В - гістограма інтегральної щільності флюоресценції. * - статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$). Шкала - 500 мкм.

Інтегральна щільність флюоресценції GFAP-позитивних астроцитів контрольної групи становила $5,82 \pm 0,65$ у.о., а після додавання ЛПС або дії КГД – $9,33 \pm 1,25$ та $10,86 \pm 1,20$ у.о. відповідно (**Рис. 5.17**) [303].

Спільна дія КГД та ЛПС призводила до ще більшого реактивного астрогліозу і інтегральна щільність флюоресценції становила $15,81 \pm 0,74$

у.о. (**Рис. 5.17**) [303]. Збільшення інтенсивності забарвлення GFAP-позитивних астроцитів у порівнянні із контрольною групою, ймовірно, було пов'язано з гіпертрофією соматичних астроцитів та їх відростків, а також за рахунок проліферації астроцитів.

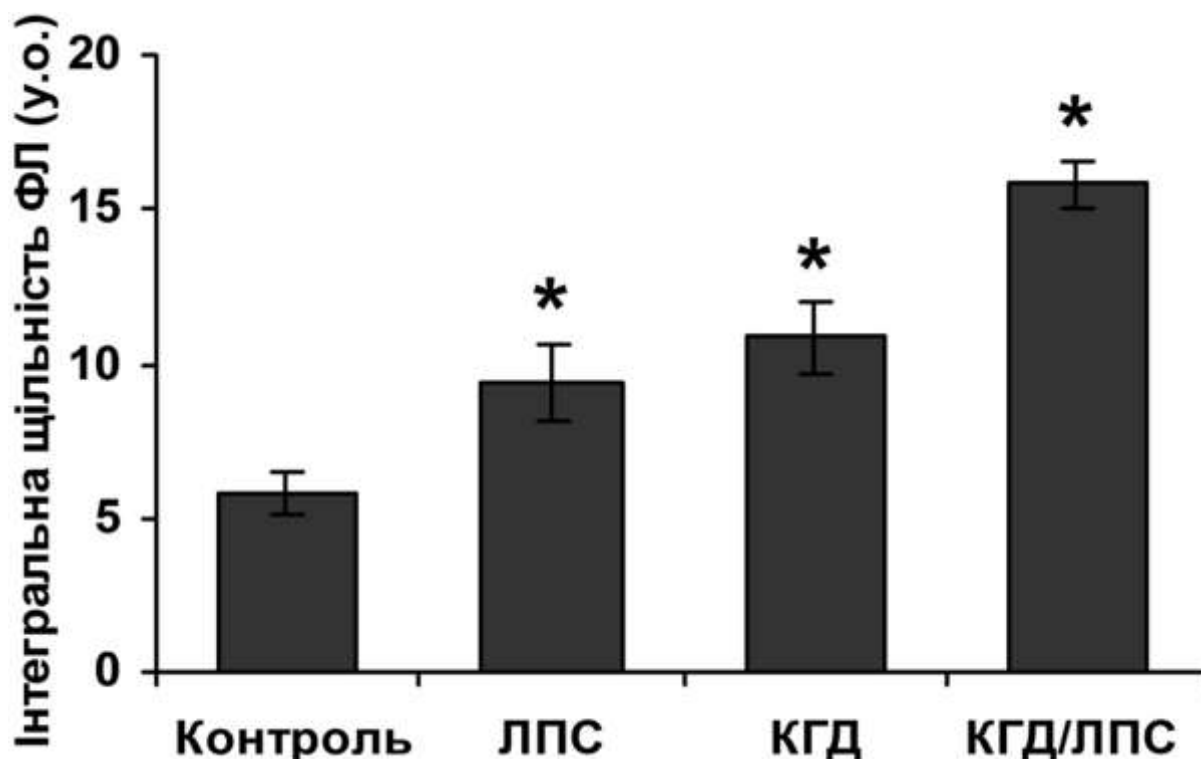


Рис. 5.17. Гістограма інтегральної щільності флюоресценції GFAP-позитивних астроцитів у органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. * - статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$).

Імуногістохімічний аналіз зрізів мозку на наявність маркера мікроглії Іба-1, показав, що після додавання ЛПС або дії КГД відбувалося збільшення інтенсивності забарвлення Іба-1-позитивних мікрогліальних клітин (**Рис. 5.18**) [303].

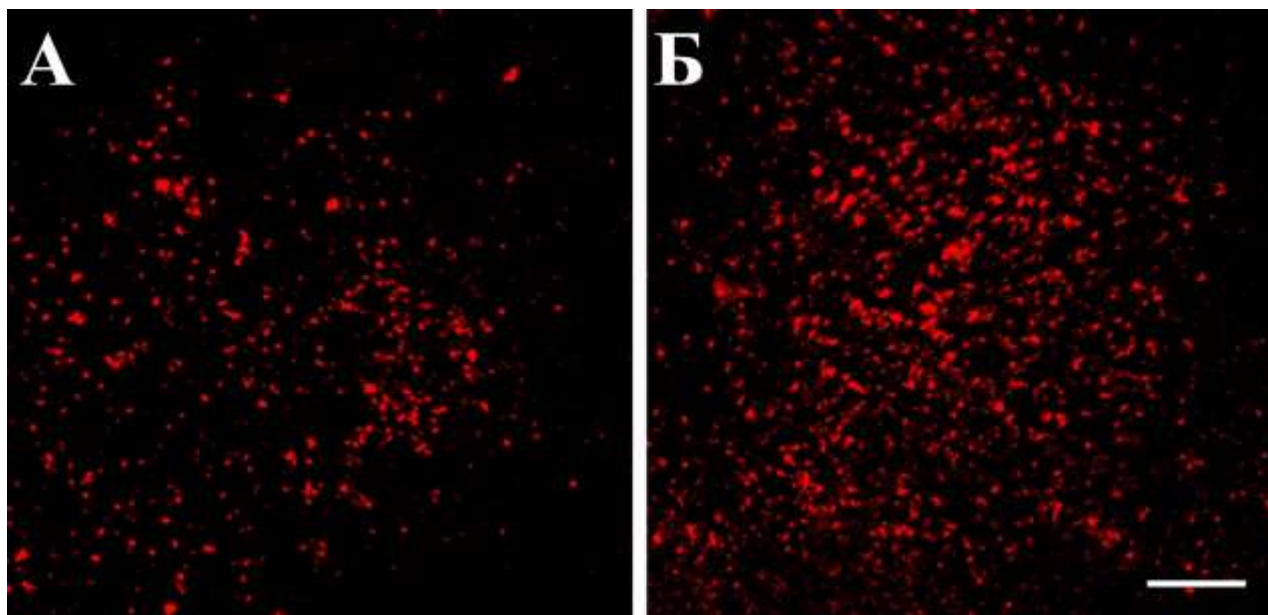
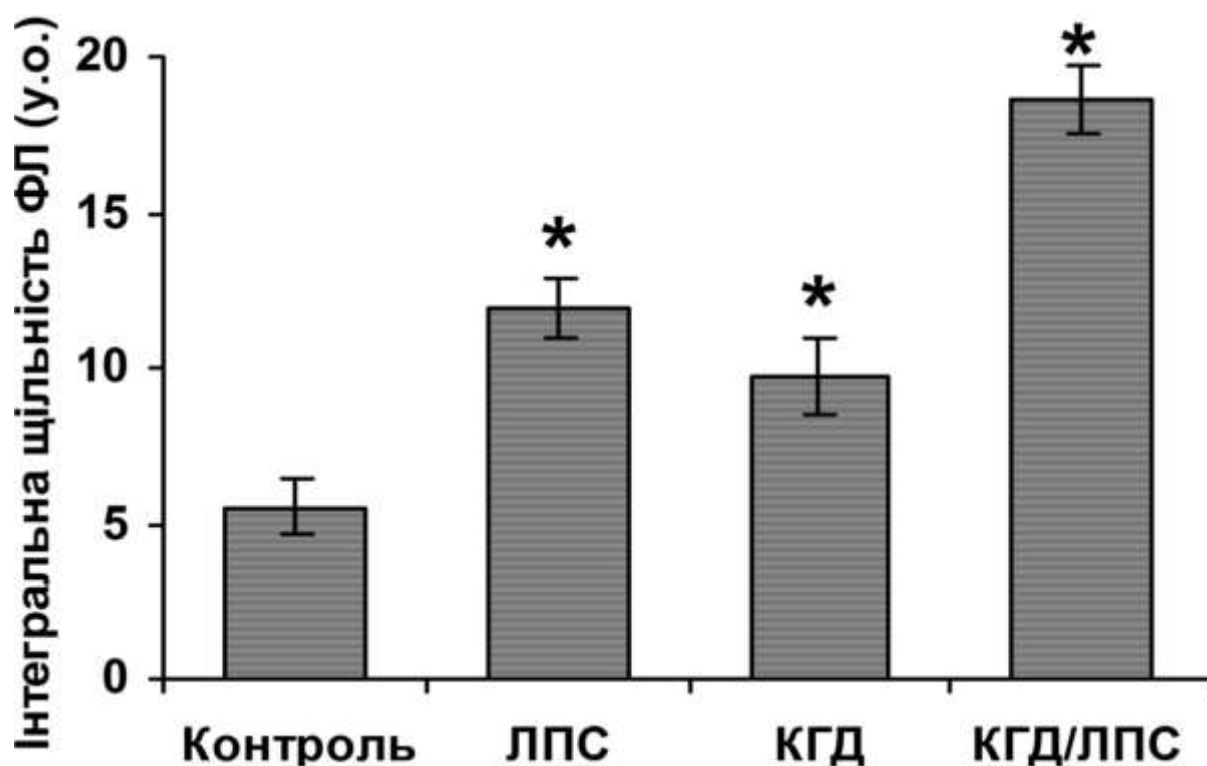


Рис. 5.18. Імуногістохімічний аналіз мікрогліальних клітин в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. А – конфокальне зображення зрізів, пофарбованих на маркер мікроглію (Iba-1) у контролі. Б – конфокальне зображення зрізів через 48 год після впливу КГД/ЛПС. В - Гістограма інтегральної щільності флюоресценції. * - статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$). Шкала = 500 мкм.

Інтегральна щільність флюоресценції Iba-1-позитивних мікрогліальних клітин після додавання ЛПС або дії КГД становила $11,93 \pm 0,91$ та $9,74 \pm 1,28$ у.о. відповідно, тоді як у контрольній групі лише $5,53 \pm 0,93$ у.о. (**Рис. 5.19**) [303].

Спільна дія КГД та ендотоксину ЛПС збільшувала реактивний мікрогліоз і інтегральна щільність флюоресценції становила $18,59 \pm 1,07$ у.о. (**Рис. 5.19**).



*Рис. 5.19. Гістограма інтегральної щільності флюоресценції Iba-1-позитивних мікрогліальних клітин у органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. * - статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$).*

Отже, у цій серії експериментів було розроблено модель ПВЛ на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. Показано, що сумісна дія КГД та ЛПС мала найбільш пошкоджуючий вплив на нервову тканину порівняно з кожним із цих чинників окремо. Сумісна дія КГД та ЛПС призводила до значного вивільнення цитозольного ферменту ЛДГ у культуральне середовище, зменшувала Рір-імунореактивність, що свідчить про пошкодження білої речовини головного мозку, та спричиняла виражений реактивний гліоз в органотиповій культурі зрізів головного мозку.

5.5. Вплив трансплантації ММСК на стан нервової тканини при моделюванні ПВЛ *in vitro*

Створену нами *in vitro* модель ПВЛ можна використовувати під час дослідження патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції, а також шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології, зокрема перспективних фармакологічних агентів та трансплантації стовбурових клітин.

Тому у наступній серії експериментів ми досліджували вплив трансплантації ММСК на стан нервової тканини головного мозку через 48 годин після моделюванні ПВЛ *in vitro* (КГД+ЛПС) .

Для співкультивування ММСК зі зрізами головного мозку культивовані клітини переводили із адгезивного стану в суспензію та наносили безпосередньо на культивований зріз (25 000 клітин на один зріз) перед моделюванням ПВЛ. Близько 10 % нанесених на зріз GFP-позитивних клітин прикріплялися до культивованого зрізу (**Рис. 5.20**) [304]. Решта ММСК розподілялися на поверхні пористої мембрани.

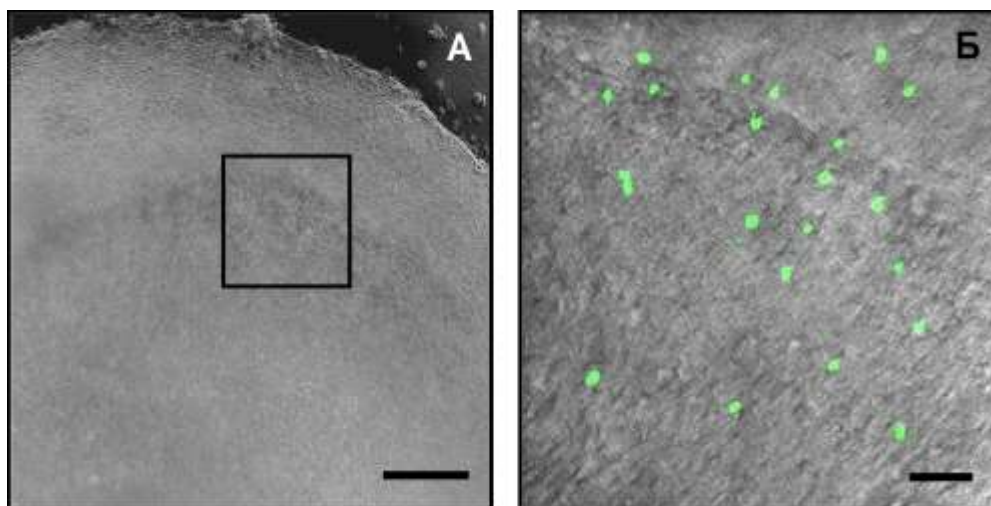


Рис. 5.20. Мікрофото культивованого зрізу головного мозку миші
 А – фазово-контрастне зображення. Квадрат - ділянка, яка показана на (Б). Б – GFP-позитивні ММСК (зелений колір) на культивованому зрізі у поєднанні з фазовим контрастом. Шкали: А – 500 мкм, Б – 50 мкм.

Для аналізу ступеня пошкодження нервової тканини в процесі моделювання ПВЛ *in vitro* та ефекту контактного співкультивування ММСК зі зрізами мозку на цій моделі використовували спектрофотометричний метод визначення ЛДГ.

Виявлено, що через 24 та 48 годин від початку моделювання ПВЛ *in vitro* відносна кількість ЛДГ у культуральному середовищі збільшувалася порівняно із контрольними зрізами в 3,1 раза та 4,3 раза відповідно (**Рис. 5.21**). Контактне співкультивування з ММСК достовірно зменшувало кількість ЛДГ порівняно із ПВЛ, як після 24, так і після 48 годин (у 2,4 раза, та в 1,9 раза, відповідно) (**Рис. 5.21**) [304].

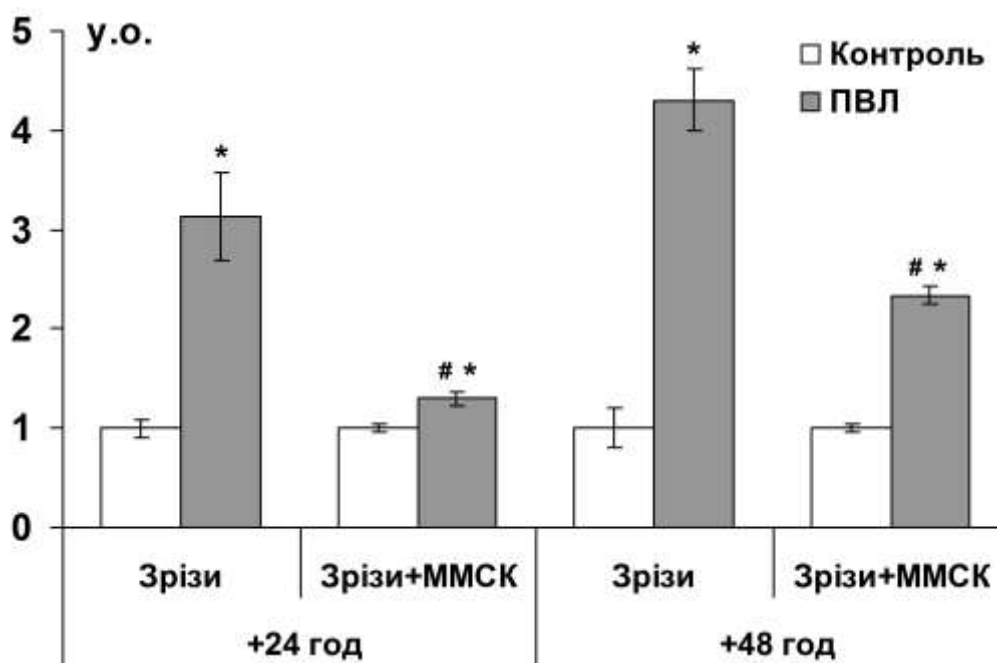


Рис. 5.21. Відносна кількість ферменту ЛДГ у культуральному середовищі органотипових зрізів через 24 та 48 годин від початку моделювання ПВЛ *in vitro* (ПВЛ) в умовах окремого культивування зрізів та сумісно з ММСК. * - статистично достовірна відмінність порівняно з контролем, # - статистично достовірна відмінність порівняно з ПВЛ ($P < 0,05$).

Також досліджували вплив ПВЛ *in vitro* на життєздатність ММСК у культурі. Показано, що через 24 та 48 годин після моделювання ПВЛ *in vitro* відносна кількість ЛДГ у культуральному середовищі ММСК достовірно не змінювалася порівняно із контрольними значеннями (без моделювання ПВЛ *in vitro*) (**Рис. 5.22**) [304]. Тобто, моделювання ПВЛ *in vitro* істотно не впливало на життєздатність ММСК у культурі, що свідчить про високу стійкість ММСК до ушкоджуючих чинників, використаних для моделювання ПВЛ у даному експерименті (зокрема 30-хв КГД та 100 нг ЛПС).

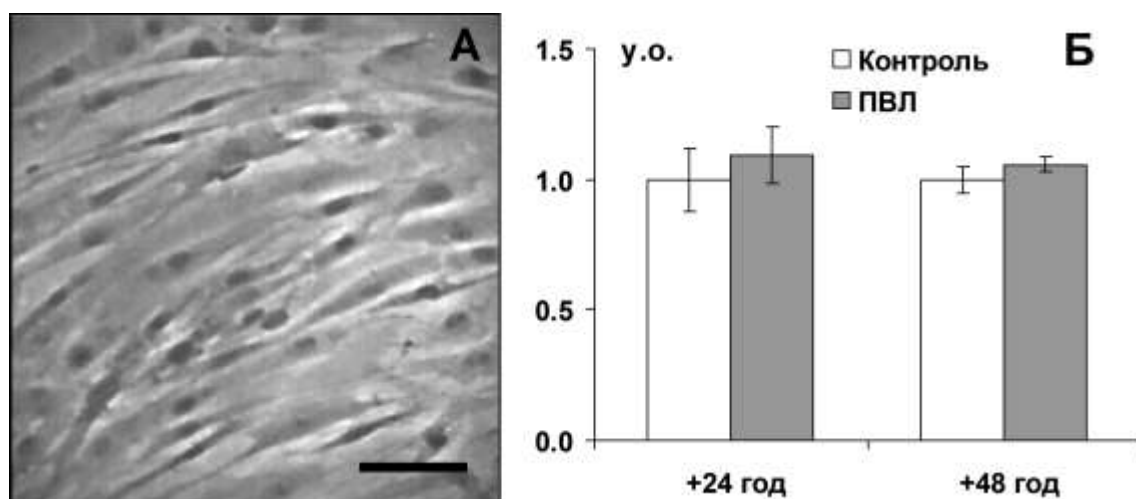


Рис. 5.22. Вплив ПВЛ *in vitro* на життєздатність ММСК. А – мікрофото культури ММСК. Б – гістограма, що демонструє відносну кількість ферменту ЛДГ у культуральному середовищі ММСК через 24 та 48 годин після моделювання ПВЛ *in vitro*. Шкала = 300 мкм.

Таким чином, результати спектрофотометричного аналізу продемонстрували, що контактне співкультивування органотипових зрізів з ММСК мало нейропротекторний характер і зменшувало пошкоджуючий вплив ПВЛ на зрізи головного мозку.

Імуногістохімічний аналіз показав, що на 14-ту добу контактного

співкультивування GFP-позитивних ММСК із органотиповими зрізами головного мозку значна кількість ММСК виживала, зберігала фенотипічні ознаки та залишалася у недиференційованому стані. Приблизно 5 % GFP-позитивних ММСК, що прикріпилися до культивованого зрізу, диференціювалися в NeuN-позитивні зрілі нейрони (Рис. 5.23А1-А3) або олігодендроцити (Рис. 5.23Б1-Б3) [304].

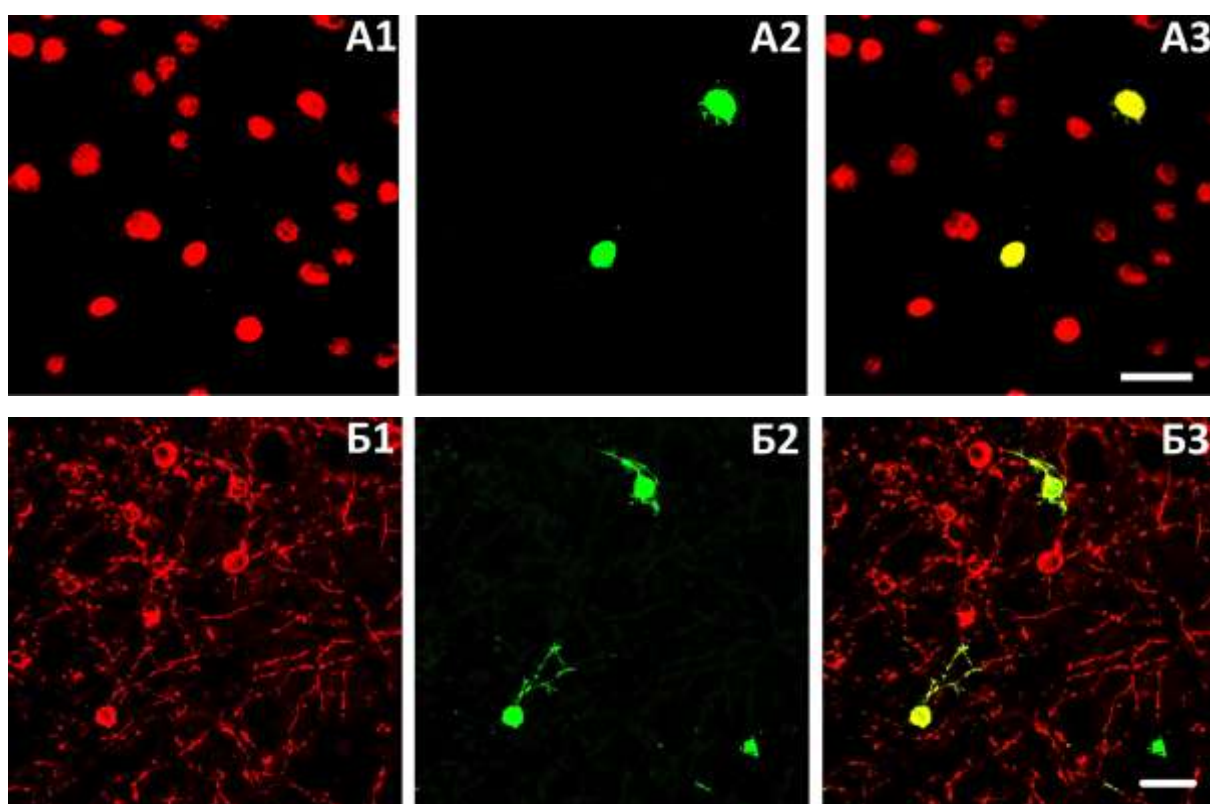


Рис. 5.23. Імуногістохімічний аналіз сумісної культури GFP-позитивних ММСК та зрізів головного мозку миші на 14-у добу співкультивування. А1 – конфокальне зображення зрізів, пофарбованих на маркер нейронів (NeuN), А2, – GFP-позитивні ММСК, А3 – накладення зображень А1 і А2; Б1 – конфокальне зображення зрізів, пофарбованих на маркер олігодендроцитів (oligodendrocytes), Б2 – GFP-позитивні ММСК, Б3 – накладення зображень Б1 і Б2. Шкала = 100 мкм.

Отже, результати нашого дослідження свідчать про те, що ММСК здатні диференціюватися у клітини нервової тканини при моделюванні ПВЛ *in vitro* і мають протекторний вплив на культивовані зрізи головного мозку.

Для перевірки гіпотези, що нейропротекторні властивості ММСК також реалізуються й паракринно завдяки різноманітним факторам, які вони секретують, у наступній серії експериментів ми аналізували вплив ММСК на нервову тканину після моделювання ПВЛ *in vitro* в умовах безконтактного співкультивування.

З цією метою ММСК 2-го пасажу переносили в 6-лункові культуральні планшети для подальшого безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку, які культивувалися на пористих напівпроникних мембранах (Рис. 5.24).

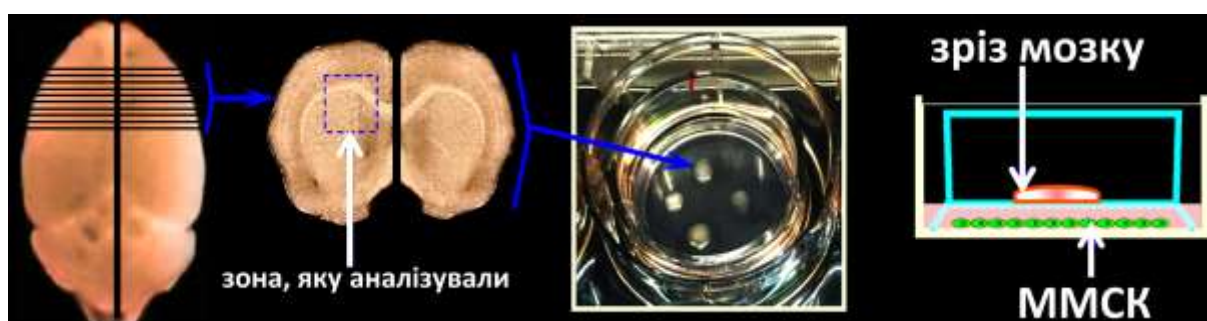


Рис. 5.24. Схема безконтактного співкультивування ММСК з органотиповою культурою зрізів головного мозку мишей. Квадратом позначена зона, яку брали для імуногістохімічного аналізу.

Імуногістохімічний аналіз культивованих зрізів головного мозку на наявність маркеру олігодендроцитів Rip, показав, що через 48 годин після моделювання ПВЛ та безконтактного співкультивування зрізів мозку з ММСК відбувалося збільшення інтенсивності забарвлення Rip-позитивних олігодендроцитів ($4,0 \pm 1,1$ у.о.) у порівнянні з групою ПВЛ

($1,9 \pm 0,4$ у.о.), але не сягало контрольного значення ($5,9 \pm 1,1$ у.о.) (**Рис. 5.25 A1-A4**) [308].

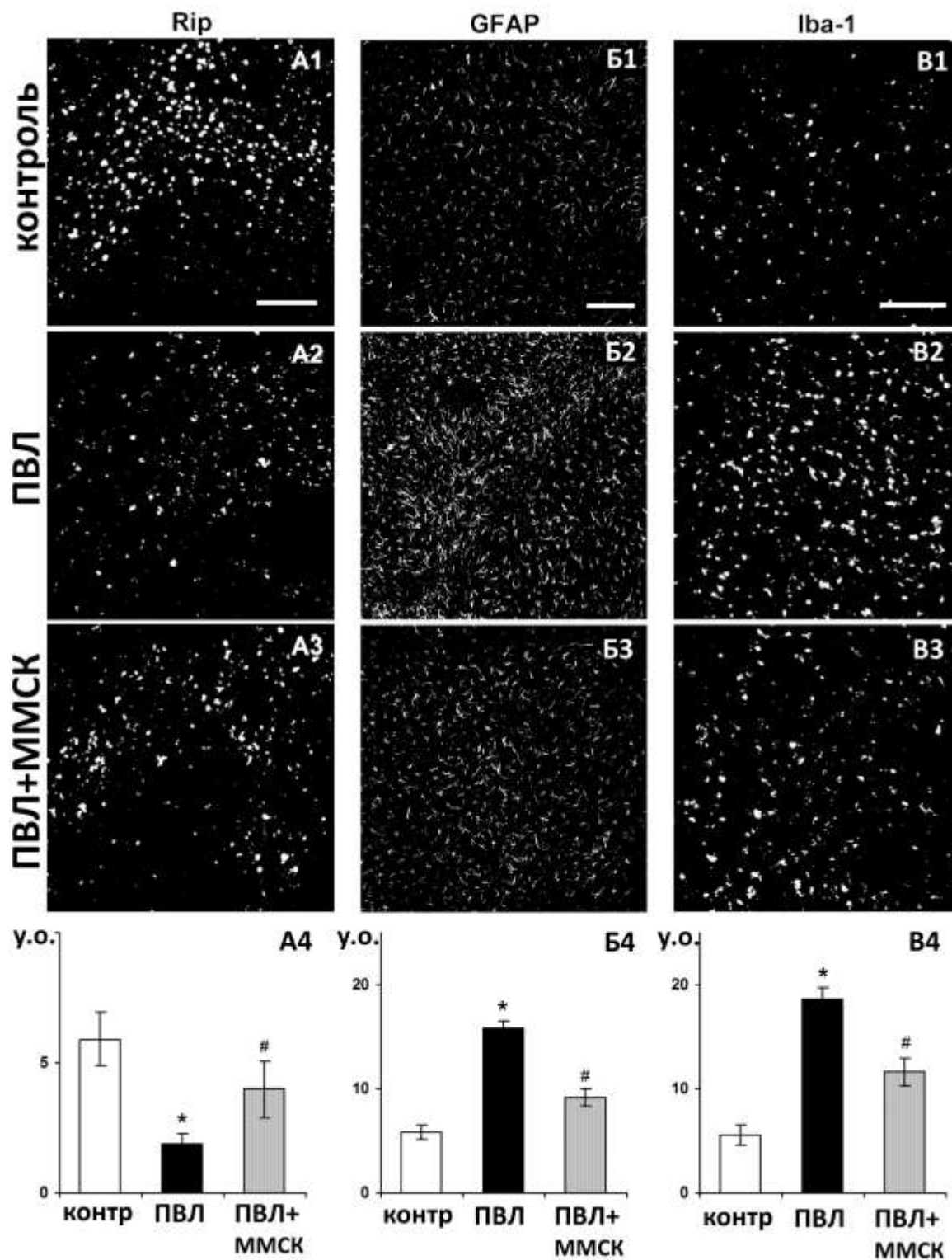


Рис. 5.25. Імуногістохімічний аналіз астроцитів, олігодендроцитів й мікроглії в органотиповій культурі зрізів головного

мозку миші за контрольних умов (A1, B1, B1), через 48 годин після моделювання ПВЛ (A2, B2, B2) та після ПВЛ і безконтактного співкультивування з ММСК (A3, B3, B3). A1-A4 – олігодендроцити (маркер – Rip); B1-B4 – астроцити (маркер – GFAP) і B1-B4 – мікроглія (маркер – Iba-1). A4, B4, B4 – гістограми інтегральної щільності флюоресценції в умовних одиницях (у.о.) імунопозитивних клітин в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. * – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$), # – статистично достовірна відмінність порівняно з ПВЛ ($P < 0,05$). Шкала = 500 мкм.

Оцінка інтегральної щільності флюоресценції GFAP- та Iba-1-позитивного сигналу показала, що ПВЛ призводило до збільшення відповідного сигналу (GFAP+, Iba-1+) у порівнянні з контрольною групою. У випадку астроцитів інтегральна щільність флюоресценції GFAP-позитивного сигналу через 48 годин після моделювання ПВЛ збільшилася до $15,8 \pm 0,7$ у.о. порівняно із контрольною групою ($5,8 \pm 0,7$ у.о.) (**Рис. 5.25 Б1, Б2, Б4**). У групі ПВЛ також збільшилася інтегральна щільність флюоресценції Iba-1-позитивних мікрогліальних клітин до $18,6 \pm 0,7$ у.о. порівняно із контролем – $5,5 \pm 0,9$ у.о. (**Рис. 5.25 В1, В2, В4**) [308].

Через 48 годин після моделювання ПВЛ та безконтактного співкультивування зрізів мозку з ММСК спостерігалось зменшення GFAP- та Iba-1-імунопозитивних сигналів порівняно з групою ПВЛ (**Рис. 5.25 Б3, В3**). Інтегральна щільність флюоресценції GFAP- та Iba-1-позитивних сигналів становила $9,2 \pm 0,8$ у.о. і $11,6 \pm 1,3$ у.о. відповідно (**Рис. 5.25 Б4, В4**) [308].

Таким чином, ми показали, що ММСК в умовах їх безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку мають нейропротекторний вплив на нервову тканину після моделювання ПВЛ *in vitro*, зменшуючи реактивний астро- та мікрогліоз та збільшуючи кількість

Rir-імунопозитивних олігодендроцитів. Це може свідчити про те, що ММСК реалізують свої нейропротекторні властивості не лише через диференціювання у клітини нервової тканини, а також й паракринно завдяки секреції різноманітних факторів.

РОЗДІЛ 6. ТРАНСФОРМАЦІЯ НПК У НАПРЯМКУ НАДЕКСПРЕСІЇ FGF-2 ДЛЯ УТВОРЕННЯ НАВКОЛОСУДИННИХ КЛАСТЕРІВ З НЕЙРОГЕННИМ ПОТЕНЦІАЛОМ

У попередніх експериментах ми показали, що нейральні прогеніторні клітини, стереотаксично трансплантовані в гіпокамп ішемізованих мишей, здатні стимулювати ендогенний нейрогенез у СГЗ зубчастої звивини і тим самим сприяти відновленню втрачених функцій. Проте, такі нейрогенні ніші є лише у СГЗ гіпокампа та СВЗ бокових шлуночків і характерною особливістю цих ніш є тісний контакт НСК/НПК із кровоносними судинами [174].

Інші ділянки мозку, зокрема кора, мають низький регенеративний потенціал і однією з причин цього є відсутність локальних ніш стовбурових клітин. Можливим шляхом вирішення проблеми низького регенеративного потенціалу кори мозку може бути створення локальних навколосудинних нейрогенних ніш у корі головного мозку тварин після ішемічного ушкодження мозку.

Відомо, що фактор росту фібробластів-2 (FGF-2) відіграє значну роль у нейрогенезі в нейрогенних нішах стовбурових клітин та є потужним модулятором проліферації і диференціювання мультипотентних НСК/НПК [236].

Тому цікавим було дослідити вплив трансформації нейральних прогеніторних клітин у напрямку надекспресії FGF-2 на поведінку цих клітин після їх трансплантації у соматосенсорну кору щурів з ішемічним ушкодженням мозку та можливість утворення ними локальних навколосудинних нейрогенних ніш з проліферативним потенціалом у корі мозку.

6.1. Характеристика культури нейральних прогеніторних клітин, отриманих із СВЗ

Перед трансплантацією НПК у мозок ішемізованих тварин досліджували фенотип нейральних прогеніторів за допомогою імуноцитохімічного аналізу.

На третю добу культивування нейральні прогенітори з СВЗ новонароджених щурів мали переважно округлу або біполярну форму і тонкі відростки (Рис. 6.1А) та $96,5 \pm 2,1$ % клітин експресували маркери Nestin і EGFR (Рис. 6.1Б), які характерні для активнопроліферуючих перехідних прогеніторних клітин типу С [158].

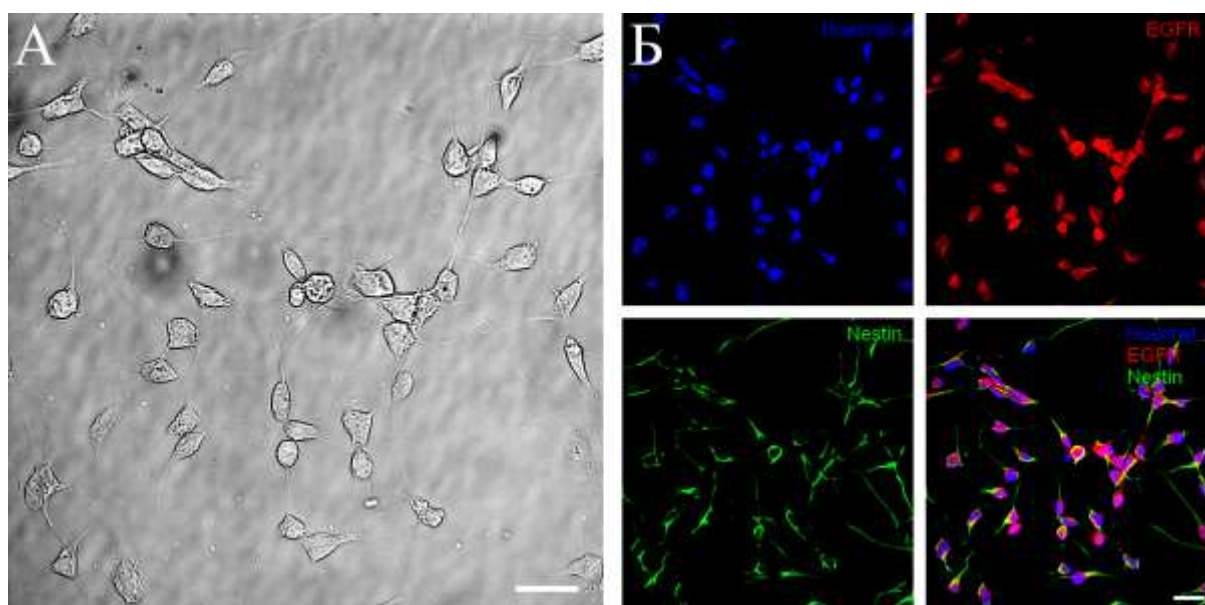


Рис. 6.1. Характеристика адгезивної культури нейральних прогеніторів із СВЗ на 3 добу культивування. (А) Фазово-контрастне зображення НПК. (Б) Конфокальне зображення культури НПК. Більшість клітин були імунопозитивні на Nestin (зелений колір) і EGFR (червоний колір). Ядра клітин контрастовані Hoechst 33342 (синій колір). Шкали = 20 мкм

На третю добу культивування середовище замінювали на свіже, що містило 20 нг/мл FGF-2 та контрольний або FGF-2 лентивірусний вектор. На 5-ту добу культивування (перед трансплантацією) клітини трипсинізували, центрифугували і ресуспендували в середовищі Neurobasal.

6.2. Утворення навколосудинних кластерів трансплантованими НПК, які надекспресують FGF-2

Досліджували можливість утворення навколосудинних кластерів трансплантованими нейральними прогеніторними клітинами, які надекспресують фактор росту фібробластів (FGF-2).

Для реалізації цієї мети робили стереотаксичну трансплантацію у соматосенсорну кору 3-денних щурят лінії Вістар суспензії НПК, отриманих з субвентрикулярної зони новонароджених щурів. Перед трансплантацією НПК були трансфековані лентивірусним вектором для надекспресії фактора росту фібробластів (FGF-2) та експресії зеленого флюоресцентного білка (GFP) (для візуалізації трансплантованих клітин). Після трансплантації FGF-2-трансформованих НПК у щурят були електрокоагульовані праві сонні артерії і вони були перенесені у камеру з 6 % O₂ на 30 хвилин для моделювання гіпоксично-ішемічного ураження мозку. Після цього щурята були повернуті до самиць, і на 7-му та 14-ту доби після ішемії вони були анестезовані та їхні мізки брали для морфологічних досліджень. Для визначення проліферативної активності клітин щурам внутрішньоочеревинно вводили розчин BrdU.

Після моделювання гіпоксично-ішемічного ушкодження мозку пошкоджені ділянки соматосенсорної кори можна було чітко визначити за значною загибеллю нейронів (**Рис. 6.2А, А1**) та реактивним астрогліозом (GFAP-імунореактивність) (**Рис. 6.2Б, Б1**).

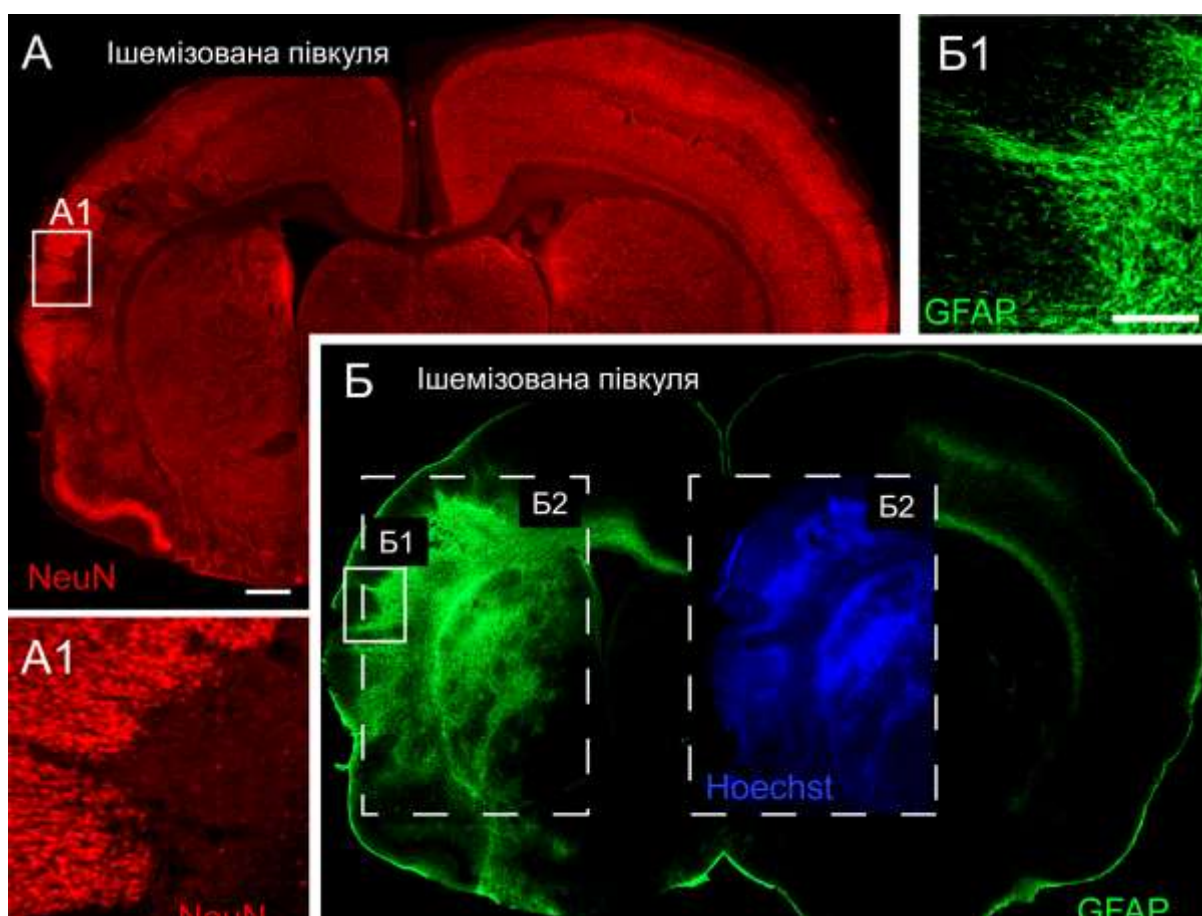


Рис. 6.2. Зображення фронтального зрізу головного мозку щура після церебральної ішемії. Імуногістохімічне забарвлення на NeuN – маркер нейронів (червоний колір) та GFAP – маркер астроцитів (зелений колір). Ядра клітин контрастовані Hoechst 33342 (синій колір). Шкала: А = 400 мкм, Б1 = 200 мкм.

Імуногістохімічний аналіз фронтальних зрізів головного мозку щура показав, що після трансплантації FGF-2-трансформовані НПК розподілялися більш дисперсно порівняно з контрольними НПК (**Рис. 6.3А**) та мігрували в ділянки ушкодження соматосенсорної кори (**Рис. 6.3Б**).

Цікавим є той факт, що переважна більшість FGF-2-трансформованих НПК контактувала безпосередньо із судинами, тоді як контрольні НПК не мали такої тенденції (**Рис. 6.3А, 6.4А**) [136].

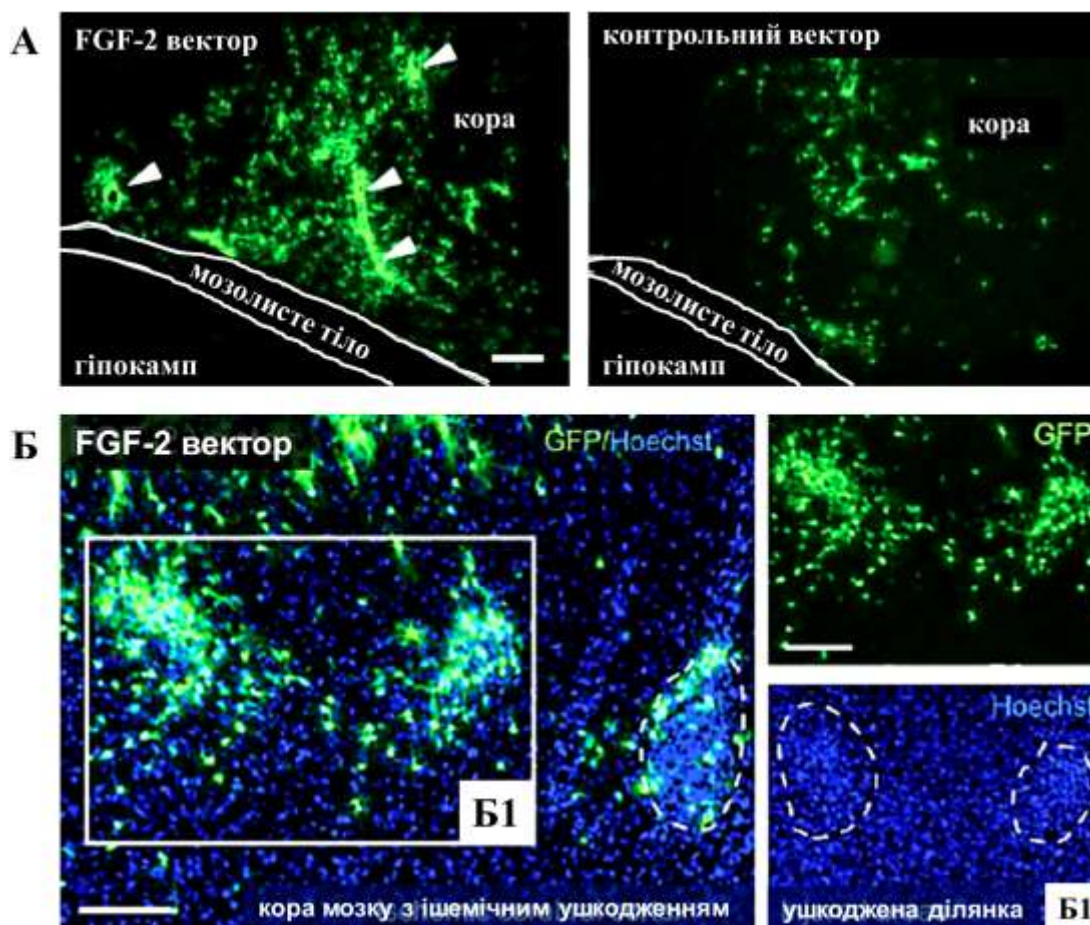


Рис. 6.3. Епіфлюоресцентні зображення головного мозку щура після ішемічного ушкодження та трансплантації НПК. (А) Розподіл FGF-2-трансформованих НПК (ліве зображення) і контрольних НПК (праве зображення) у соматосенсорній корі через 2 тижні після трансплантації. FGF-2-трансформовані НПК мали чітку тенденцію до накопичення навколо кровоносних судин (вказано стрілками на лівому зображенні). (Б) FGF-2-трансформовані НПК мігрували до ушкоджених ділянок кори (Б1). Зона ішемії, що відокремлена пунктирною лінією, характеризується значною гліальною реакцією (підвищена Hoechst реакція). Шкала: (А) = 200 мкм, (Б) = 100 мкм.

Підрахунок трансплантованих GFP-позитивних клітин показав, що через 2 тижні після трансплантації більшість FGF-2-трансформованих НПК ($67,2 \pm 7,3$ % (середнє значення \pm стандартна похибка середнього)) перебувала в тісному контакті з Nestin-позитивними судинами (**Рис. 6.4**) у порівнянні з лише $15,2 \pm 4,3$ % контрольних НПК ($P < 0,001$, t -тест) (**Рис. 6.5**) [136].

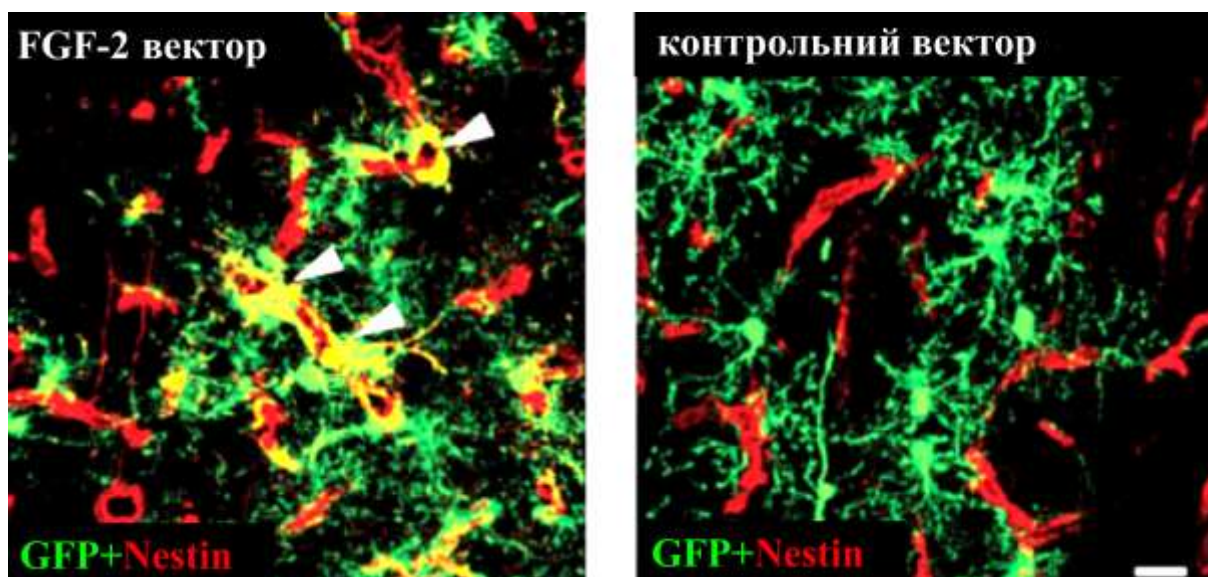
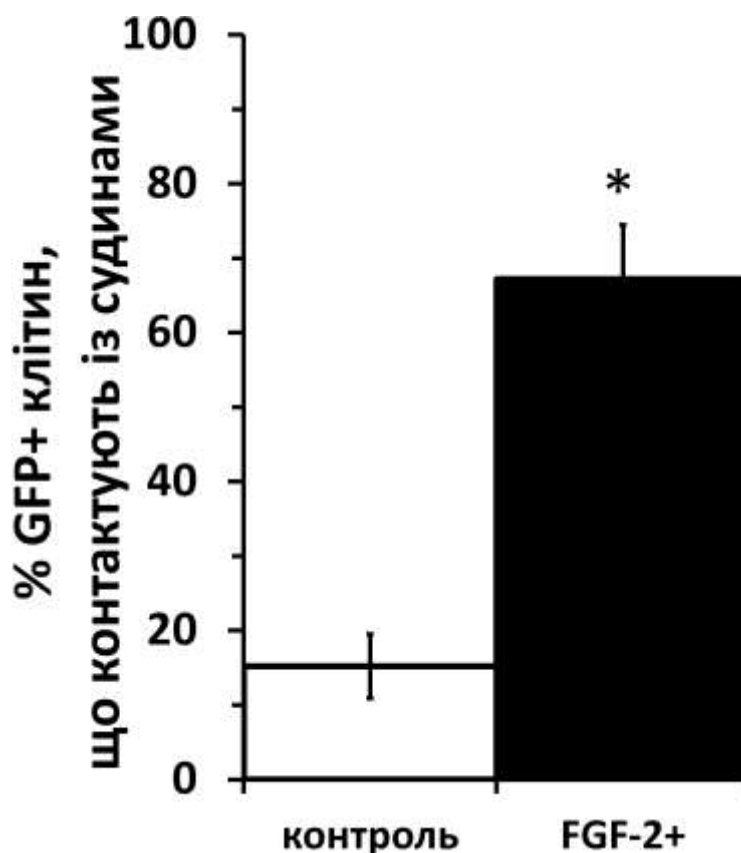


Рис. 6.4. Конфокальні зображення трансплантованих FGF-2-трансформовані НПК (ліве зображення) і контрольних НПК (праве зображення) у соматосенсорній корі через 2 тижні після трансплантації. FGF-2-трансформовані НПК перебували у тісному контакті з кровоносними судинами (білі стрілки) на відміну від контрольних НПК. Шкала = 20 мкм.



*Рис. 6.5. Графік, що демонструє відсоток FGF-2-трансформованих і контрольних НПК, які контактували з кровоносними судинами через 2 тижні після трансплантації (планки похибок вказують на стандартну похибку середнього, *, $P < 0,001$, t -тест).*

Відомо, що FGF-2 має сильний ангіогенний потенціал [270]. Тому ми вирішили дослідити можливість того, що трансплантовані НПК з надекспресією FGF-2 можуть індукувати локальний ангіогенез у тканині реципієнта. З цією метою ми визначали частку поверхні кровоносних судин (загальна площа поверхні кровоносних судин, поділена на загальну площу досліджуваного конфокального зображення).

Було виявлено, що кровоносні судини займають $6,1 \pm 1,4$ % від загальної площі в контрольній групі і $5,6 \pm 1,3$ % в FGF-2 групі, що вказує на те, що FGF-2-трансформовані НПК не викликали локальний ангіогенез.

За допомогою імуногістохімічного фарбування на маркер ендотеліальних клітин RECA-1, ми підтвердили наші попередні результати, що значна кількість ($78,8 \pm 4,7\%$) трансплантованих FGF-2-трансформованих НПК контактували з кровоносними судинами. Це значення трохи вище, ніж попереднє, отримане під час фарбування ендотеліальних клітин на Nestin ($67,2 \pm 7,3\%$). Це можна пояснити тим, що під час фарбування на Nestin маленькі капіляри слабо візуалізовувалися і, таким чином, не враховувалися у загальну площу поверхні кровоносних судин. Ці дані вказують на те, що надекспресія FGF-2 у НПК сприяє їх тісному контакту з судинною мережею.

6.3. Проліферативний потенціал трансплантованих FGF-2-трансформованих НПК

Наступним кроком було дослідження впливу навколосудинного середовища на проліферативну активність НПК. Ми знайшли значну кількість BrdU-позитивних трансплантованих клітини у безпосередній близькості від судин через тиждень (Рис. 6.6) та через 2 тижні (Рис. 6.7) після трансплантації.

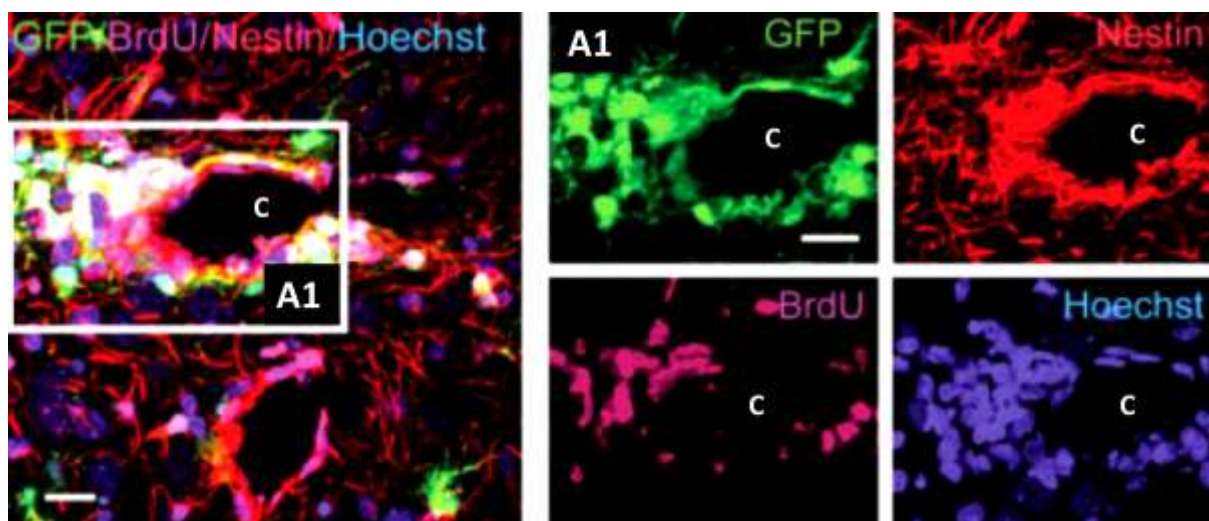


Рис. 6.6. Трансплантовані FGF-2-трансформовані нейральні прогеніторні клітини утворюють проліферативні кластери навколо судин

у корі головного мозку щурів через 1 тиждень після трансплантації. Більшість НПК, що знаходяться в навколосудинних кластерах, є BrdU-позитивними, як показано у вставці (A1). с – кровоносна судина. Шкала = 20 мкм.

Кількісний аналіз показав, що через тиждень після трансплантації $39,2 \% \pm 4,3 \%$ FGF-2-трансформованих НПК, що контактували з судинами, були BrdU позитивними в порівнянні з лише $21,6 \% \pm 3,7 \%$ трансплантованими НПК, що не контактували з судинами ($P < 0,05$, t -тест) (Рис. 6.8) [136].

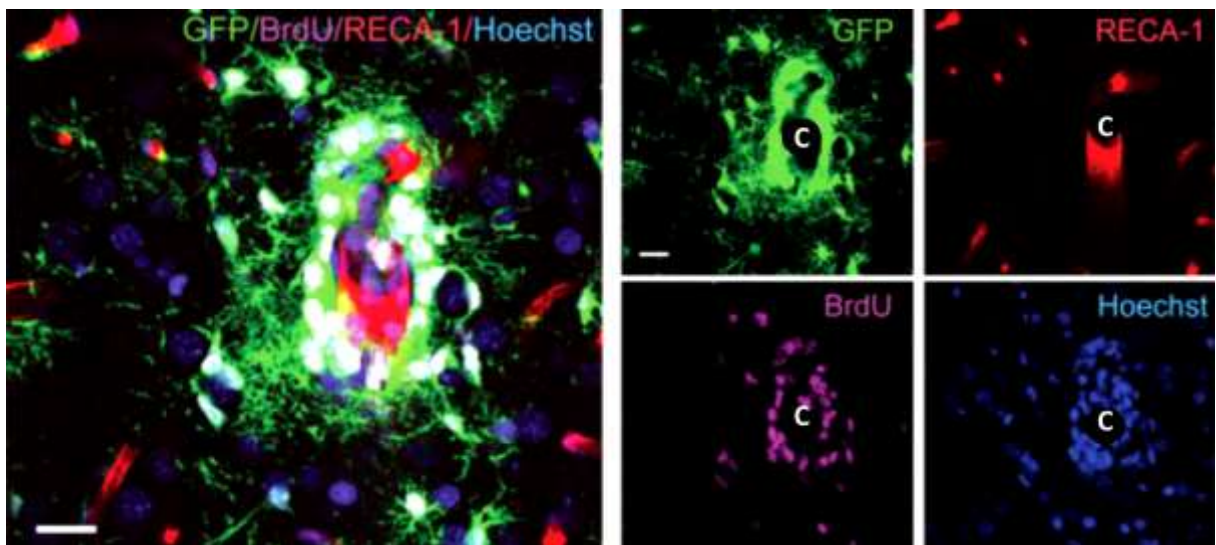


Рис. 6.7. Трансплантовані FGF-2-трансформовані нейральні прогеніторні клітини утворюють проліферативні кластери навколо судин у корі головного мозку щурів через 2 тижні після трансплантації. с – кровоносна судина. Шкала = 20 мкм.

Крім того, через 2 тижні після трансплантації, $70,5 \% \pm 3,6 \%$ FGF-2-трансформованих НПК, що контактували з судинами, були BrdU-позитивні в порівнянні з лише $38,5 \% \pm 11,8 \%$ трансплантованих

нейральних прогеніторних клітин, що не контактували з судинами ($P < 0,05$, t -тест) (Рис. 6.8) [136].

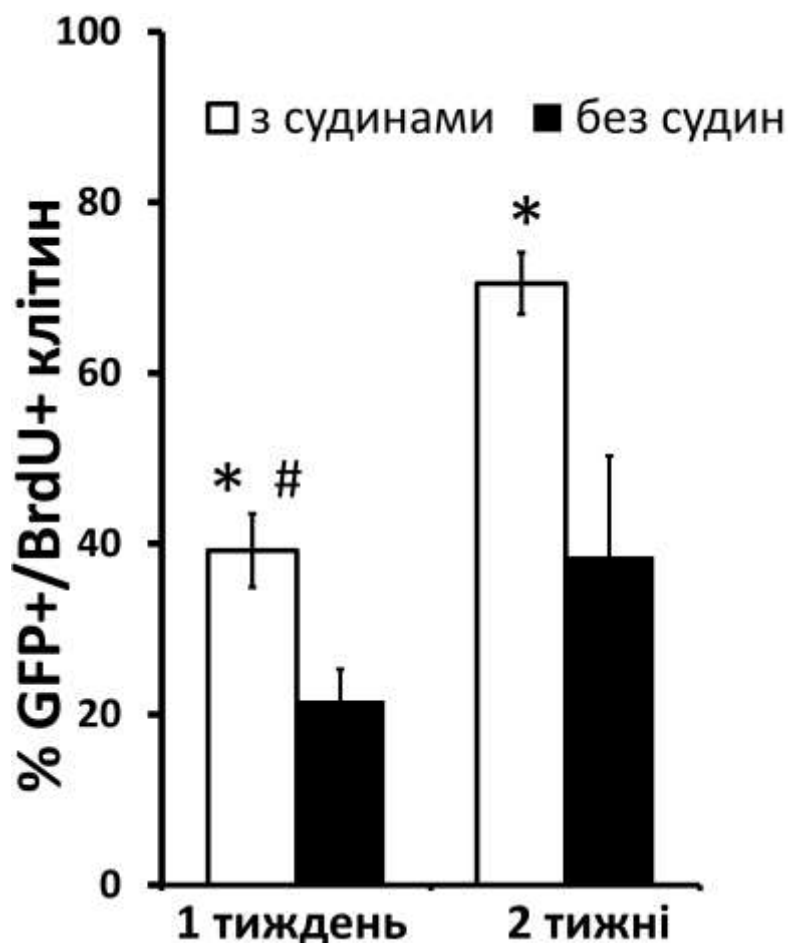


Рис. 6.8. Графік, що демонструє збільшення частки BrdU-позитивних клітин у FGF-2-трансформованих клітинних кластерах, що контактують із судинами, порівняно із тими, що не контактують (*, $P < 0,05$, t -тест), 1 та 2 тиждів після трансплантації (#, $P < 0,05$, t -тест).

Ці результати вказують на те, що FGF-2-трансформовані нейральні прогеніторні клітини, що контактували із судинами, мали проліферативну активність принаймні протягом 2 тижнів після трансплантації у сомато-сенсорну кору.

Також FGF-2 трансформовані НПК мали чітку тенденцію до утворення багатоклітинних кластерів навколо судин (Рис. 6.9А). Через

тиждень після трансплантації відсоток клітин, що контактували з судинами і належали до категорії «3-клітинні кластери», був значно більший у порівнянні з відсотком клітин, що контактували з судинами і належали до категорії «одна клітина» ($P < 0,05$) (Рис. 6.9Б) [136].

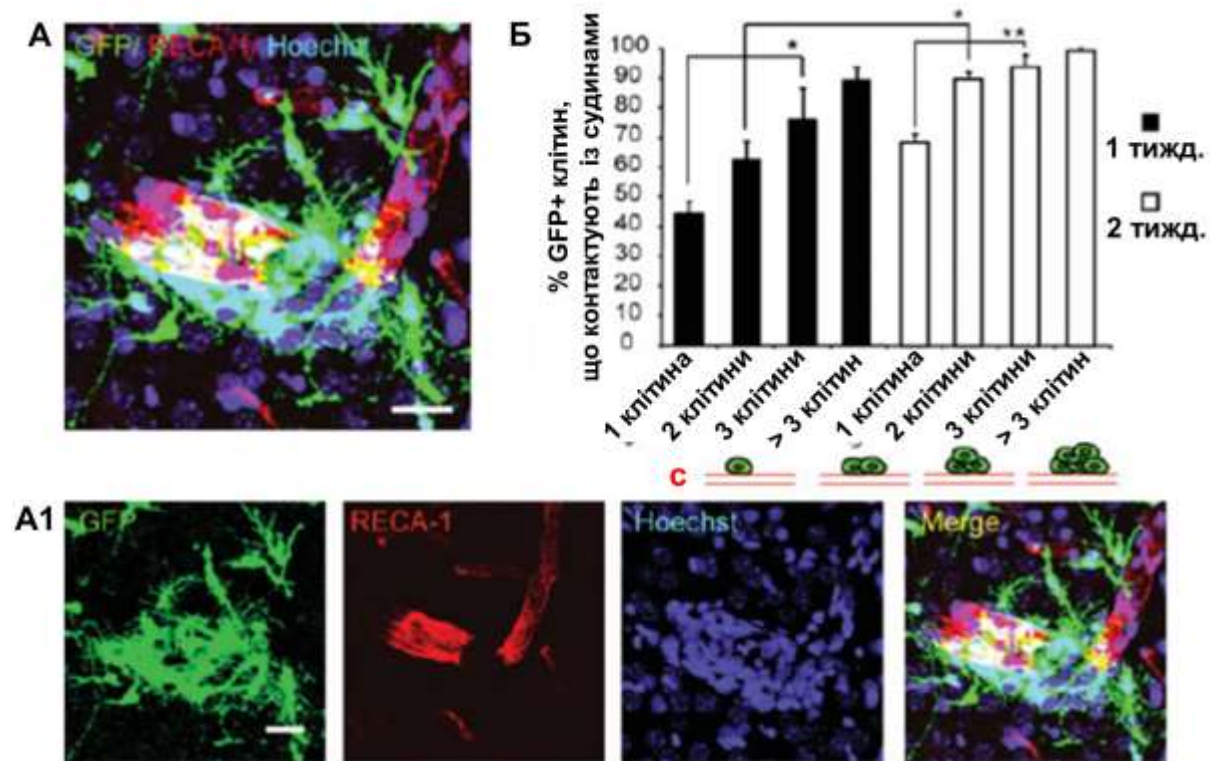


Рис. 6.9. Утворення багатоклітинних кластерів навколо судин FGF-2 трансформованими НПК. (А) Трансплантовані FGF-2-трансформовані НПК здатні утворювати кластери навколо кровоносних судин, мічених RECA-1. (А1) Зображує те саме, що і на (А), але на окремих каналах флюоресценції. (Б) Графік, що демонструє співвідношення окремих клітин або кластерів, що контактують з судинами, 1 та 2 тижні після трансплантації (*, $P < 0,05$ та **, $P < 0,005$). Скорочення: GFP – зелений флюоресцентний білок, с – кровоносна судина. Шкала = 20 мкм.

Той же ефект був виявлений і через 2 тижні після трансплантації. Ці дані свідчать про те, що у кластерах, утворених 3 або більше клітин, частка клітин, що контактували з судинами, була більшою ніж 90 %.

Цей факт вказує на те, що багатоклітинним кластерам потрібне навколосудинне мікрооточення. Крім того, частка двоклітинних кластерів, що контактували із судинами, істотно збільшувалася через 2 тижні після трансплантації в порівнянні з 1 тижнем (**Рис. 6.9Б**) ($P < 0,05$, t -тест).

Можна зробити висновок, що навколосудинне середовище сприяє формуванню проліферативних кластерів FGF-2-трансформованими нейральними прогеніторними клітинами.

6.4. FGF-2-трансформовані НПК, що контактують із судинами, утворюють пул незрілих нейронів після церебральної ішемії

Ключовим питанням трансплантації НПК у ішемізовану кору головного мозку є можливість утворення трансплантованими НПК пулу незрілих нейронів у відповідь на ішемічне ушкодження мозку.

В ішемічній корі $8,2 \pm 0,7$ % трансплантованих FGF-2-трансформованих НПК були позитивними на даблкортин (DCX), маркер незрілих нейронів, (**Рис. 6.10А,Б**) у порівнянні з $0,5 \pm 0,2\%$, після трансплантації в кору неішемізованих контрольних тварин ($P < 0,01$, t -тест) (**Рис. 6.10В,Б**).

Ці незрілі нейрони були виявлені в ділянках ушкодження кори і більшість DCX-позитивних нейральних прогеніторних клітин були знайдені в безпосередній близькості до кровоносних судин $68,1 \% \pm 3,5$ (**Рис. 6.11А,Б**) у порівнянні з лише $31,9 \% \pm 3,5$ %, що не контактували з кровоносними судинами ($P < 0.05$, t -тест) (**Рис. 6.11Б**).

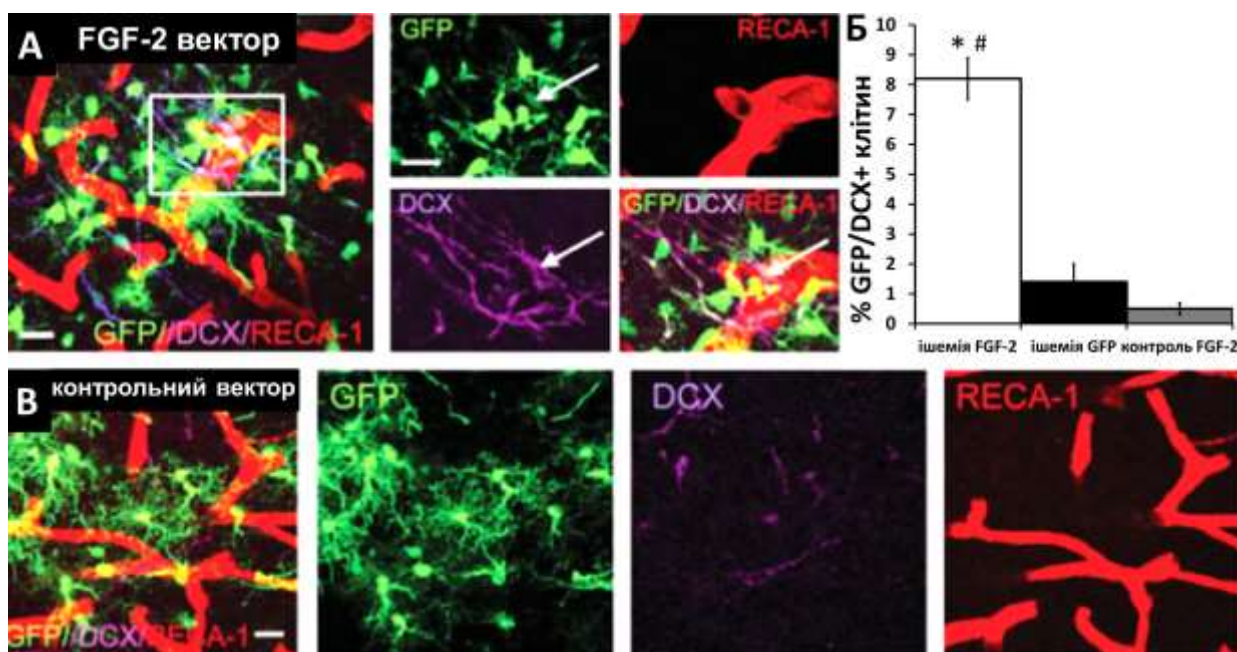


Рис. 6.10. Навколосудинні кластери FGF-2-трансформованих НПК утворюють незрілі нейрони після ішемії головного мозку. (А) Конфокальні зображення, які показують, що після церебральної ішемії частина FGF-2-трансформованих НПК, що контактують із кровоносними судинами, експресували DCX – маркер незрілих нейронів (вказано стрілкою). (Б) Графік, що відображає відсоток FGF-2-трансформованих НПК, що експресують DCX, після ішемії в порівнянні з неушкодженою контрольною корою (*, $P < 0,01$, t -тест), а також відсоток трансплантованих контрольних GFP+ НПК, що експресують DCX, після ішемії у порівнянні з FGF-2-трансформованими НПК (#, $P < 0,01$, t -тест). (В) Конфокальне зображення трансплантованих контрольних GFP-НПК, які не експресували DCX після церебральної ішемії. Скорочення: DCX – даблкортин, FGF-2 – фактор росту фібробластів-2, GFP – зелений флюоресцентний білок, RECA-1 – маркер ендотеліальних клітин. Шкала = 20 мкм.

Деякі DCX-позитивні НПК мігрувати ланцюжком вздовж малих судин (Рис. 6.11В) [136].

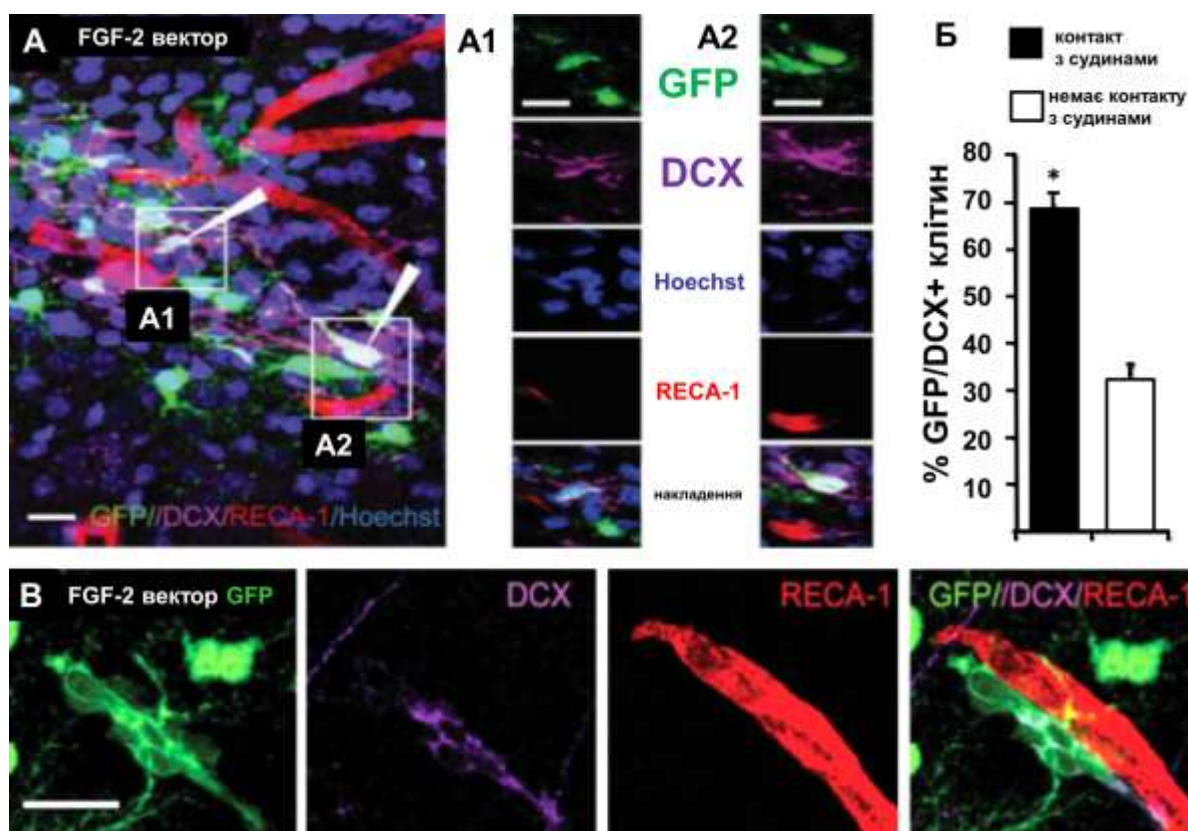


Рис. 6.11. Навколосудинні кластери FGF-2-трансформованих НПК утворюють незрілі нейрони після ішемії головного мозку. (А) Конфокальне зображення, що демонструє DCX-позитивні трансплантовані НПК, які тісно контактують із кровоносними судинами. Вставки (А1) і (А2) показують на окремих каналах флюоресценції міграцію GFP/DCX-позитивних НПК (вказано стрілкою). (Б) Графік демонструє, що після ішемічного ушкодження головного мозку більшість новостворених незрілих нейронів контактували з кровоносними судинами (*, $P < 0,05$, t -тест). (В) Конфокальне зображення, що демонструє кластер DCX-позитивних трансплантованих НПК, які, вірогідно, мігрують вздовж стінки судини. DCX – даблкортин, RECA-1 – маркер ендотеліальних клітин. Шкала = 20 мкм.

Таким чином, ці результати вказують на те, що трансплантовані FGF-2-трансформовані НПК утворюють пул незрілих нейронів у відповідь на ішемічне ушкодження мозку.

6.5. Просторова організація навколосудинних кластерів, утворених трансплантованими FGF-2-трансформованими НПК

Для більш детальної характеристики навколосудинних кластерів, які утворювали трансплантовані клітини, ми провели імуногістохімічний аналіз зрізів мозку на маркер перицитів – десмін.

Відомо, що перицити відіграють значну роль у регуляції мозкового кровообігу: артеріоли мають високу щільність перицитів на своїй поверхні для протистояння кров'яному тиску, у той час як венули та капіляри нерівномірно вкриті перицитами для запобігання зворотному потоку крові [24].

За характером розташування перицитів на кровоносних судинах можна визначити тип судини. Подвійне імуногістохімічне фарбування на десмін і RECA-1 показало, що венули були частково покриті десмін-позитивними перицитами, тоді як артеріоли були повністю вкриті цими клітинами (**Рис. 6.12А**) [307].

Середній діаметр судин, з якими контактували GFP-позитивні кластери (більше 3 GFP/BrdU-позитивних клітин) трансплантованих клітин, становив $26,89 \pm 4,01$ мкм (**Рис. 6.12Б**).

Усі GFP-позитивні кластери ($n = 65$) контактували з венулами, а не з артеріолами чи капілярами (**Рис. 6.12В-Д**). Імуногістохімічний аналіз показав, що трансплантовані FGF-2-трансформовані НПК не перебували в безпосередньому контакті з ендотеліальними клітинами. Ми систематично спостерігали зазор між GFP-позитивними трансплантованими НПК і RECA-1-позитивними ендотеліальними клітинами (**Рис. 6.12Б**) [307].

Для виявлення потенційних структур між трансплантованими НПК і ендотеліальними клітинами був проведений імуногістохімічний аналіз на GFAP, аквапорин-4 (AQP-4 – трансмембранний білок родини водних каналів, що експресується в астроцитарних ніжках – маркер

астроцитарних ніжок) і десмін (маркер перицитів).

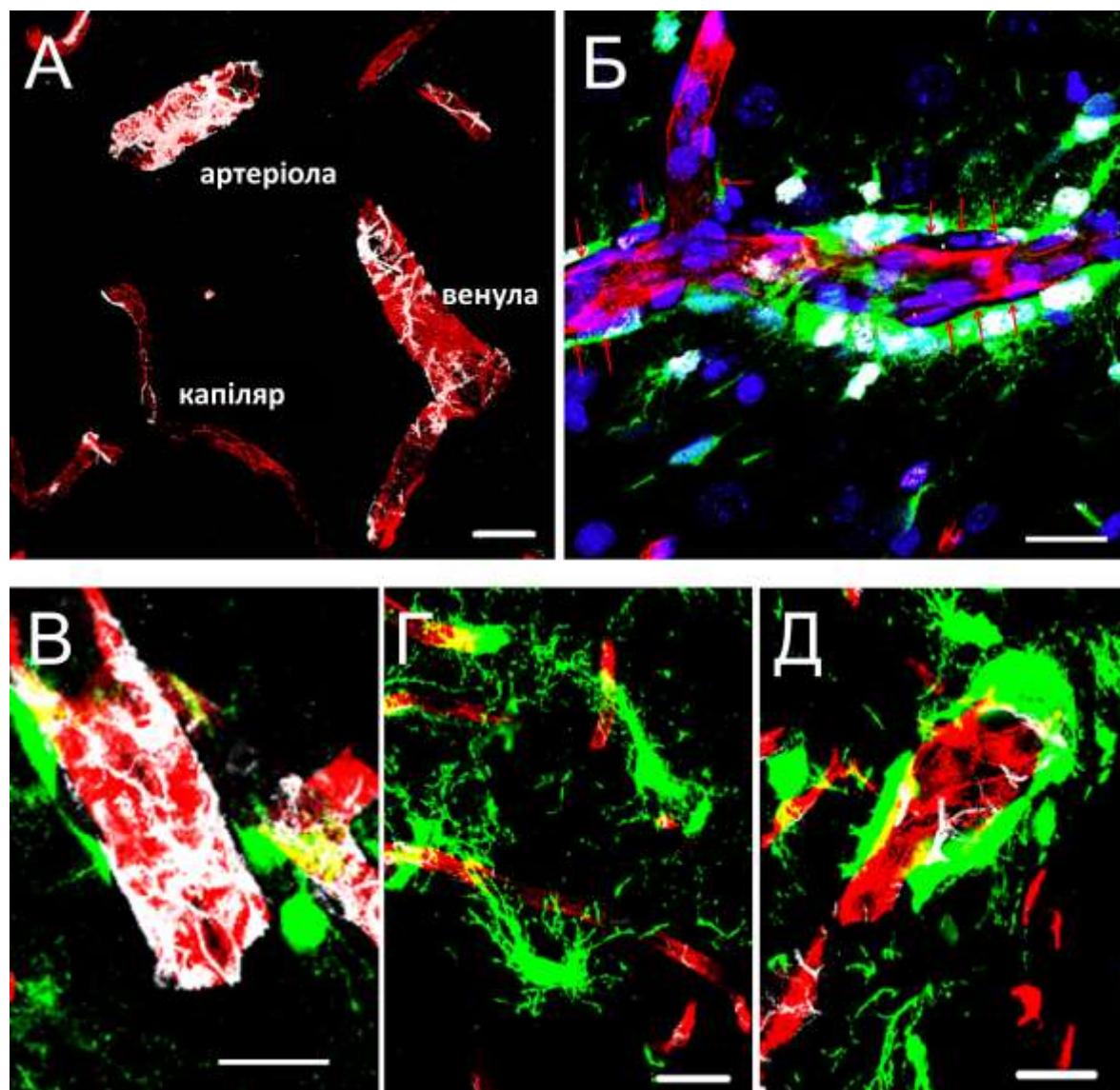


Рис. 6.12. GFP-позитивні трансплантовані НПК контактують із судинами реципієнта. (А) Відростки десмін-позитивних перицитів (білий колір) обгортають стінки RECA-1-позитивних судин (червоний колір). За характером розташування перицитів на кровоносних судинах можна визначити тип судини: артеріола, вена та капіляр (Б) Конфокальне зображення, що демонструє зазор (позначено червоними стрілками) між FGF-2/GFP+ НПК (зелений колір) і RECA-1-позитивними ендотеліальними клітинами (червоний колір). Ядра клітин контрастовані

Hoehst 33342 (синій колір). (В-Д) Конфокальні зображення трансплантованих GFP-позитивних клітин, що контактували з різними типами кровоносних судин: артеріола (В), капіляри (Г) та венула (Д). Червоний колір – RECA-1; зелений – FGF-2/GFP+ НПК; білий – десмін. Шкала = 20 мкм.

Як і очікувалося, аналіз показав, що кровоносні судини в соматосенсорній корі були повністю вкриті GFAP-позитивними астроцитарними ніжками (Рис. 6.13.А-Д) [307].

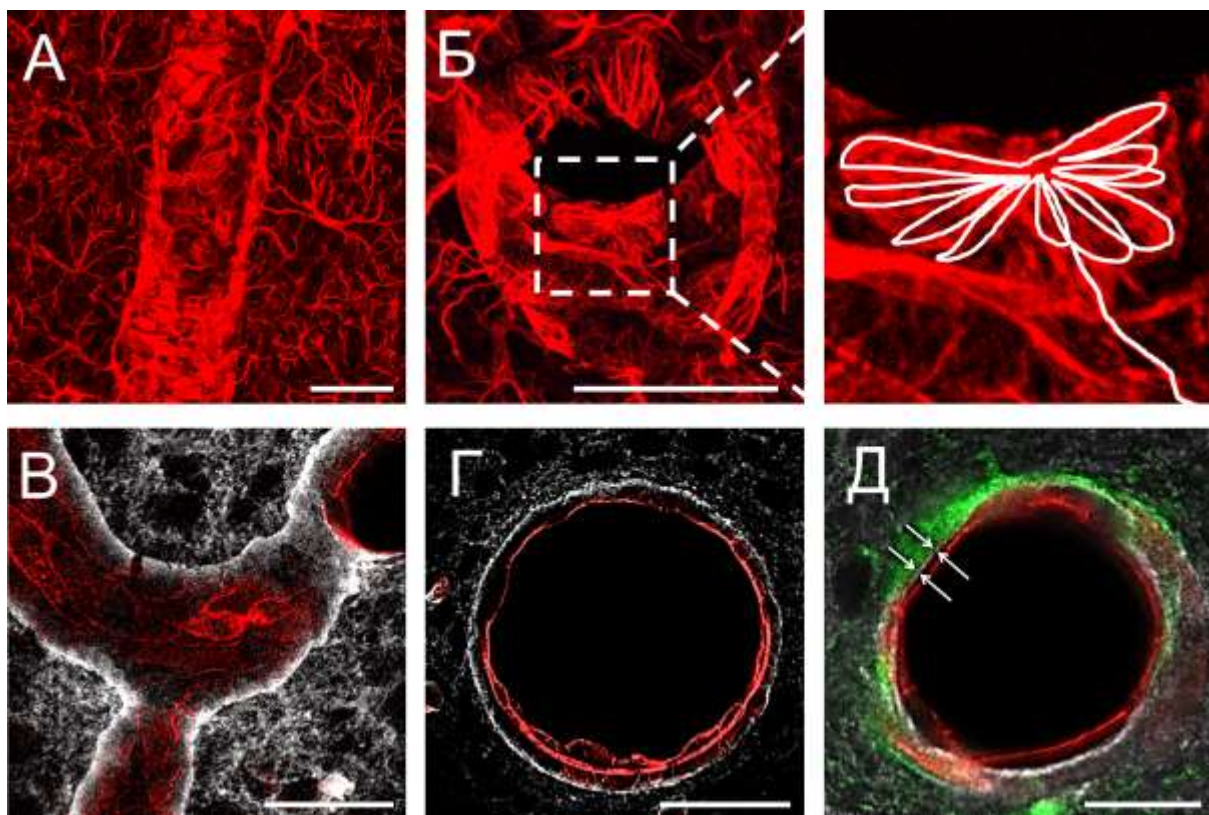


Рис. 6.13. *FGF-2-трансформовані НПК контактують з кровоносними судинами на ділянках, вкритих астроцитарними ніжками. (А, Б) Конфокальні зображення кровоносної судини, вкритої GFAP-позитивними астроцитарними ніжками: поздовжній (А) і поперечний (Б) зрізи. (Б) Праве зображення: збільшений вигляд ділянки у штрихованому*

квадраті на (Б); білою кривою схематично показано розеткоподібну астроцитарну ніжку. (В, Г) AQP-4-позитивні астроцитарні ніжки (білий колір) повністю охоплюють RECA-1-позитивну кровоносну судину (червоний колір): поздовжний (В) і поперечний (Г) зрізи. (Д) GFP-позитивні клітини (зелений колір) контактують із RECA-1-позитивними кровоносними судинами (червоний колір) через AQP-4-позитивні астроцитарні ніжки (білий колір) (позначено стрілками). Шкала = 20 мкм.

Було виявлено, що навколосудинні GFAP-позитивні астроцитарні ніжки мали характерні анатомічні утворення у вигляді розеткоподібних структур, які безпосередньо контактували з ендотеліальними клітинами (**Рис. 6.13Б**).

Аналіз зрізів мозку, пофарбованих на AQP-4, підтвердив, що кровоносні судини в соматосенсорній корі постнатальних щурів були повністю вкриті AQP-4-позитивними астроцитарними ніжками (**Рис. 6.13В,Г**).

Крім того, FGF-2-трансформовані GFP-позитивні трансплантовані клітини контактували з кровоносними судинами через AQP-4-позитивні астроцитарні ніжки (**Рис. 6.13Д**).

Імуногістохімічне фарбування на десмін показало, що FGF-2-трансформовані GFP-позитивні НПК в основному контактували з кровоносними судинами на ділянках, вкритих астроцитарними ніжками між перицитами (**Рис. 6.14А-В**) [307].

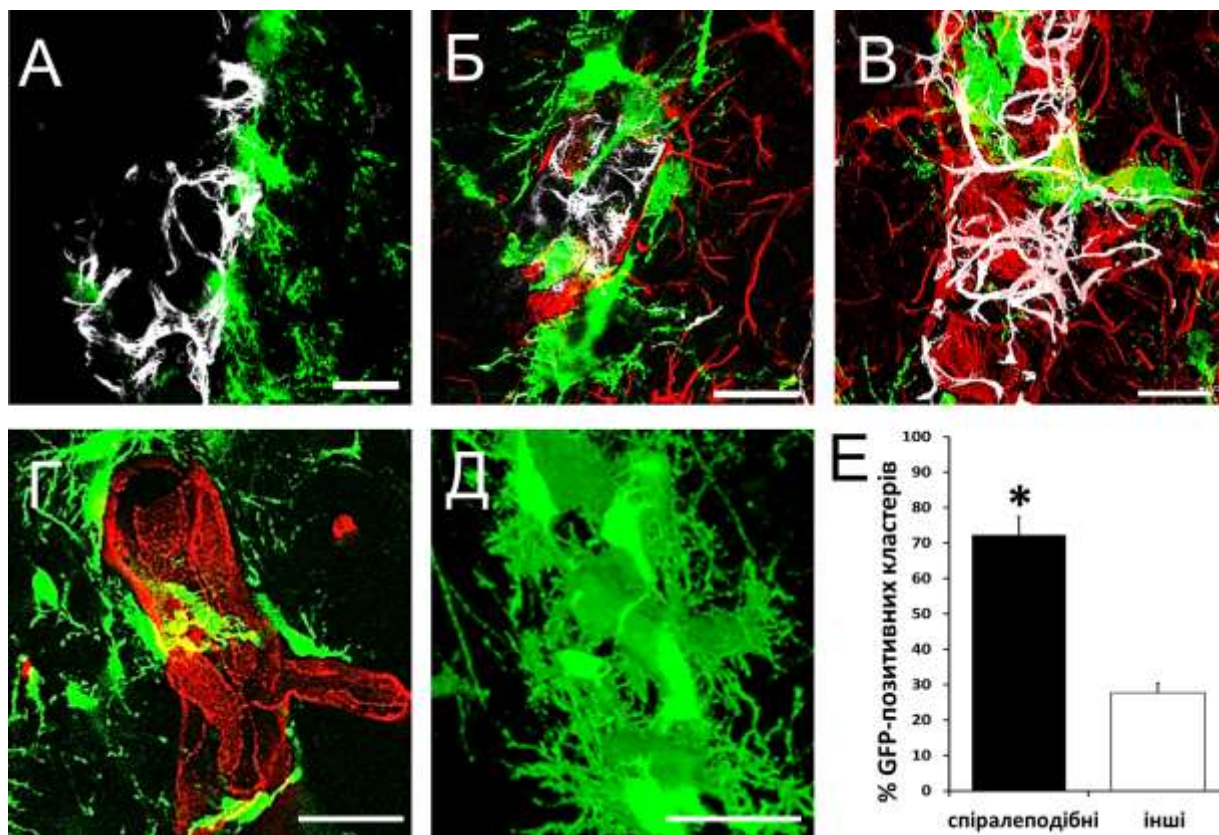


Рис. 6.14. FGF-2-трансформовані НПК контактують з кровоносними судинами на ділянках, вкритих астроцитарними ніжками між перицитами. (А-В) FGF-2-трансформовані НПК (зелений колір) контактують із кровоносними судинами на ділянках, вкритих астроцитарними ніжками (червоний колір) (Б, В) між перицитами (білий колір) (А). (Г) Спіралеподібні FGF-2-трансформовані GFP-позитивні кластери (зелений колір) огортають RECA-1-позитивну судину (червоний колір). (Д) 3D реконструкція спіралеподібних GFP-позитивних навколосудинних кластерів. (Е) Графік, що демонструє відсоток спіралеподібних і неспіралеподібних (інших) GFP-позитивних кластерів (планки похибок вказують на стандартну похибку середнього, * $P < 0,01$, t -тест). Шкала = 20 мкм.

Відомо, що перицити огортають судини спіралеподібним чином [164]. Тому FGF-2-трансформовані GFP-позитивні НПК, які

розташовувалися між перицитами, формували спіралеподібні навколосудинні кластери (**Рис. 6.14Г,Д**).

Кількісний аналіз (65 GFP-позитивних кластерів, $n = 7$ тварин) показав, що $72,3 \% \pm 5,2 \%$ проаналізованих навколосудинних GFP-позитивних кластерів мали спіралеподібну форму (**Рис. 6.14Е**) [307].

6.6. Ультраструктурний аналіз навколосудинних клітинних кластерів

Для аналізу навколосудинних кластерів на ультраструктурному рівні ми провели електронно-мікроскопічне дослідження фронтальних зрізів соматосенсорної кори. GFP-позитивні донорські клітини легко було візуалізувати на електронограмах через інтенсивно-чорне електронно-щільне забарвлення цитоплазми і відростків у наслідок діамінобезидинової (DAB) реакції (**Рис. 6.15**) [307].

DAB-позитивні клітини були видовженими, а їх цитоплазма містила мітохондрії. Ядра мали інвагінації і хроматин був нещільно упакований. Ультраструктурний аналіз підтвердив, що трансплантовані GFP/DAB-позитивні клітини здебільшого контактували з венулами через астроцитарні ніжки (**Рис. 6.15А**).

Під час кількісного аналізу спочатку підраховували загальну кількість DAB-позитивних клітин, що контактували з кровоносними судинами, а потім визначали відсоток DAB-позитивних клітин, що контактували з ендотеліальними клітинами через астроцитарні ніжки, і відсоток DAB-позитивних клітин, що контактували безпосередньо з базальної пластинкою. Кількісний аналіз (140 клітин, $n = 5$ тварин) показав, що значна більшість ($88,5 \% \pm 7,4 \%$) клітин контактувала з судинами через астроцитарні ніжки і лише $12,5 \% \pm 3,2 \%$ DAB-позитивних клітин (**Рис. 6.15Б,Г**) мали безпосередній контакт із базальною

пластинкою ендотеліальних клітин венул (**Рис. 6.15**) [307].

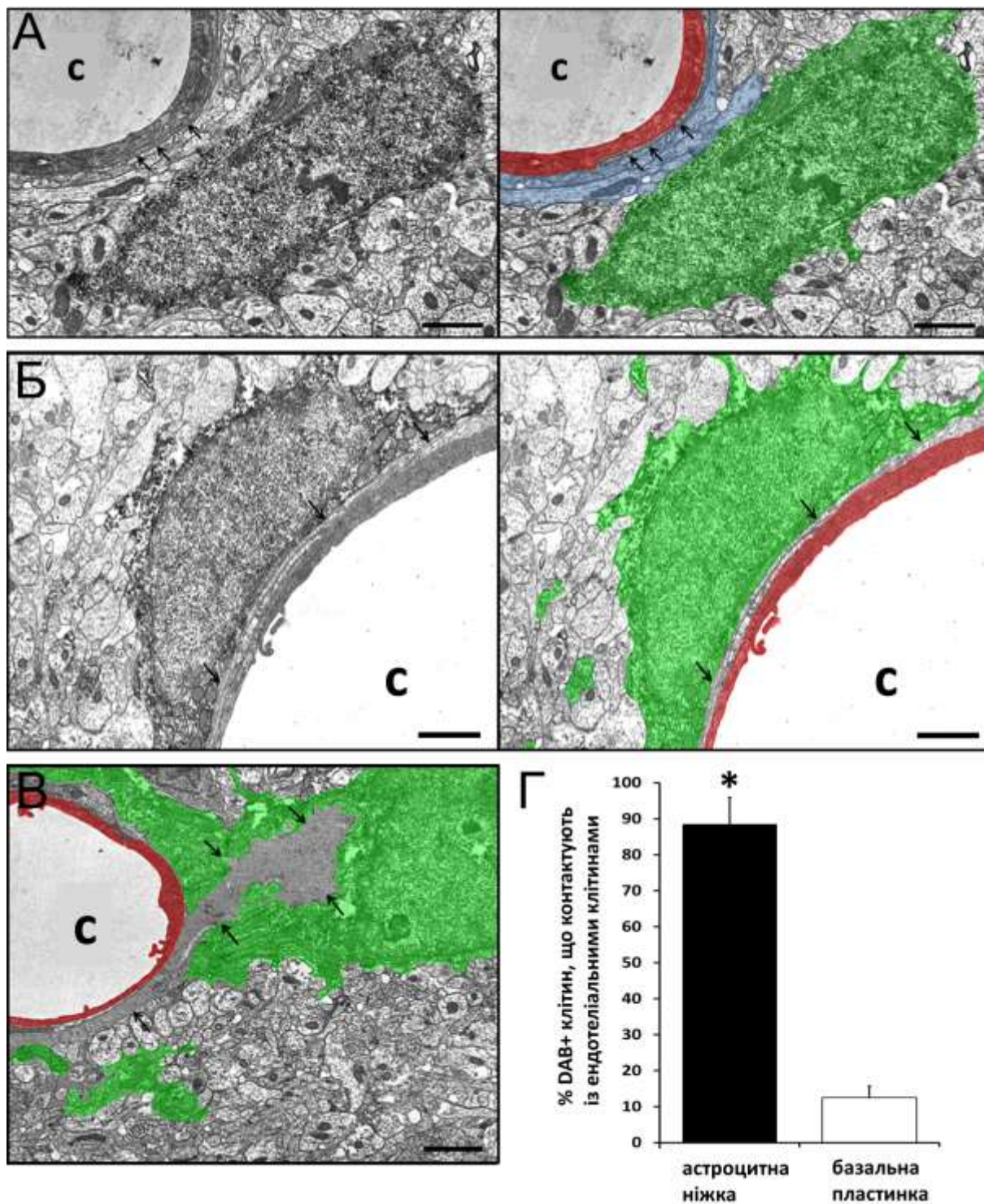


Рис. 6.15. Електронोगрами GFP/DAB-позитивних клітин, що контактують із кровоносними судинами. (А) DAB-позитивна клітина (зелений колір) контактує через астроцитарну ніжку (синій колір) з

ендотеліальними клітинами (червоний колір). (Б) DAB-позитивна клітина контактує з базальною пластинкою. (В) GFP/DAB-позитивна клітина, що контактує з потовщеною базальною пластинкою (стрілки). (Г) Графік, що демонструє відсоток DAB-позитивних клітин, які контактують із ендотеліальними клітинами через астроцитарну ніжку або базальну пластинку (планки похибок вказують на стандартну похибку середнього, * $P < 0,001$, t -тест). Зелений колір – GFP/DAB-позитивна клітина; червоний колір – ендотеліальні клітини; синій колір – астроцитарні ніжки; с – просвіт кровоносної судини; стрілки – базальна пластинка. Шкала = 1 мкм.

Базальна пластинка має характерну електронно-щільну структуру, яку легко візуалізувати на електронограмах [228]. Цікаво відзначити, що 27,85 % судин, які контактували з трансплантованими клітинами ($n = 140$), мали потовщену базальну пластинку, що формувала лабіринтоподібні структури, відомі як фрактони, які характерні для нейроваскулярних ніш (**Рис. 6.15В**) [73].

Отже, отримані дані вказують на те, що трансформація нейральних прогеніторних клітин у напрямку надекспресії FGF-2 може бути корисною стратегією для покращення інтеграції трансплантованих нейральних прогеніторів з судинами реципієнта, утворюючи тим самим проліферативні навколосудинні кластери з нейрогенним потенціалом для відновлення нервової тканини після ішемічного ушкодження мозку.

РОЗДІЛ 7. ТРАНСФОРМАЦІЯ НСК У НАПРЯМКУ НАДЕКСПРЕСІЇ EMMPRIN ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ МІГРАЦІЇ ЦИХ КЛІТИН З СВЗ У ПОШКОДЖЕНІ ДІЛЯНКИ МОЗКУ

У попередніх експериментах ми показали, що трансплантація НПК, трансформованих у напрямку надекспресії FGF-2, у мозок ішемізованих тварин може бути корисною стратегією для покращення інтеграції трансплантованих нейральних прогеніторів з судинами реципієнта, утворюючи тим самим проліферативні навколосудинні кластери з нейрогенним потенціалом для відновлення нервової тканини після ішемічного ушкодження мозку.

Альтернативою трансплантації НПК може бути стимуляція ендогенного нейрогенезу та залучення власних нейральних прогеніторних клітин із субвентрикулярної зони (СВЗ) бокових шлуночків до зони ішемічного ушкодження у соматосенсорній корі. Відомо, що міграція НПК залежить від активності матриксних металопротеїназ (ММП), які деградують білки екстрацелюлярного матриксу (ЕМ).

Тому в наступній серії експериментів ми вирішили перевірити гіпотезу, що надекспресія індуктора екстрацелюлярних матриксних металопротеїназ (EMMPRIN) у ендогенних НПК може посилити міграцію клітин із СВЗ до зони ішемічного ушкодження у соматосенсорній корі.

7.1. Експресія ММП у культурі НПК

Для дослідження ендогенної експресії матриксних металопротеїназ (ММП) у нейральних прогеніторних клітинах було використано первинну культуру НПК, отриману з субвентрикулярної зони бічних шлуночків новонароджених (P0) щурів.

Для аналізу експресії ММП були виділені мРНК з нейральних прогеніторних клітин. За допомогою ПЛР із зворотною транскрипцією було продемонстровано, що серед досліджуваних ММП, було виявлено експресії ММП-2, -9, -10, -11, -13, -14 та -16, тоді як ММП-3 та 7 не були виявлені. Експресії ММП-2 та -10 слабо виявлялися (**Табл. 7.1**).

Таблиця 7.1.

Експресія ММП у культивованих нейральних прогеніторних клітинах.

ММП	Експресія в НПК
ММП-2 (желатиназа А)	+
ММП-3 (стромелізін 1)	—
ММП-7 (матрилізін)	—
ММП-9 (желатиназа В)	+++
ММП-10 (стромелізін 2)	+
ММП-11 (стромелізін 3)	+++
ММП-13 (колагеназа 3)	+++
ММП-14 (MT1-ММП)	+++
ММП-16 (MT3-ММП)	+++
EMMPRIN	+++

Крім того, за допомогою ПЛР із зворотною транскрипцією була показана експресія EMMPRIN у НПК (**Табл. 7.1**).

Разом ці результати вказують на те, що культивовані НПК експресують як мінімум 7 різних ММП та їх фізіологічний індуктор EMMPRIN.

Ми висунули гіпотезу, що надекспресія EMMPRIN у НПК може бути корисною стратегією для підвищення експресії ними ММП. Серед ММП, що експресують НПК, особливо цікаві ММП-2 та ММП-9, які

називають желатиназами, оскільки вони, як було показано раніше, посилюють міграцію НПК у мозку щурів [85]. Крім того, було показано, що желатинази контролюють кілька аспектів організації ЦНС, у тому числі модулюють властивості НСК [294].

Імуногістохімічне дослідження із використанням специфічних антитіл проти EMMPRIN людини показало, що культивовані НПК, трансдуковані EMMPRIN лентивірусним вектором, були EMMPRIN-імунопозитивні, що є підтвердженням того, що лентивірусна трансдукція EMMPRIN-GFP сприяла стійкій експресії EMMPRIN у культурі нейральних прогеніторів (**Рис. 7.1**) [142].

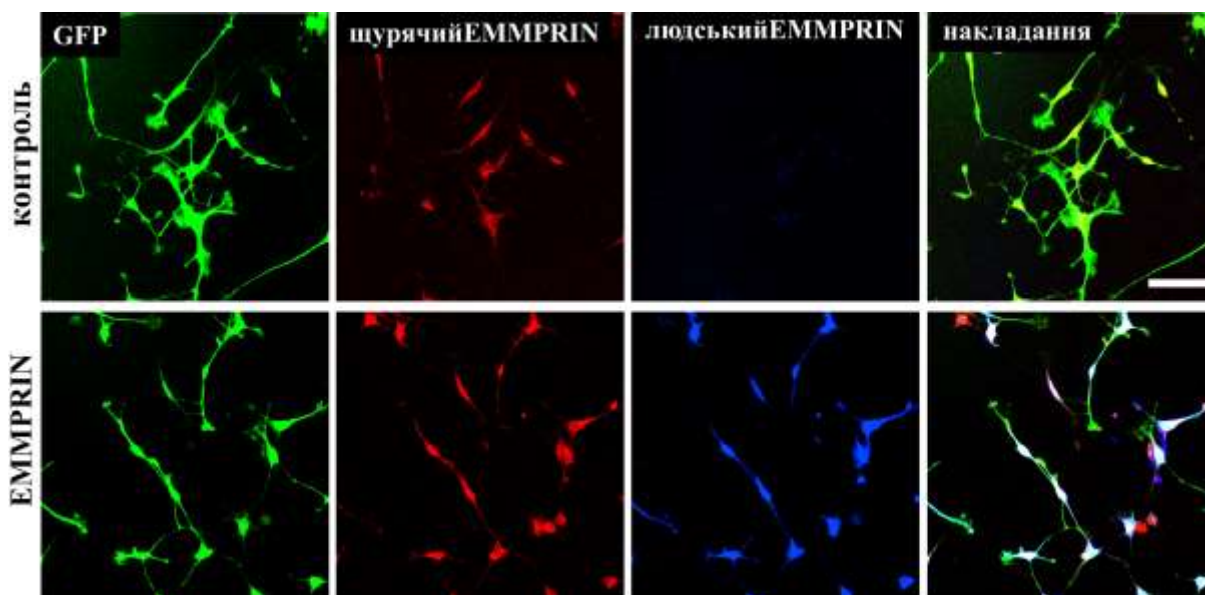


Рис. 7.1. Конфокальні зображення культур нейральних прогеніторних клітин, трансдукованих контрольним або EMMPRIN лентивірусними векторами. GFP – зелений колір, щурячий EMMPRIN – червоний колір, EMMPRIN людини – синій колір. Шкала = 50 мкм.

Наступним етапом було дослідження активності желатиназ у клітинному екстракті та культуральному середовищі контрольних НПК

або НПК, трансформованих у напрямку надекспресії EMMPRIN. За допомогою желатинової зимографії було показано, що ММП-2 виявлялася як в клітинному екстракті, так і в культуральному середовищі; однак ММП-9 у жодному з цих зразків не спостерігалася (**Рис. 7.2А**).

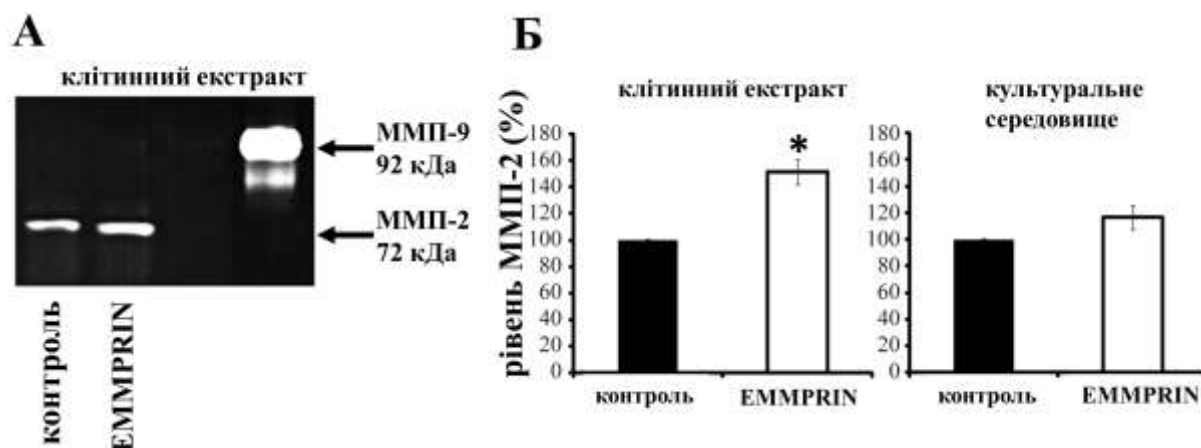


Рис. 7.2. Активність желатиназ у клітинному екстракті та культуральному середовищі контрольних НПК або НПК, трансформованих у напрямку надекспресії EMMPRIN. (А) Репрезентативна фотографія желатинового гелю, в якому виявляли желатиназну активність матриксних металопротеїназ ММП-2 і ММП-9 у екстракті контрольних та EMMPRIN-трансформованих клітин. ММП-2 – на рівні 72 кДа. (Б) Графік, що демонструє кількісне визначення рівнів ММП-2 у клітинному екстракті ($n = 6$; *, $P < 0,05$, t -тест) та культуральному середовищі ($n = 4$).

Крім того, у клітинному лізаті НПК, трансформованих у напрямку надекспресії EMMPRIN, виявилося значно більше про-ММП-2 (72 кДа) (149 ± 11 %, середнє значення \pm sem), ніж у контрольних НПК (100 %) ($P < 0,01$, t -тест) (**Рис. 7.2Б**). Кількість ММП-2 у культуральному середовищі контрольних НПК (100 %) статистично достовірно не

відрізнялося від EMMPRIN-трансформованих (119 ± 12 %, середнє \pm s.e.m.) (**Рис. 7.2Б**) [142].

Ці результати продемонстрували, що, хоча НПК і експресують ендогенний EMMPRIN, надекспресія цими клітинами EMMPRIN людини покращує ферментативну активність ММП-2 у культивованих НПК.

7.2. Вплив надекспресії EMMPRIN на проліферацію та диференціювання НПК

Далі ми перевірили, чи впливає надекспресія EMMPRIN на проліферацію та диференціювання НПК. Для дослідження впливу надекспресії EMMPRIN на проліферацію НПК, на 6 добу культивування у культуру клітин додавали маркер S-фази бромдезоксіуридин (BrdU) за годину до фіксації клітин.

Було виявлено, що рівень проліферації НПК, трансформованих у напрямку надекспресії EMMPRIN ($n=4$ незалежних експерименти, 3994 - загальна кількість порахованих клітин), не відрізнявся від контрольних клітин ($n=3$; 2695) ($31,1 \pm 4,6$ % та $31,1 \pm 3,8$ %, відповідно) (**Рис. 7.3А,Б**) [142].

Для вивчення впливу надекспресії EMMPRIN на диференціювання НПК ми застосували протокол, який стимулює нейронне та гліальне диференціювання [402].

Через 6 днів після початку диференціювання більше 88 % контрольних та більше 95 % EMMPRIN-трансформованих НПК були імунопозитивні на маркер незрілих клітин нестин (**Рис. 7.4 А,Б**).

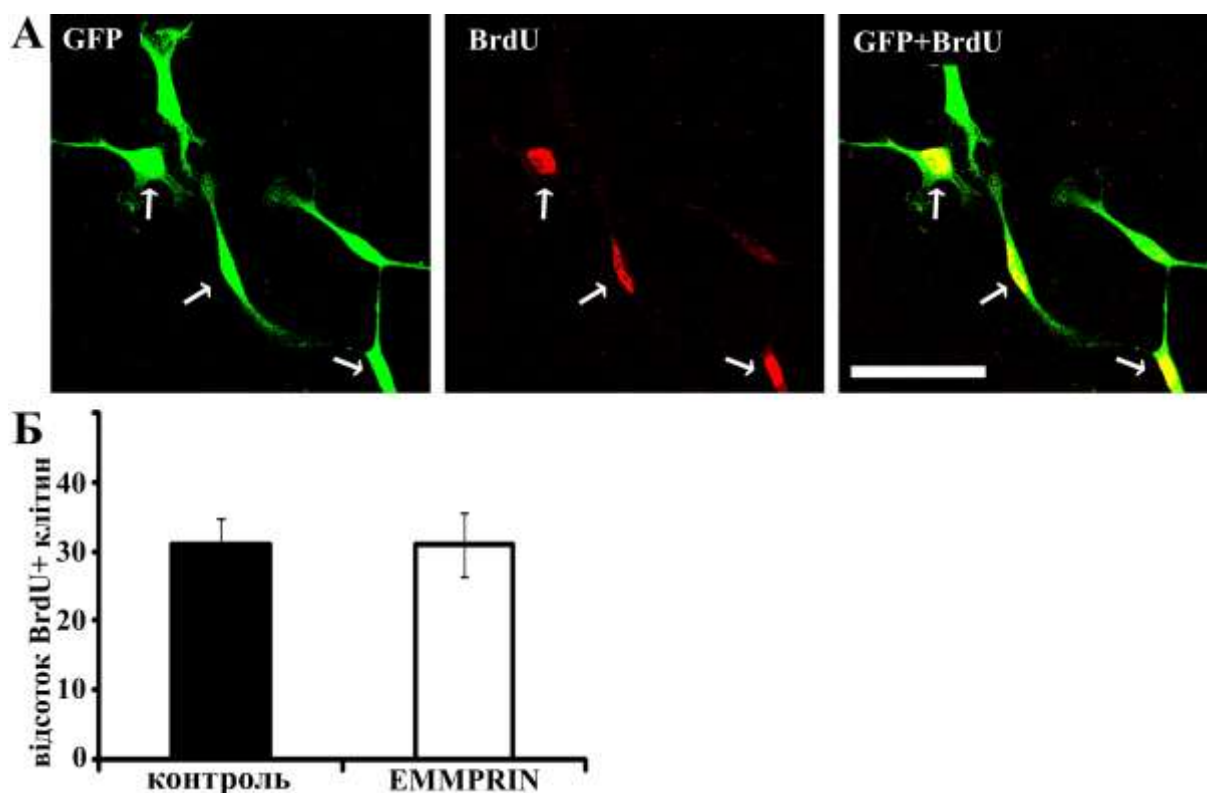


Рис. 7.3. Вплив надекспресії EMMPRIN на проліферацію нейральних прогеніторних клітин. (А) Конфокальні зображення контрольних НПК (зелений колір), імунопозитивних на BrdU (червоний колір). (Б) Графік, що демонструє відсоток BrdU-імунопозитивних контрольних та EMMPRIN-трансформованих клітин. Шкала = 50 мкм.

EMMPRIN-трансформовані НПК демонстрували трохи більшу імунореактивність на GFAP порівняно з контрольними клітинами ($56,6 \pm 0,8$ % та $44,4 \pm 2,6$ %, відповідно, *, $P < 0,05$, t -тест) (Рис. 7.4Б). Лише незначна кількість клітин експресувала маркер попередників олігодендроцитів NG2 та маркер незрілих нейронів DCX в обох умовах (Рис. 7.4А, Б) [142].

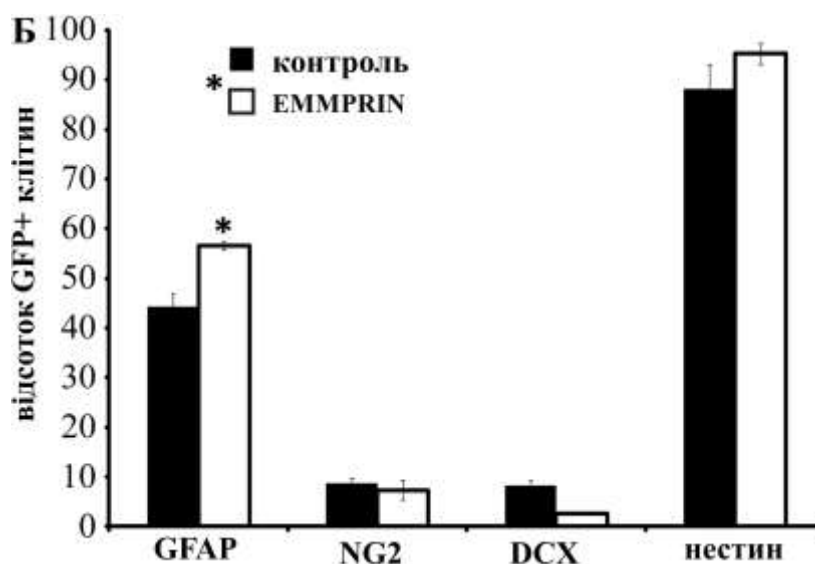
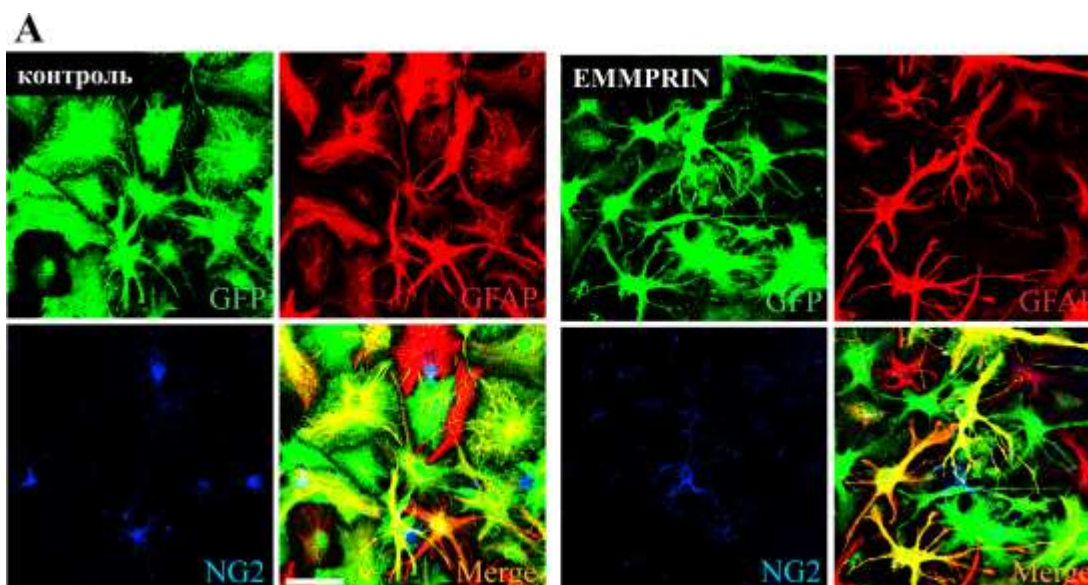


Рис. 7.4. Вплив надекспресії EMMPRIN на диференціювання нейральних прогеніторних клітин. (А) Конфокальні зображення контрольних та EMMPRIN-трансформованих НПК через 6 днів після індукції диференціювання. GFAP-позитивні клітини – червоний колір, NG2-позитивні – синій. (Б) Графік, що демонструє кількість GFAP-, NG2-DCX- та нестин-позитивних клітин (*, $P < 0,05$, t -тест). Шкала = 50 мкм.

Отже, результати цих експериментів указують на те, що трансформація НПК у напрямку надекспресії EMMPRIN не має суттєвого впливу на проліферацію та диференціювання цих клітин.

7.3. EMMPRIN-трансформовані НПК мають підвищену швидкість міграції клітин на колагеновому матриксі *in vitro*

Для дослідження впливу надекспресії EMMPRIN на міграційну поведінку культивованих НПК використовували чашки Петрі, які були вкриті колагеновим матриксом, щоб послабити швидкість міграції НПК і таким чином виявляти навіть тонкі відмінності в швидкості міграції клітин.

Таймлапс (time-lapse) аналіз показав, що надекспресія EMMPRIN значно підвищувала рухливість, а також швидкість міграції НПК на колагеновому матриксі ($2,6 \pm 0,1$ мкм/хв у EMMPRIN-трансформовані НПК та $1,8 \pm 0,2$ мкм/хв - у контрольних, $P < 0,005$, t -тест) (**Рис. 7.5А-В**) [142].

Цікаво, що додавання інгібітору ММП широкого спектру GM6001 зменшувало швидкість міграції як контрольних, так і EMMPRIN-трансформованих клітин: до $1,4 \pm 0,3$ мкм/хв у EMMPRIN-трансформованих НПК ($n = 3$) та $1,0 \pm 0,1$ мкм/хв - у контрольних ($n = 3$), $P < 0,005$, t -тест (**Рис. 7.5В**).

Аналіз пройденої відстані підтвердив, що клітини, які надекспресують EMMPRIN, мігрували далі, ніж контрольні клітини як у нормальних умовах, так і в умовах додавання GM6001 (**Рис. 7.5Г**).

Варто зазначити, що GM6001 приблизно однаково зменшував швидкість міграції як EMMPRIN-трансформованих НПК, так і контрольних клітин. Тим не менше, швидкість міграції залишалася більшою у EMMPRIN-трансформованих клітин порівняно з контролем.

Одним із можливих пояснень цього явища може бути те, що ефект інгібітору ММП (GM6001) залежить від дози, і через високі рівні

ММП у клітинах, що надекспресують EMMPRIN, інгібітор не може належним чином заблокувати ММП.

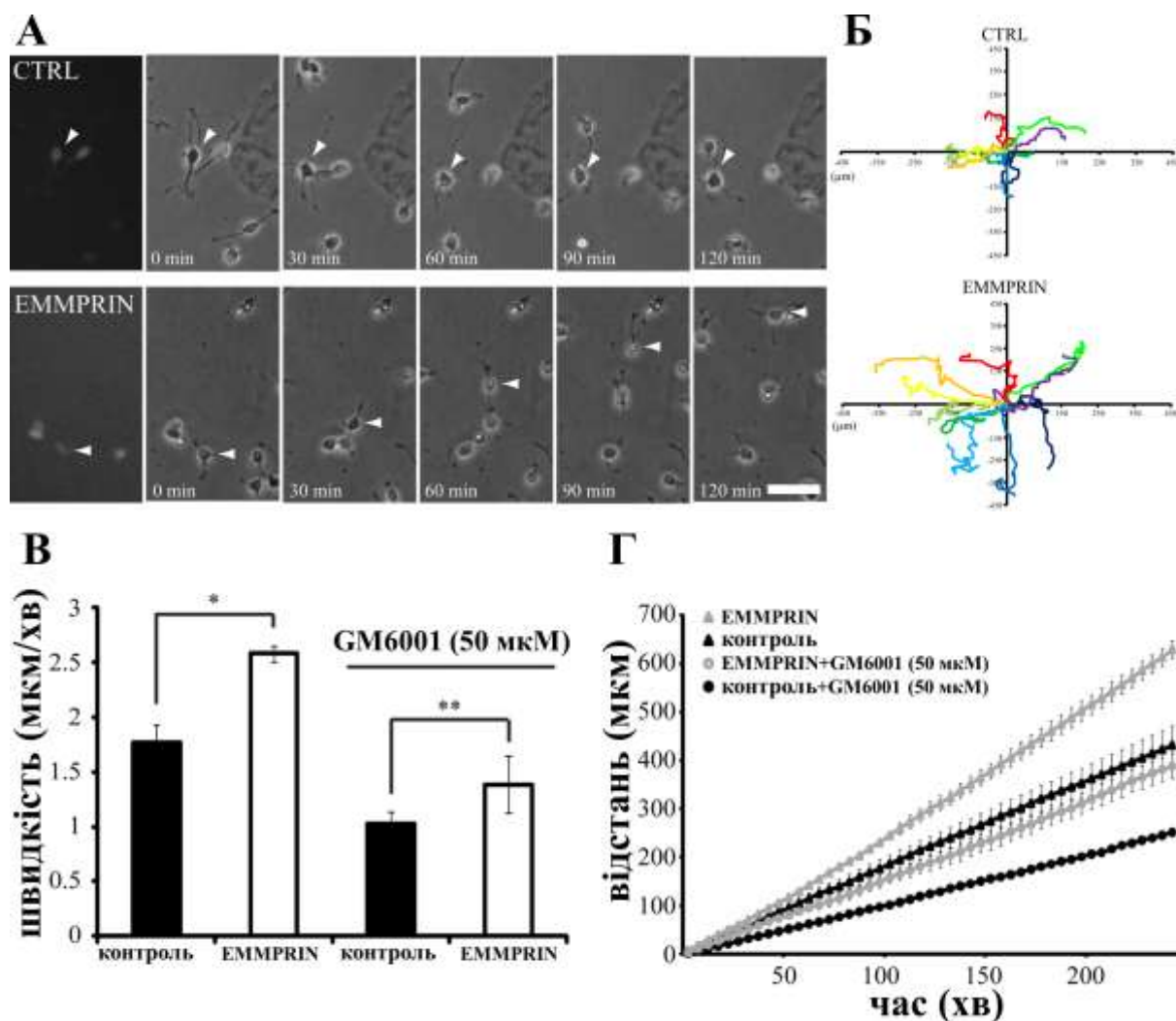


Рис. 7.5. ЕММРІН-трансформовані НПК мають підвищену швидкість міграції на колагеновому матриксі *in vitro*. (А) Таймлапс аналіз міграції контрольних та ЕММРІН-трансформованих НПК на колагеновому матриксі. (Б) Репрезентативні міграційні шляхи контрольних та ЕММРІН-трансформованих НПК (показано по 10 випадкових клітин). (В) Графік, що демонструє збільшення середньої швидкості ЕММРІН-трансформованих НПК порівняно із контрольними клітинами (*, $P < 0,005$, *t*-тест). Навіть при додаванні ГМ6001 швидкість ЕММРІН-

*трансформованих НПК лишалася вищою, ніж у контрольних клітин (**, $P < 0,001$, t -тест). (Г) Графік, що зображує прогресивне збільшення пройденої відстані контрольними та EMMPRIN-трансформованими НПК на колагеновому матриксі з та без додавання GM6001 (*, $P < 0,01$ **, $P < 0,05$, t -тест). Шкала = 50 мкм.*

Отже, надекспресія EMMPRIN покращує міграційний потенціал і швидкість НПК у культурі, і цей ефект може залежати від ММП.

7.4. EMMPRIN покращує інвазивні здібності НПК у 3D матричних системах

Для подальшого дослідження впливу надекспресії EMMPRIN на міграційну поведінку нейральних прогеніторів, було проаналізовано моторику НПК у 3D матричних системах.

Під час міграції клітин у тканині екстрацелюлярний матрикс (ЕМ) діє одночасно і як опора, і як фізичний бар'єр, який перешкоджає міграції [139]. У таких умовах клітини використовують ММП для деградації ЕМ бар'єру, який утворюється з різних молекул, таких як колаген та ламінін. ММП-2 деградує низку ЕМ макромолекул, у тому числі желатин, колаген та ламінін [137].

Для того, щоб дослідити, чи EMMPRIN-трансформовані НПК матимуть підвищену інвазивну здатність, спочатку було використано 3D колагеновий гель. Розташування клітини у 3D колагеновому гелі аналізували за допомогою конфокального мікроскопа у режимі серії «оптичних» зрізів за віссю z кожні 10 мкм від поверхні колагенового гелю. Конфокально-мікроскопічний аналіз показав, що EMMPRIN-трансформовані НПК мігрували глибше в 3D-колагеновому гелі ніж контрольні НПК і ($n=4$, $P < 0,01$, критерій χ^2 -квадрат) (**Рис. 7.6А, Б**) [142].

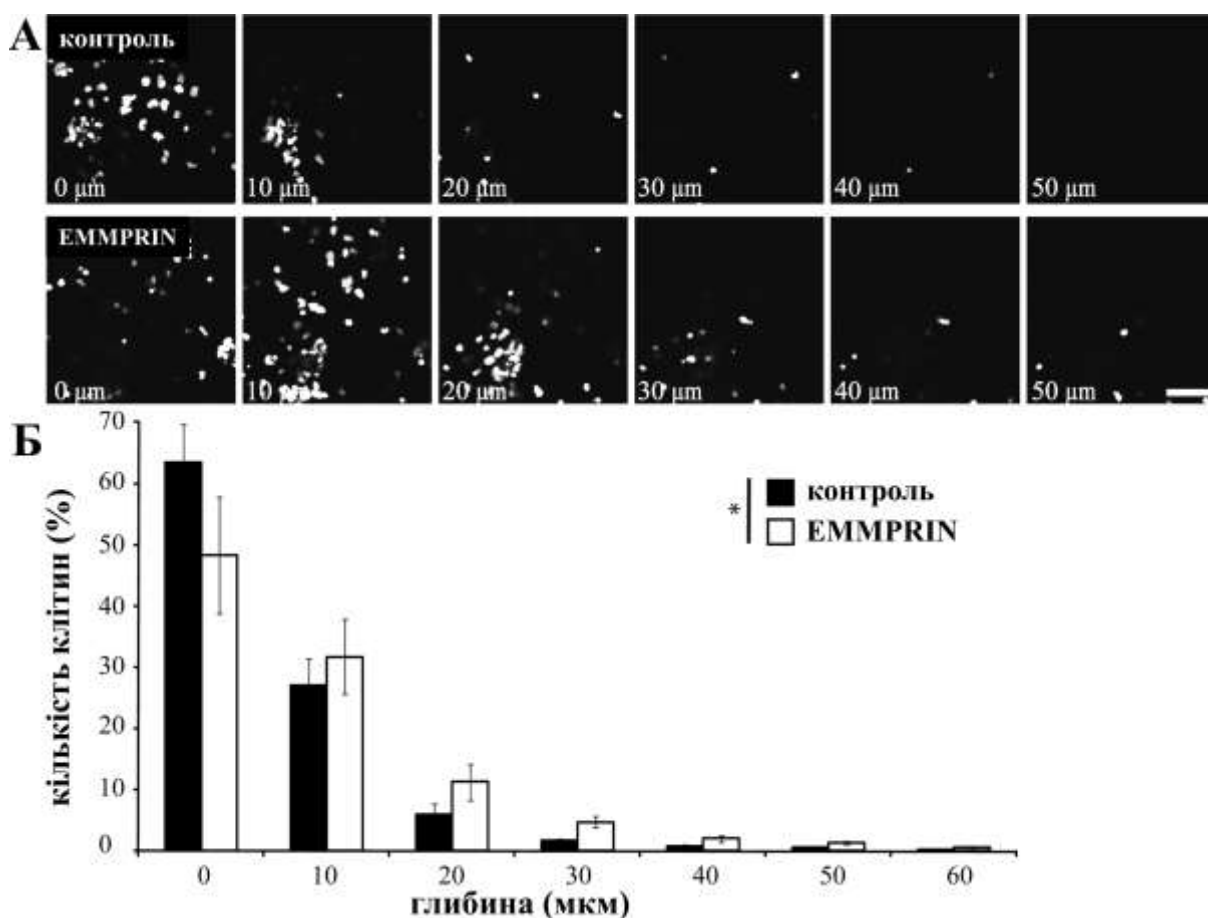


Рис. 7.6. Інвазивні здібності НПК у 3D колагеновому гелі. (А) Конфокальні зображення, отримані у режимі серії «оптичних» зрізів за віссю z кожні 10 мкм від поверхні колагенового гелю. Ядра EMMPRIN-трансформованих та контрольних НПК пофарбовані Hoechst 33342. (Б) Графік, що демонструє кількісне порівняння розподілу EMMPRIN-трансформованих та контрольних НПК у колагеновому гелі. ($n = 4$, $p < 0,01$, критерій χ^2 -квадрат). Шкала = 50 мкм.

Наші результати показали, що трансдукція нейральних прогеніторних клітин EMMPRIN сприяє більш ефективній інвазії в колагеновому гелі.

Ключове питання – чи може надекспресія EMMPRIN впливати на інвазивні здібності НПК у більш складному середовищі, такому як нервова тканина?

Для дослідження міграційного потенціалу НПК у тканині, EMMPRIN-трансформовані та контрольні клітини були нанесені на поверхні зрізів головного мозку щура.

Глибину міграції клітин аналізували за допомогою конфокального мікроскопа у режимі серії «оптичних» зрізів за віссю z кожні 10 мкм від поверхні зрізу головного мозку. Конфокально-мікроскопічний аналіз показав, що показав, що НПК, які надекспресували EMMPRIN, глибше мігрували в тканину зрізів головного мозку порівняно з контрольними НПК (**Рис. 7.7А**).

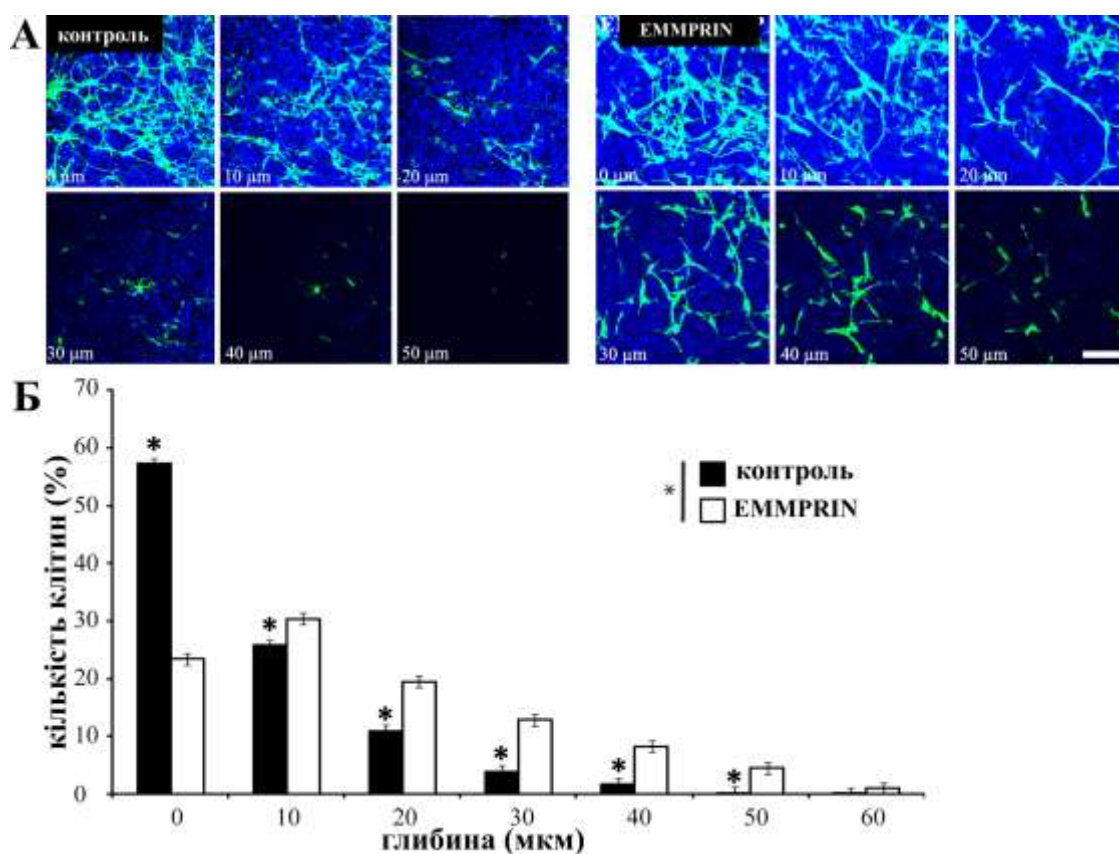


Рис. 7.7. Інвазивні здібності НПК в органотипових зрізах головного мозку. (А) Конфокальні зображення, отримані у режимі серії

*«оптичних» зрізів за віссю z кожні 10 мкм від поверхні зрізу головного мозку (0 мкм) до глибини 50 мкм. Клітини візуалізовані імуногістохімічним фарбуванням з використанням антитіл проти GFP (зелений колір). Ядра EMMPRIN-трансформованих та контрольних НПК пофарбовані Hoechst 33342 (синій колір). (Б) Графік, що демонструє кількісне порівняння розподілу EMMPRIN-трансформованих та контрольних НПК у органотипових зрізах головного мозку ($n = 3$, *, $P < 0,001$, критерій хі-квадрат). Шкала = 100 мкм.*

Кількісний аналіз підтвердив, що EMMPRIN-трансформовані НПК були знайдені у більш глибоких шарах, ніж контрольні НПК ($n = 3$, *, $P < 0,001$, критерій хі-квадрат) (**Рис. 7.7Б**) [142].

Отже, наші результати показують, що надекспресія EMMPRIN збільшує інвазивні властивості НПК у колагеновому гелі, а також у органотипових зрізах головного мозку.

7.5. Надекспресія EMMPRIN покращує міграцію НПК з СВЗ до пошкодженої ділянки соматосенсорної кори

У мозку гризунів ішемічне ушкодження може індукувати збільшення проліферації ендogenous НПК у субвентрикулярній зоні, а деякі СВЗ-похідні нейробласти та гліальні клітини можуть мігрувати до зони ішемічного ушкодження [285].

Для того, щоб перевірити гіпотезу, що надекспресія EMMPRIN може посилити міграцію клітин з СВЗ до зони ішемічного ушкодження у соматосенсорній корі, спершу було проведено подвійне імуногістохімічні фарбування зрізів головного мозку новонароджених (P0) щурів для аналізу експресії EMMPRIN. Було встановлено, що кровоносні судини (нестин-

або RECA-1-імунопозитивні) в субвентрикулярній зоні бокових шлуночків експресували EMMPRIN (**Рис. 7.8**) [142].

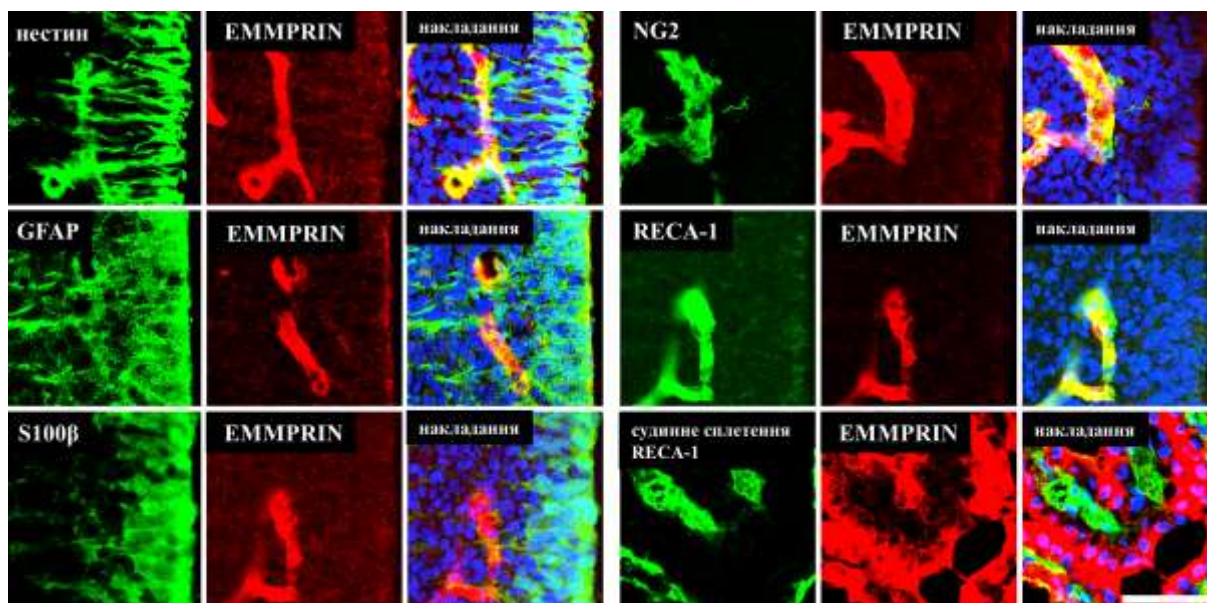


Рис. 7.8. Експресія EMMPRIN ендотеліальними клітинами у субвентрикулярній зоні. Нестин експресувався клітинами радіальної глії та ендотеліальними клітинами. Більшість ендотеліальних клітин (нестин- та RECA-1-імунопозитивних) були імунопозитивними на щурячий EMMPRIN (червоний колір). Ядра клітин контрастовані Hoechst 33342 (синій колір). NG2-позитивні перицити покривали ендотеліальні клітини. У судинному сплетінні ендотеліальні клітини не експресували EMMPRIN. Шкала = 50 мкм.

Цікаво відзначити, що кровоносні судини в судинному сплетенні були імунонегативними на щурячий EMMPRIN (**Рис. 7.8**).

Кровоносні судини також експресували EMMPRIN в соматосенсорній корі як контрольних тварин, так щурів після ішемічного ушкодження мозку (**Рис. 7.9**) [142].

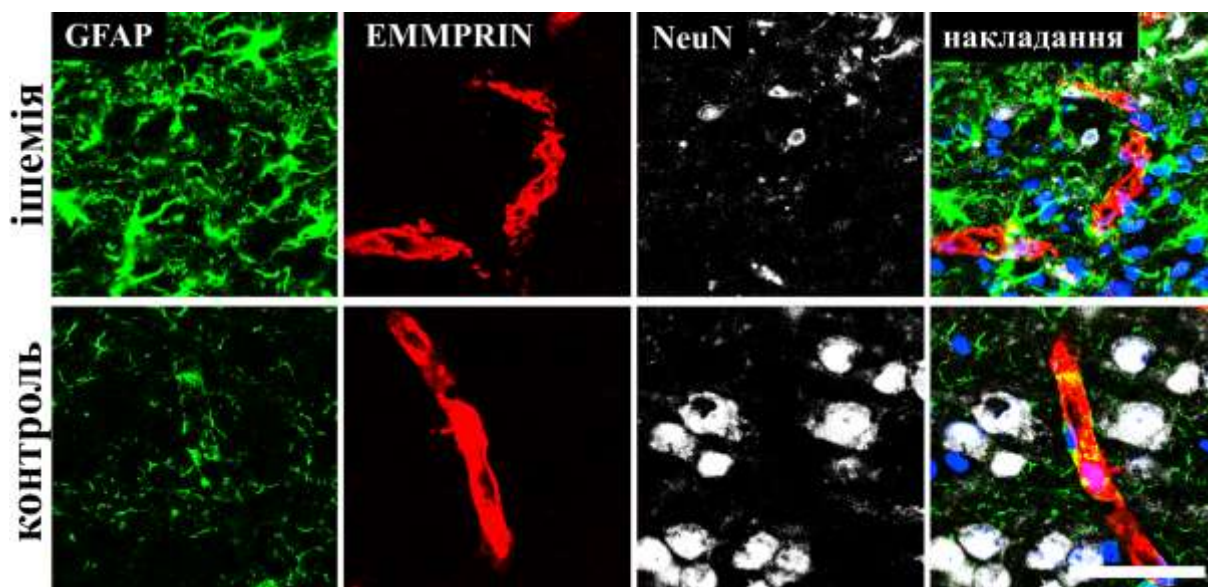


Рис. 7.9. Конфокальні зображення, що демонструють експресію EMMPRIN (червоний колір) у ішемізованій та контрольній соматосенсорній корі. GFAP-позитивні астроцити – зелений колір, NeuN-позитивні нейрони – білий. Ядра клітин контрастовані Hoechst 33342 (синій колір). Шкала = 50 мкм.

Наступним етапом була перевірка гіпотези, що надекспресія EMMPRIN може посилити міграцію клітин з CB3 до зони ішемічного ушкодження у соматосенсорній корі. З цією метою новонародженим щурам (P0) стереотаксично вводили у боковий шлуночок суміш EMMPRIN-Tom та CTRL-GFP лентивірусні вектори (**Рис. 7.10А, Б**) [142].

На цьому добу постнатального розвитку (P7) у щурів моделювали гіпоксично-ішемічне ушкодження головного мозку. Для дослідження міграційного потенціалу НПК із CB3 у зону ішемічного ушкодження, головний мозок експериментальних тварин фіксували на 3 добу після гіпоксично-ішемічного пошкодження.

Імуногістохімічне фарбування з використанням антитіл проти Tom та GFP виявило три популяції клітин у CB3: контрольні клітини

(тільки GFP) та дві популяції з надекспресією EMMPRIN – лише Том або Том/GFP подвійно позитивні клітини.

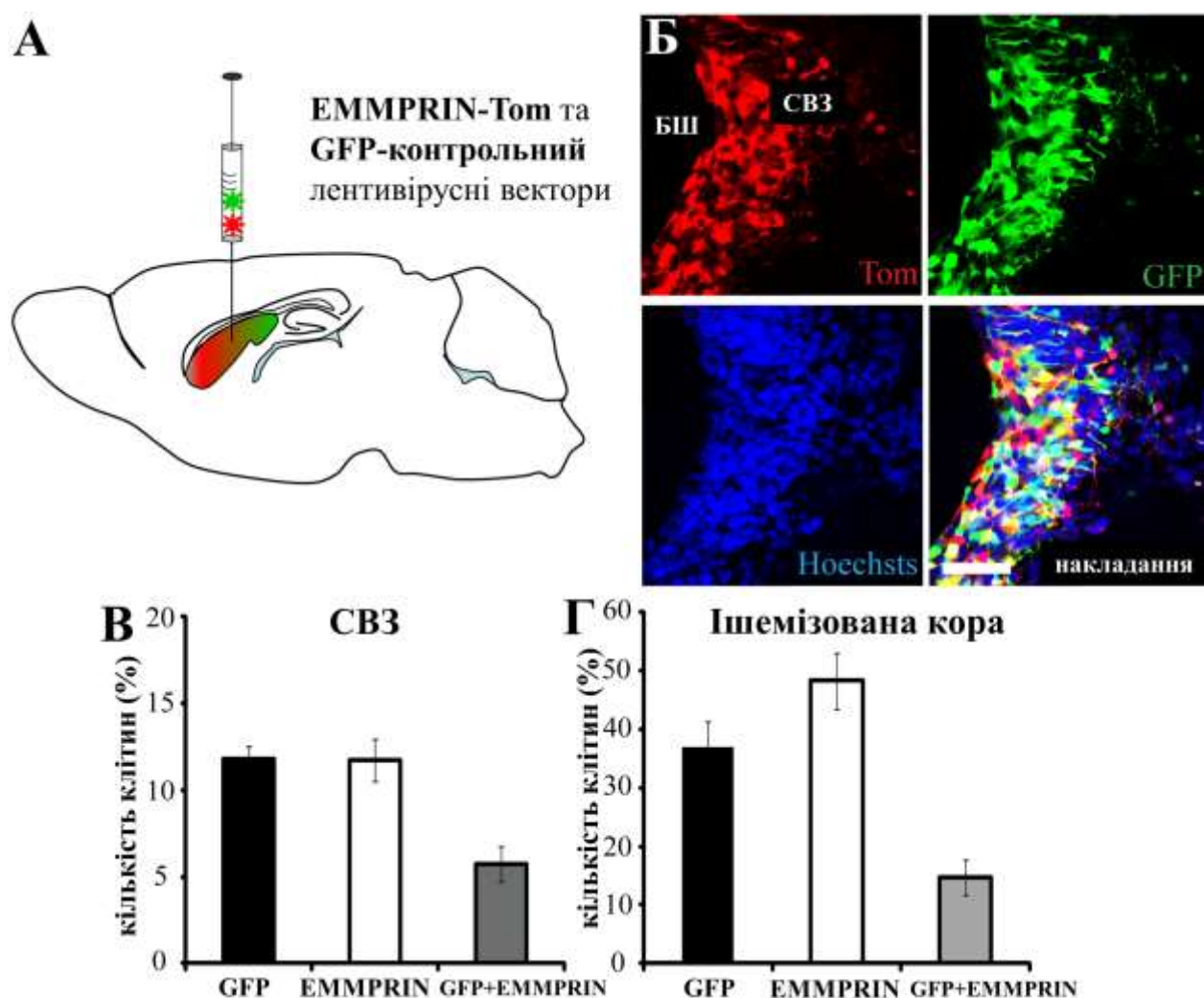


Рис. 7.10. Ін'єкція EMMPRIN-Том та GFP-контрольного лентивірусних векторів у боковий шлуночок. (А) Схематичне зображення експерименту. Суміш лентивірусних векторів вводили стереотаксично в боковий шлуночок. Трансдуковані клітини субвентрикулярної зони бокових шлуночків експресували GFP, EMMPRIN-Том або GFP та EMMPRIN-Том. (Б) Конфокальні зображення субвентрикулярної зони бокових шлуночків після 10 днів лентивірусної векторної ін'єкції. Ядра клітин контрастовані

Hoehchst 33342 (синій колір). (В) Графік, що демонструє кількісне визначення клітин, трансдукованих GFP-контрольним, EMMPRIN-Tom або обома лентивірусними векторами (GFP+EMMPRIN) у субвентрикулярній зоні. (Г) Графік, що демонструє відсоток контрольних GFP-позитивних, EMMPRIN-Tom-позитивних або GFP+EMMPRIN-Tom-позитивних клітин, які мігрували в ішемізовану кору. Скорочення: БШ – боковий шлуночок; СВЗ – субвентрикулярна зона. Шкала = 50 мкм.

Імуногістохімічне фарбування зрізів мозку щура із використанням антитіл проти EMMPRIN людини підтвердило, що лише Tom-позитивні клітини експресували EMMPRIN людини (**Рис. 7.11А**) [142].

Крім субвентрикулярної зони значна кількість мічених клітин також була виявлена в ішемізованій соматосенсорній корі. Імуногістохімічне дослідження показало, що більш ніж 60 % популяції клітин, які були виявлені в пошкодженій корі, були трансдуковані як EMMPRIN-Tom так і GFP-контрольним лентивірусними векторами (**Рис. 7.10Г**).

Слід зазначити, що EMMPRIN-трансформовані НПК мігрували із субвентрикулярної зони бокових шлуночків значно далі у зону ішемізованої кори порівняно з контрольними (трансдукованими лише GFP) (**Рис. 7.11Б, В**).

На відстані до 200 мкм від СВЗ було виявлено більше GFP-позитивних контрольних клітин у порівнянні з EMMPRIN-позитивними клітинами (**Рис. 7.11Б, В**).

З іншого боку, більше EMMPRIN-позитивних клітини порівняно із контрольними було візуалізовано у пошкодженій корі на відстані 1000 мкм та більше від СВЗ (*, $P < 0.001$, критерій хі-квадрат, $n = 7$, було

підраховано 1110 клітин GFP- та 2018 EMMPRIN-Tom-позитивних клітин)
(Рис. 7.11Б, В) [142].

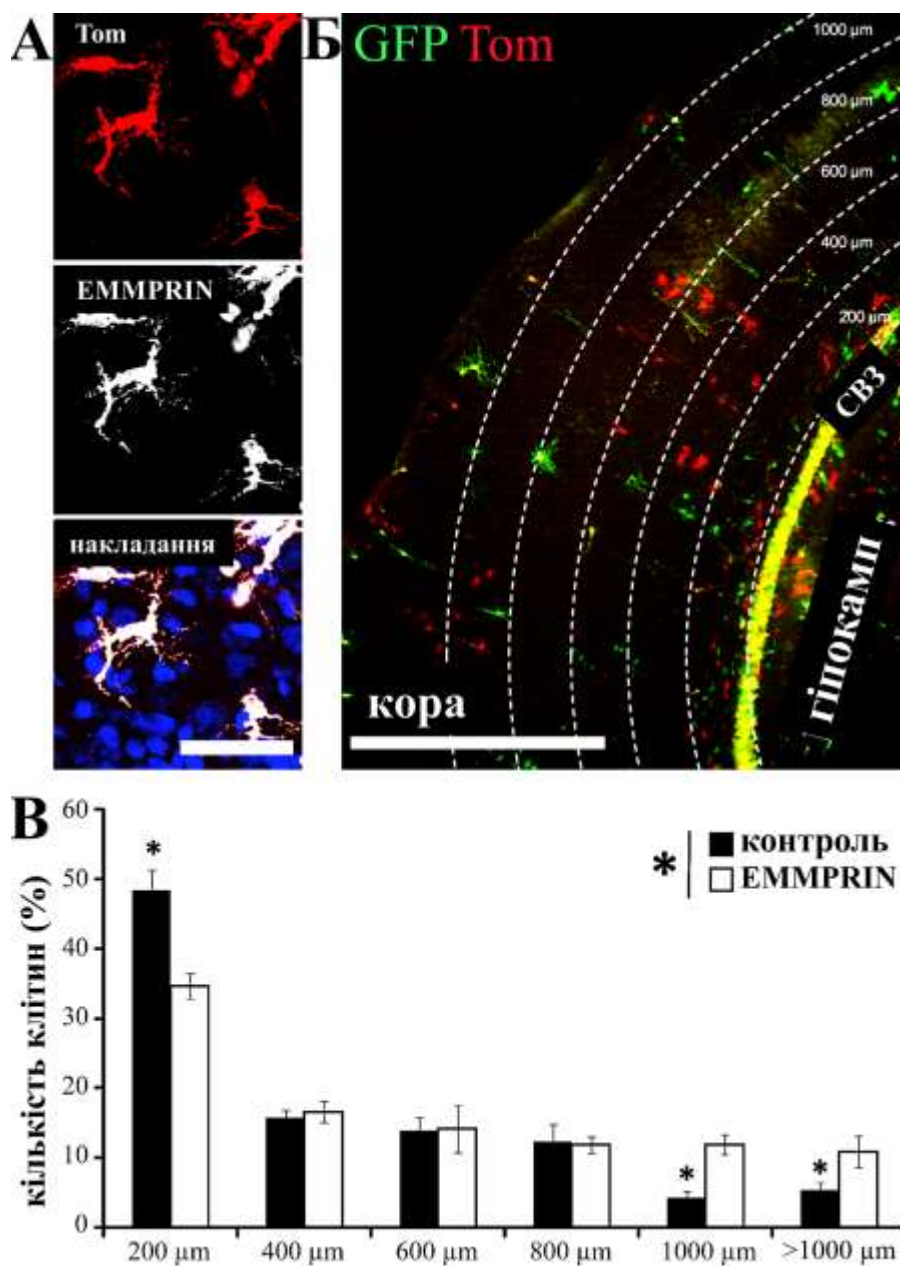


Рис. 7.11. Міграція GFP-контрольних та EMMPRIN-трансформованих клітин у соматосенсорній корі щура. (А) Конфокальні зображення EMMPRIN-трансформованих клітин (червоний колір) у пошкодженій корі, які були імунопозитивними на EMMPRIN людини (білий колір). (Б) Епіфлюоресцентне зображення фронтального зрізу мозку щура

на 10 постнатальну добу (P10). EMMPRIN-Tom (червоний колір) і GFP-контрольний (зелений колір). (В) Графік, що демонструє відсоток GFP-або Tom-імунопозитивних клітин у корі. (*, $P < 0,001$, критерій хі-квадрат). Шкала: A = 50 мкм, B = 1 мм.

Наші результати дозволяють припустити, що на 3 добу після гіпоксично-ішемічного ушкодження головного мозку клітини субвентрикулярної зони, які були трансдуковані EMMPRIN, здатні мігрувати далі в ішемічну кору, ніж контрольні клітини.

Крім того, за допомогою імуногістохімії було проведено фенотипування клітин СВЗ, які мігрували в пошкоджену кору. Серед контрольних GFP-позитивних клітин, які мігрували в ішемічну кору, $10,3 \pm 4,5$ % були імунопозитивними на NG2, маркер попередників олігодендроцитів, у порівнянні з $20,8 \pm 4,8$ % EMMPRIN-імунопозитивних (Рис. 7.12А) [142].

Цікаво, що більшість EMMPRIN-позитивних клітин також були позитивними на GFAP (EMMPRIN порівняно із контролем: $36 \pm 6,2$ % та $14,1 \pm 7,8$ % відповідно) (Рис. 7.12А).

Практично не виявлялися EMMPRIN- або GFP-позитивні контрольні клітини, які б були позитивними на маркер незрілих нейронів DCX.

Виявлено, що більшість контрольних GFP-позитивних та EMMPRIN-позитивних клітин у пошкодженій корі експресували SOX2, маркер НПК (контроль та EMMPRIN: $66,0 \pm 5,4$ % та $69 \pm 2,9$ %, відповідно) (Рис. 7.12А,Б).

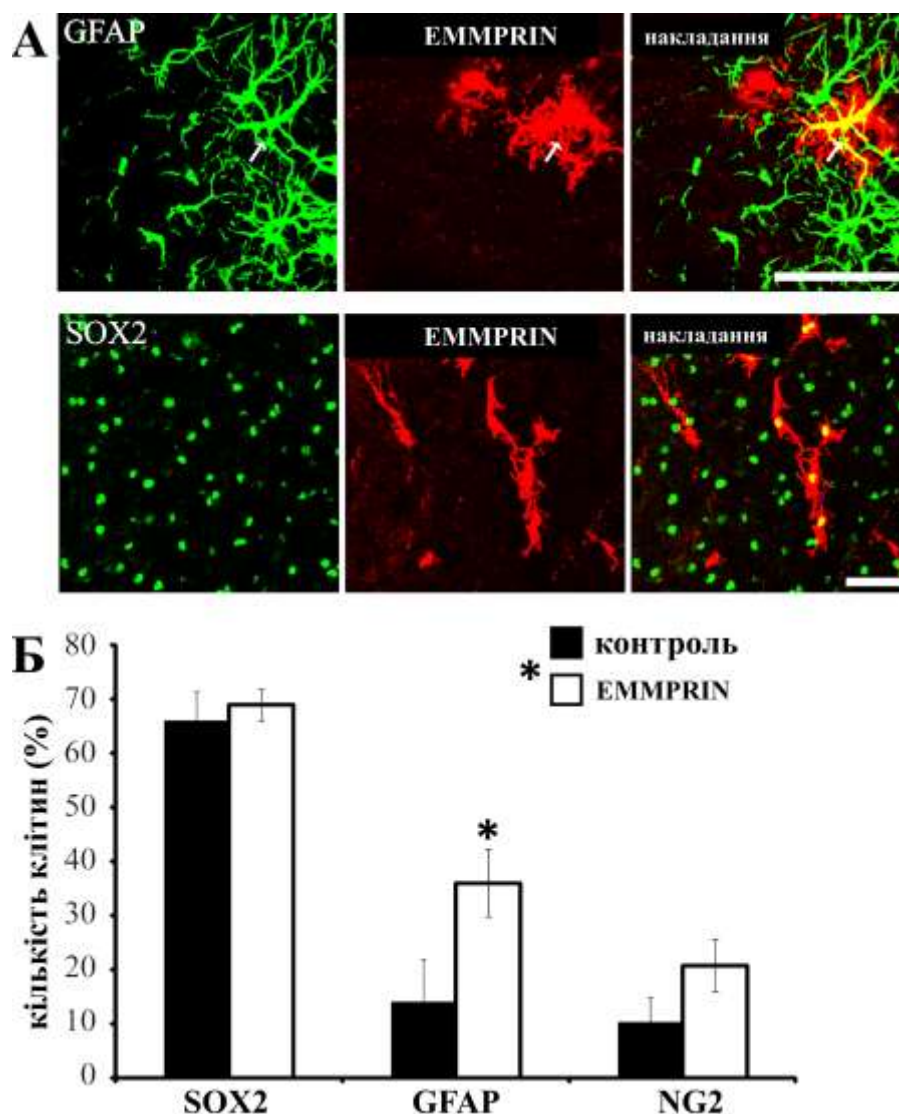


Рис. 7.12. Фенотипування клітин, які мігрували в пошкоджену соматосенсорну кору. (А) Конфокальні зображення ЕММРІН-трансформованих клітин (червоний колір), які були імунопозитивні на GFAP (зелений колір на верхній панелі) або SOX2 (зелений колір на нижній панелі). (Б) Графік, що демонструє кількість SOX2-, GFAP- або NG2-імунопозитивних клітин серед контрольних та ЕММРІН-трансформованих клітин. Шкала = 50 мкм.

Таким чином, наші результати свідчать про те, що НПК, які надекспресують ЕММРІН, мігрують далі у пошкоджену соматосенсорну кору порівняно із контрольними НПК та утворюють популяцію нейральних прогеніторів у пошкодженій ділянці кори.

РОЗДІЛ 8. ІНТЕГРАЦІЯ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ НПК, УТВОРЕНИХ З ІПСК ЛЮДИНИ, У МОЗОК ЩУРА ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ МОЗКУ

У попередніх експериментах для введення донорських клітин у мозок реципієнта після ішемічного ушкодження ми використовували ксено-, ало- та сингенну трансплантації. Але найбільш привабливою й перспективною серед різних видів трансплантації є аутологічна завдяки доступності застосування аутологічних клітин пацієнта, мінімальному ризику відторгнення трансплантату та безпеці її застосування.

Перспективним джерелом донорського матеріалу при аутологічній трансплантації є індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК).

іПСК мають майже всі властивості ембріональних стовбурових клітин, але походять не з ембріона, а із соматичних клітин дорослої людини. Це означає, що іПСК можуть бути повернуті пацієнтові без ризику імунного відторгнення.

Також, практичне застосування іПСК не породжує етичних проблем, які зазвичай пов'язані з використанням ембріональних стовбурових клітин.

Тому в наступній серії експериментів ми використовували фібробласти шкіри людини для отримання з них іПСК з подальшим диференціюванням цих клітин у нейральному напрямку та досліджували можливість використання НПК, отриманих із іПСК людини, для стереотаксичної трансплантації у мозок щура після ішемічного ушкодження головного мозку.

8.1. Нейрони реципієнта формують аферентні синаптичні контакти з трансплантованими клітинами, утвореними з іПСК людини

За допомогою імуно-електронно-мікроскопічного аналізу досліджували можливість формування синаптичних контактів між донорськими нейронами, утвореними з іПСК людини, і нейронами реципієнта після ішемічного ушкодження головного мозку щура.

У щурів викликали оклюзію середньої мозкової артерії і через 48 годин трансплантували GFP-позитивні нейральні прогенітори в соматосенсорну кору головного мозку поруч із зоною ураження [296].

Через 6 місяців після трансплантації виконували імуно-електронно-мікроскопічний аналіз фронтальних зрізів соматосенсорної кори з використанням антитіл проти GFP для ідентифікації трансплантованих клітин.

GFP-позитивні донорські клітини легко було візуалізувати на електронограмах через інтенсивно-чорне електронно-щільне забарвлення цитоплазми і відростків у наслідок діамінобезидинової (DAB) реакції (**Рис. 8.1**). Ядро та мітохондрії у таких DAB-позитивних клітинах були DAB-негативними (**Рис. 8.1**) [295].

Більшість трансплантованих GFP-позитивних клітин мали ультраструктурні характеристики зрілих нейронів: округле еухроматинове ядро з ядерцем і цитоплазму, багату на мітохондрії, гранулярний ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі та велику кількість вільних рибосом (**Рис. 8.1**).

Крім того, ми спостерігали невеличку популяцію GFP+ астроцитів із пучками проміжних філаментів і гранулами глікогену.

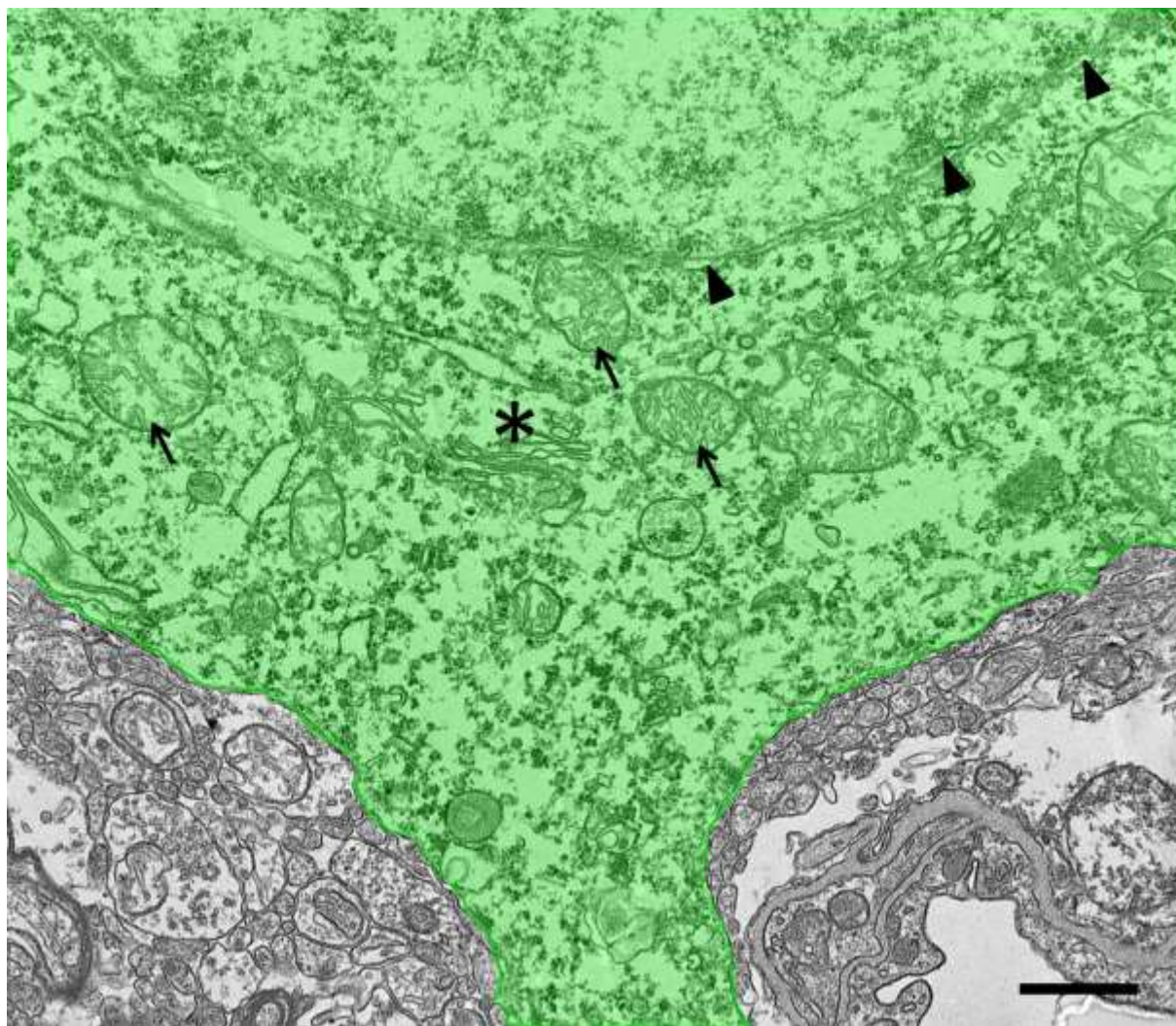


Рис. 8.1. Електронограма GFP/DAB-позитивного нейрона. GFP/DAB-позитивна трансплантована клітина (зелений колір) має ультраструктурні характеристики зрілого нейрона: округле еухроматинове ядро (позначене трикутниками) з ядерцем; цитоплазма, багата на мітохондрії (позначені стрілками), гранулярний ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі (позначений зірочкою) та велика кількість вільних рибосом. Шкала = 0,5 мкм.

GFP-негативні аксонні термінали утворювали синаптичні контакти на більшості GFP-позитивних донорських нейронах. Такі контакти мали всі ультраструктурні критерії хімічного синапсу: кластеризацію синаптичних везикул, розташованих близько до

пресинаптичної мембрани, синаптичну щілину та постсинаптичну мембрану з постсинаптичною щільністю (**Рис. 8.2А**) [295].

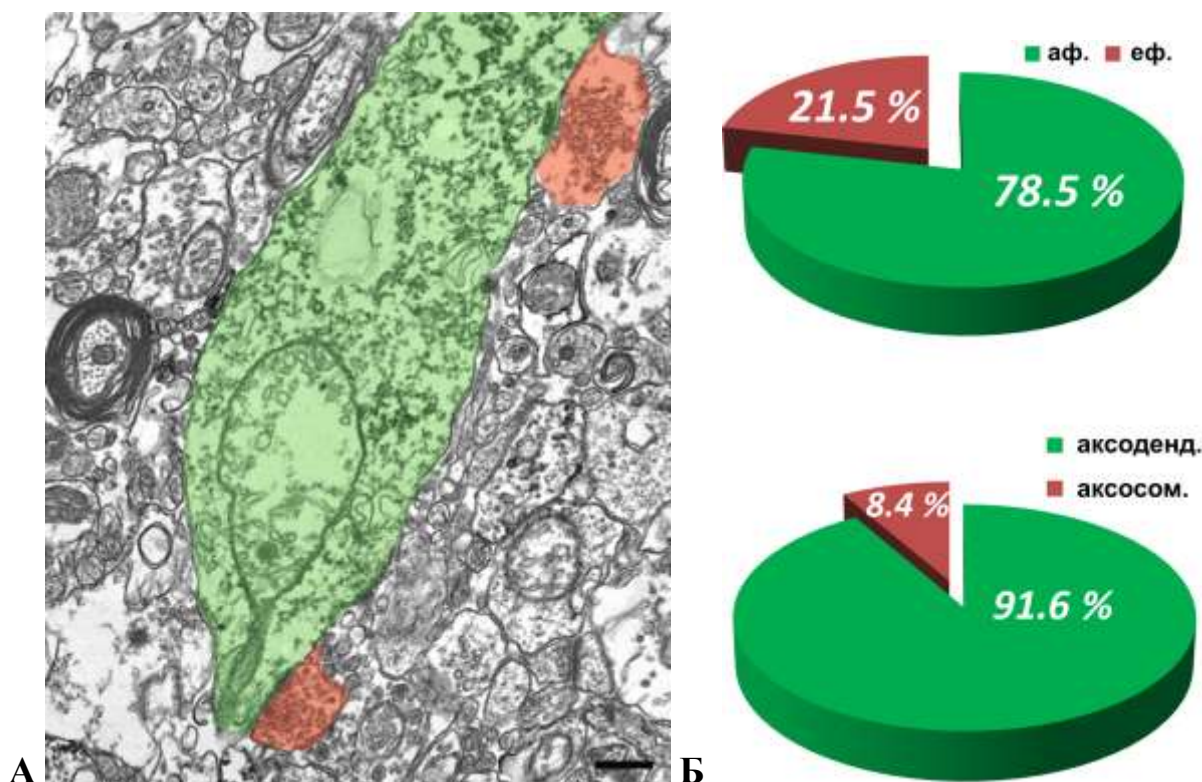


Рис. 8.2. (А) Аксонні термінали реципієнта (відмічені червоним кольором) встановлювали аферентні синаптичні контакти з донорськими GFP/DAB-позитивними нейронами (зелений колір). (Б) Гістограми співвідношення GFP/DAB-позитивних синаптичних контактів: аферентні (аф.) проти еферентних (еф.) та аксодендритні (аксоденд.) проти аксосомальних (аксосом.) контактів. Шкала = 0,2 мкм.

Ультраструктурні характеристики цих синаптичних контактів не відрізнялися від синапсів соматосенсорної кори реципієнта. Ми класифікували синаптичні контакти між донорськими клітинами і нейронами реципієнта залежно від типу синаптичної спеціалізації (асиметричні, симетричні) та постсинаптичного елемента (сома, дендритний стовбур, шипик). Загалом було проаналізовано 204 мічених

синапси. Аферентні входи від нейронів реципієнта переважали (78,5 %) над еферентними виходами (21,5 %) (**Рис. 8.2Б**). Абсолютна більшість (91,6 %) аферентних контактів були аксодендритними і лише 8,4 % були аксосоматичними (**Рис. 8.2А-Б**). Серед аксодендритних синаптичних контактів 84,7 % аксонних терміналей контактували з GFP+ дендритними шипиками (**Рис. 8.3**).

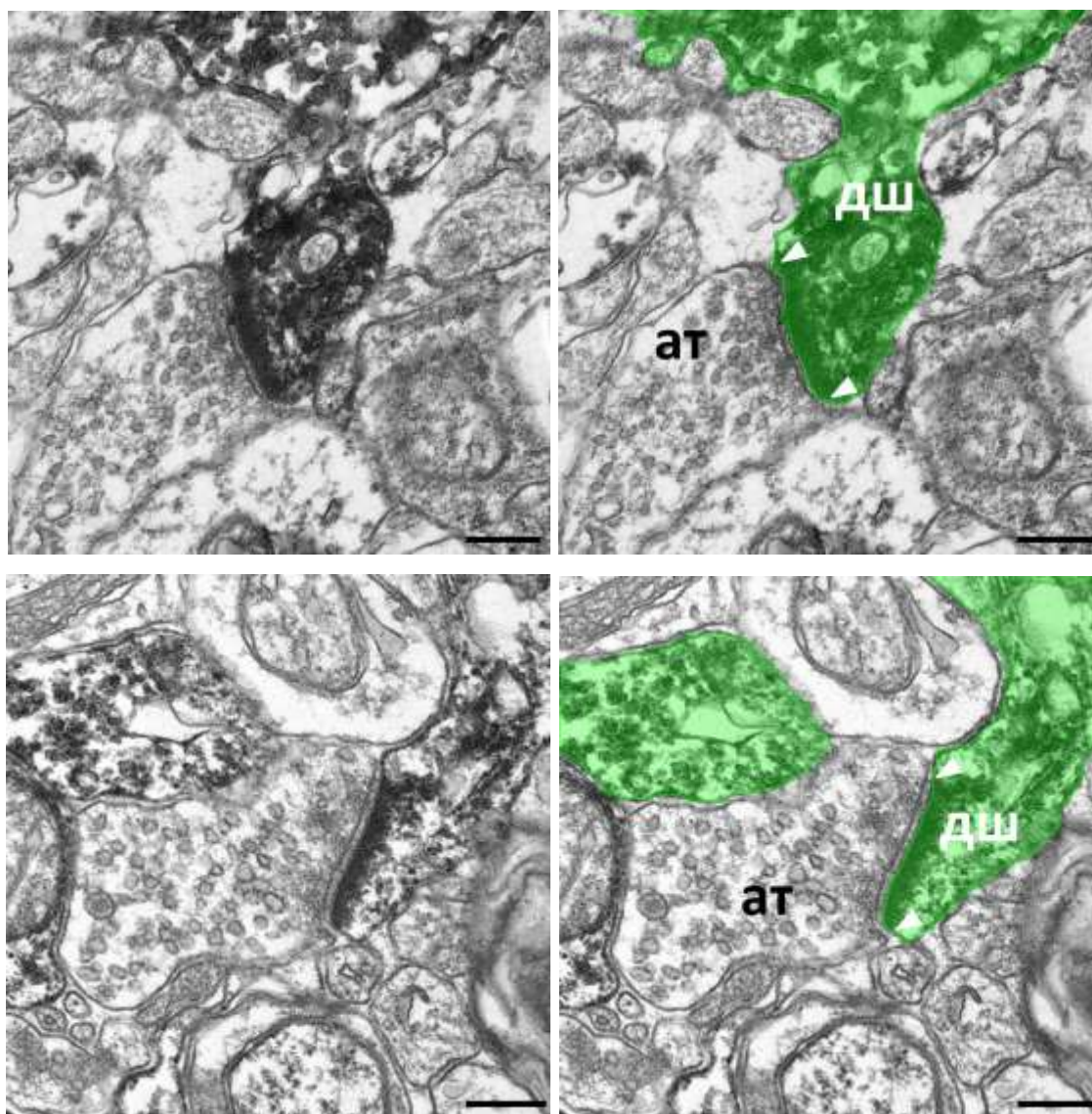


Рис. 8.3. Асиметричні синаптичні контакти з безперервною постсинаптичною щільністю (білі трикутники) між донорськими GFP/DAB-позитивними дендритними шипиками (дш) (зелений колір) і аксонною терміналлю реципієнта (ат). Шкала = 0,2 мкм.

Цей тип синаптичних контактів переважає в корі головного мозку ссавців [113]. Решта аксонних терміналей контактувала з дендритними стовбурами (11,1 %) або з іншими структурами (4,2 %). Усі аксодендритні контакти були асиметричні з ультраструктурними характеристиками збуджувальних глутаматергічних синапсів: виразна постсинаптична щільність, широка синаптична щілина і сферичні синаптичні везикули (**Рис. 8.3**). Більшість (94,3 %) постсинаптичної щільності була неперфорованою (простою) і тільки 5,7 % була перфорованою. Аксонні термінали реципієнта мали значну кількість синаптичних везикул у безпосередній близькості до пресинаптичної мембрани (**Рис. 8.3**), що вказує на наявність пулу синаптичних везикул, готових до викиду нейротрансмітера. Ці ультраструктурні ознаки вказують на функціональну активність синапсів [260].

Таким чином, результати ультраструктурного аналізу свідчать про те, що трансплантовані нейрональні прогенітори отримували аферентні входи від нейронів реципієнта після ішемічного ушкодження головного мозку, утворюючи збуджувальні аксодендритні синаптичні контакти, аналогічні тим, які спостерігаються в інших частинах соматосенсорной кори.

РОЗДІЛ 9. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

9.1. Вплив трансплантації фетальної нервової тканини на структуру гіпокампа гризунів після ішемічного ушкодження мозку

У першій серії експериментів досліджували реакцію гліальних клітин зони СА1 гіпокампа піщанки на трансплантацію фетальної нервової тканини після короткотривалої глобальної ішемії мозку.

Відомо, що реактивний гліоз – це неспецифічні реактивні зміни гліальних клітин (астроцитів і мікроглії) у відповідь на пошкодження нервової тканини, які зазвичай характеризуються проліферацією і/або гіпертрофією гліальних клітин [227].

У наших попередніх дослідженнях на моделі ішемічного ушкодження головного мозку піщанок ми показали, що ішемія-реперфузія супроводжується вираженим реактивним гліозом у гіпокампі [231]. Тому для оцінки реакції гліальних клітин зони гіпокампа піщанки на трансплантацію фетальної нервової тканини після ішемії мозку ми провели імуногістохімічне дослідження зрізів мозку з використанням маркерів астроцитів (GFAP) та мікрогліальних клітин (Iba-1).

У нашій роботі ми показали, що застосування нейротрансплантації гальмувало розвиток реактивного гліозу в СА1 зоні гіпокампа піщанок, а також збільшувало кількість неушкоджених нейронів після ішемії-реперфузії. Такий вплив фетальної нервової тканини на постішемічний мозок можна пояснити тим, що в ній містяться як неспецифічні фактори (протизапальні, ростові, імуносупресорні і т.д.), характерні для усього мозку, що розвивається, так і специфічні фактори (нейромедіатори, нейропептиди, ферменти, гормони та ін.), що властиві певним структурам мозку і які відіграють важливу роль в процесах диференціювання і розвитку тканин і клітин цих структур [348].

У багатьох експериментальних роботах було показано, що ішемічне ураження гіпокампа призводить до значного спустошення пірамідного шару СА1-зони внаслідок фагоцитозу загинувих нейронів гліальними клітинами, що особливо чітко виражено впродовж перших 30 діб [353].

Проведене у даній роботі дослідження цитоархітекτονіки гіпокампа щурів підтверджує ці результати і засвідчує, що чотирисудинна оклюзія у щурів призводить до значних порушень у різних зонах гіпокампа, які у дорослих тварин проявляються протягом тривалого часу. Через 2 місяці після оклюзії спостерігали виражену дегенерацію пірамідних клітин зон СА1, гомогенізацію і вакуолізацію променистого шару СА1 зони. Відомо, що пірамідні клітини зон СА3 та гранулярні клітини зубчастої звивини гіпокампа значно стійкіші до гіпоксично-ішемічного ураження, ніж пірамідні клітини зони СА1 [215]. Тому, ймовірно, виявлена дегенерація в СА3 зоні відбувається у пізніші строки, ніж загибель пірамідних клітин СА1 зони, і не пов'язана безпосередньо з ішемією. Враховуючи відсутність подібних змін у трансплантованих тварин, дегенерація СА3 зони можливо відбувається протягом 2-го місяця після ішемії.

Оцінка у більш віддалені строки свідчить про поступове спонтанне відновлення структури цих шарів гіпокампа, однак і через 7 місяців такі показники, як лінійна щільність клітин у пірамідному шарі чи ширина променистого шару не досягають рівня контролю.

Уведення суспензії клітин фетальної нервової тканини шляхом двобічної стереотаксичної трансплантації в СА1 зону гіпокампа щурів, що перенесли глобальну ішемію головного мозку, мало позитивний вплив на процеси відновлення морфології ураженого гіпокампа.

Через 1 міс після нейротрансплантації виявлено перші ознаки відновлення у вигляді клітин з нормальною структурою у пірамідному

шарі та осередків нормальної будови променистого шару. Надалі, протягом щонайменше 6 місяців, під впливом трансплантації спостерігається достовірно динамічніше зростання показників ЛЩ та ШПШ в СА1 зоні гіпокампа.

Відомо, що в процесі ембріогенезу пірамідні клітини СА1-зони диференціюються на 18–19 день ембріонального розвитку (E18-E19), тоді як диференціювання гранулярних клітин зубчастої звивини починається на E20–E21, а закінчується після народження [18]. Низкою робіт було показано, що саме трансплантація фетальної нервової тканини, яка містить СА1 пірамідні клітини, позитивно впливає на перебіг розладів оперативної пам'яті, спричинених ішемією гіпокампа [120, 121], і що нейрони реципієнта здатні реінервувати трансплантовані фетальні пірамідні клітини [88].

Також було встановлено, що субгранулярна зона зубчастої звивини ссавців навіть у дорослому віці містить нейральні стовбурові клітини і є осередком нейрогенезу [288]. Окрім того, гіпокампальні нейральні стовбурові клітини щурів здатні диференціюватися в умовах відповідного мікрооточення у функціональні нейрони як *in vitro*, так і *in vivo* [275].

Отримані нами результати дозволяють припустити, що вплив нейротрансплантації на ішемізований гіпокамп може ґрунтуватися на кількох механізмах. По-перше, може йти безпосереднє заміщення загинувших пірамідних нейронів у СА1 зоні гіпокампа із подальшим відновленням цитоархітекτονіки ураженої зони. По-друге, може відбуватися міграція і диференціювання трансплантованих нейральних стовбурових/прогеніторних клітин у функціональні нейрони та вбудовування їх у нейронні мережі гіпокампа. Використаний у даній роботі спосіб виділення СА1 зони з фетального мозку не дозволяв відділити її від зародкової зубчастої звивини. Тому існує досить висока

ймовірність того, що трансплантована суспензія фетальної нервової тканини містила як пірамідні клітини CA1 зони, так і нейральні стовбурові/прогеніторні клітини зубчастої звивини. І, по-третє, можлива стимуляція власного нейрогенезу у субгранулярній зоні гіпокампа під впливом факторів росту, які у високих концентраціях містить фетальна нервова тканина. На користь цього свідчать характерні зміни у вигляді гіперпроліферації гранулярного шару зубчастої звивини.

Через 2 місяці після ішемії ці зміни спостерігались як у постішемічних, так і у трансплантованих тварин, з деяким переважанням у останніх проліферативного компоненту. Ці дані збігаються з даними інших авторів про стимулюючий вплив транзиторної ішемії на нейрогенез у зубчастій звивині в піщанок та приматів [332]. Однак через 4 місяці після ішемії ознаки стимуляції нейрогенезу явно переважали у трансплантованій групі, що дозволяє припускати тривалу його потенціацію під впливом нейротрансплантації.

Відомо, що клітини субгранулярної зони гіпокампа, здатні до проліферації і диференціювання у нейрони, експресують GFAP [265]. Виявлене у трансплантованих тварин збільшення кількості GFAP-позитивних клітин переважно у внутрішньому плечі зубчастої звивини може свідчити як про інтенсивну проліферацію астроцитів реципієнта, так і про міграцію у цю зону трансплантованих клітин.

Таким чином, донорські клітини, як і субгранулярні астроцити реципієнта можуть відновлювати популяцію нейронів за рахунок утворення нових нейронів із клітин-прогеніторів, а також активувати синаптогенез і нейрогенез шляхом продукування факторів росту і цитокінів. Відновлення характерної структури гіпокампа в постішемічному періоді може створювати сприятливі умови для нормальної функціональної активності його ланцюгів, а отже і сприяти відновленню втрачених функцій.

Хоча дослідження, які спрямовані на розкриття механізмів дії трансплантації фетальної нервової тканини на мозок, ще тривають, можна передбачати, що нейротрансплантація посідає передові позиції у розвитку нового покоління нейропротекторних засобів, які будуть ефективними при лікування ішемічного ушкодження мозку.

9.2. Вплив трансплантації НПК на стан нервової тканини після церебральної ішемії у мишей

У нашому дослідженні ми використовували модель транзиторної глобальної церебральної ішемії у мишей. Ця модель дозволяє імітувати загибель клітин CA1 зони гіпокампа, спричинену ішемією-реперфузією [152].

Після індукції глобальної ішемії поступово активуються астроцити і мікрогліальні клітини, які продукують численні запальні цитокіни [217]. Раніше було показано, що в активованих астроцитах у відповідь на ішемічне ушкодження головного мозку відбувається ре-експресія Nestin, яка відіграє певну роль у перетворенні нормальних астроцитів у реактивні [51].

Ми показали, що після ішемії/реперфузії імунофарбування зрізів головного мозку на Nestin повністю збігалось з GFAP-імунопозитивними клітинами. Це означає, що всі Nestin-позитивні клітин були фактично GFAP-позитивними астроцитами. Така спричинена ішемією загибель нейронів і активація гліальних клітин в зоні CA1 гіпокампа почалося вже на 3-й день після ішемії, поступово зростала і сягала свого максимуму на 14-у добу [161]. Показано, що в ранньому періоді після інсульту підвищується рівень експресії різних цитокінів і факторів росту, які сприяють міграції і виживанню клітин, і, навпаки, пригнічується в більш пізні періоди [291].

Беручи до уваги ці дані, ми вирішили трансплантувати НПК у гіпокамп у ранній період після ішемії/реперфузії – до того моменту, коли зазвичай починається максимальна активація гліальних клітин і нейродегенерація.

В інших дослідженнях також було показано, що краще виживання трансплантованих нейральних стовбурових/прогеніторних клітин після їх трансплантації спостерігалось в ранні періоди після ішемії порівняно з більш пізньою трансплантацією [65]. Проте строки трансплантації і кількість трансплантованих клітин варіюють між різними дослідженнями [29, 65]. Показано, що збільшення кількості трансплантованих нейральних стовбурових/прогеніторних клітин не завжди має позитивний ефект через нестачу трофічних речовин у зоні щільного трансплантату [64]. Оптимальний час трансплантації і кількість клітин залежать від моделі ішемічного пошкодження і методу трансплантації НПК.

Ми використовували мічені нейральні прогеніторні клітини, отримані з гіпокампа FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J трансгенних мишей. В експериментах із використанням мічених НПК ми дослідили можливість їх довгострокового виживання у мозку ішемізованих тварин. Наші результати свідчать про те, що GFP – це надійний нетоксичний маркер, який дозволяє ідентифікувати донорські клітини навіть до 90 діб після трансплантації.

Крім того, ми показали, що GFP-позитивні НПК, субокципітально трансплантовані в ішемізований мозок, мігрували в зону ураження та диференціювалися як в нейрони, так і в астроцити. Таким чином гіпокампальні НПК проявляли мультипотентний характер після трансплантації в ішемізований мозок. Це свідчить про те, що трансплантовані клітини можуть реагувати на сигнали мікрооточення

тканини реципієнта, які регулюють клітинне диференціювання та визначають напрямок міграції.

Досі недосліджений до кінця механізм того, як трансплантовані НПК мігрують у пошкоджені ділянки [54]. У нашому дослідженні після субокципітальної трансплантації GFP-позитивні клітини були виявлені на епендимальній поверхні 3-го шлуночка на сьому добу після трансплантації, в мозолистому тілі на 7–14 добу, а потім і в ушкоджених ділянках СА1 зони гіпокампа на 14, 30 та 90 добу. Можливо, саме по мозолистому тілу трансплантовані клітини мігрують із шлуночка до ушкодженої ділянки. Відомо, що НПК експресують різні молекули поверхневої адгезії, які сприяють їх міграції [52].

Субокципітальна трансплантація НПК виявила нейропротекторні властивості. Точний механізм дії трансплантованих клітин на ішемізований мозок невідомий. Але ми припускаємо, що таке покращення морфо-функціонального стану ішемізованої тканини відбувається саме завдяки активації синаптогенезу, нейрогенезу або нейропротекції за рахунок ростових факторів, про що зазначають ряд авторів [224, 255]. Нові NeuN-позитивні нейрони після трансплантації клітин *in vivo* утворюються протягом 2–6 тижнів [315]. Було також показано, що гіпокампальні нейральні стовбурові клітини гризунів диференціюються у функціонально зрілі нейрони з формуванням синапсів (*in vitro* та *in vivo*) [275].

НПК можуть диференціюватися в нейрони з глутаматергічною та ГАМК-ергічною синаптичною передачею, генерувати потенціали дії через 12 діб після диференціювання, та формувати синапси через 28–35 діб [292]. Ці результати свідчать про те, що в період між 2 та 6 тижнями після трансплантації формування нових синапсів нейронами, які утворилися з НПК, може сприяти відновленню втрачених функцій.

У наших експериментах із стереотаксичною трансплантацією нейральних прогеніторів ми також продемонстрували здатність НПК

мігрувати далеко від місця ін'єкції і поширюватися по всій CA1 зоні ушкодженого гіпокампа. Було показано, що інсульт активує фактори, що стимулюють міграцію клітин, такі як фактор стромальних клітин (SDF), рецептор якого CXCR4, експресується на найрізноманітніших стовбурових клітинах [30].

На 90-й день після трансплантації, більшість трансплантованих клітини набували фенотипу, схожого з нейронами реципієнта і відображали регіональну специфіку. GFP-позитивні нейрони мали добре розгалужене дендритне дерево з явними дендритними шипиками, що вказує на можливе формування синаптичних контактів з нейронами реципієнта. Було показано, що НПК трансплантовані у гіпокамп 18-денних ембріонів щура не генерували потенціали дії раніше, ніж через 4 тижні після трансплантації [13]. Ці дані вказують на те, що принаймні 4 тижні необхідні, щоб трансплантовані нейральні стовбурові/прогеніторні клітини диференціювалися в фізіологічно зрілі нейрони.

Для того, щоб функціонально інтегруватися в мозок реципієнта, трансплантовані клітини мають утворити синаптичні контакти з нейронами реципієнта. Ми трансплантували НПК у головний мозок дорослих мишей в той час, коли нейрогенез у гіпокампі реципієнта був завершений і основні синаптичні зв'язки вже сформовані. Проте, наше електронно-мікроскопічне дослідження показало, що трансплантовані GFP/DAB-позитивні клітини формували синаптичні контакти з GFP-негативними нейронами реципієнта-господарів.

Таким чином, ці дані свідчать про те, що НПК, трансплантовані в ішемізований мозок дорослих мишей, можуть продукувати функціонально інтегровані нейрони.

Здатність трансплантованих НПК диференціюватися у зрілі нейрони і утворювати синаптичні зв'язки з клітинами реципієнта залежить, мабуть, від сигналів, що надходять з мікрооточення тканини реципієнта

[80]. Але поки що не до кінця ідентифіковані сигнали, що стимулюють диференціювання і функціональну інтеграцію трансплантованих НПК.

Найважливіше, що ми показали у цих дослідженнях те, що гіпокампальні НПК, трансплантовані у дорослий ішемізований мозок, можуть диференціюватися в функціонально зрілі нейрони, стають синаптично інтегруватися в нейроні мережі реципієнта та сприяють відновленню когнітивної функції у мишей після ішемічного ушкодження мозку.

Також ми продемонстрували, що трансплантовані НПК виживали в тканині реципієнта як мінімум 90 днів після трансплантації. Ці результати вказують на те, що гіпокампальні НПК можуть бути використані як довгострокові носії терапевтичних агентів.

Наші дані свідчать про те, що трансплантація гіпокампальних НПК може бути корисним терапевтичним підходом у лікуванні хворих із неврологічними розладами, у патогенезі яких провідну роль відіграють втрата нейронів і погіршення пам'яті.

9.3. Вплив трансплантації НПК на ендогенний нейрогенез після ішемічного ушкодження мозку

Під час дослідження ендогенного нейрогенезу ми показали, що на 14-ту добу після глобальної короткотривалої ішемії збільшувалася кількість BrdU- та DCX-позитивних клітин у субгранулярній зоні гіпокампа мишей. Ці результати узгоджується з попередніми дослідженнями, які показали, що індукція нейрогенезу починається на 3–4 добу після експериментальної ішемії у дорослих гризунів і сягає максимуму на 7–10 добу [132].

Відомо, що субгранулярна зона зубчастої звивини ссавців навіть у дорослому віці містить нейральні стовбурові/прогеніторні клітини і є осередком нейрогенезу [77].

Було показано, що новоутворені клітини в зубчастій звивині диференціювалися в нові зрілі нейрони після ішемічного ушкодження мозку у дорослих щурів, мишей і піщанок [25, 181, 279]. Але відомо, що з віком така здатність новоутворених клітин диференціюватися по нейральному фенотипу після ішемічного ушкодження мозку значно зменшується [53]. Це може бути пов'язано зі зниженням продукування нейрогенних факторів, таких як фактор росту фібробластів, інсуліноподібний фактор росту 1, нейрогенезин-1 і судинний ендотеліальний фактор росту в нейрогенних зонах мозку [271, 312].

Саме тому активно вивчається можливість застосування трансплантації нейральних клітин для компенсації наслідків ішемічного ушкодження мозку за рахунок активації власних репаративних механізмів [76].

Було показано, що трансплантація фетальної тканини ЦНС, що містила клітини CA1 зони гіпокампа, зменшувала когнітивні порушення, викликані ушкодженням пірамідних нейронів CA1 зони у дорослих щурів після глобальної ішемії [120].

НПК, трансплантовані в дорослий мозок, диференціювалися в зрілі нейрони з морфологічними та біохімічними особливостями, характерними для оточуючих нейронів мозку реципієнта. Це свідчить про те, що стовбурові клітини ЦНС здатні реагувати на сигнали мікрооточення, а також впливати на тканину реципієнта [275].

Отримані нами дані показали, що трансплантація НПК після ішемічного ушкодження мозку достовірно збільшувала кількість як BrdU- так і DCX-позитивних клітин у субгранулярній зоні зубчастої звивини. Можна припустити, що трансплантація нейральних прогеніторних клітин у

ішемізований гіпокамп може стимулювати ендогенний нейрогенез у субгранулярній зоні гіпокампа за рахунок секреції різноманітних ростових факторів, які у високих концентраціях містить фетальна нервова тканина.

9.4. Вплив трансплантації НПК на поведінкові реакції мишей після ішемії-реперфузії

Для оцінки когнітивних функцій експериментальних тварин було розроблено багато поведінкових тестів, але водний лабіринт, розроблений Річардом Моррісом (ВЛМ), є одним з найбільш широко використовуваних поведінкових тестів для вивчення просторового навчання і пам'яті [319]. Успішність виконання тваринами тесту ВЛМ пов'язують із довгостроковою потенціацією (LTP) і функцію NMDA-рецепторів, що робить це тест основним підходом у вивченні нейронних мереж гіпокампа [17].

Результати нашого дослідження вказують на те, що короткотривала глобальна церебральна ішемія призводила до порушення просторового навчання у піддослідних тварин. Ми спостерігали відновлення таких когнітивних функцій вже через два тижні після трансплантації НПК. Навіть якщо два тижні достатньо для диференціювання трансплантованих прогеніторних клітин у нейрони та гліальні клітини, цього терміну не достатньо для інтеграції донорських клітин в існуючі нейронні мережі гіпокампа реципієнта.

Ми вважаємо, що відновлення просторового навчання і пам'яті в експериментальних тварин може бути пов'язано з секрецією трофічних та мітогенних факторів трансплантованими клітинами, що сприяло виживанню пошкоджених клітин і відновленню втрачених ними функцій.

Кілька досліджень показали, що відновлення неврологічного статусу ішемізованих тварин у ранній період після трансплантації

стовбурових клітин швидше за все пов'язано не із заміною пошкоджених клітин новими трансплантованими, а із секрецією донорськими клітинами різноманітних факторів росту [344].

9.5. Вплив трансплантації ММСК на стан нервової тканини після ПВЛ

Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції може викликати порушення кортикоспинальної функції, що є результатом ушкодження мієлінової оболонки нервових волокон (деградації основного білка мієліну) і активації астро- і мікроглії.

Сингенна стереотаксична трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин сприяє відновленню кортикоспинальної функції у тварин після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції, зменшує деградацію МВР і гальмує розвиток гліозу. Було показано, що застосування стовбурових клітин істотно покращує стан тварин після гіпоксично-ішемічного ушкодження [169].

Можливі механізми нейропротекторної дії ММСК можуть бути пов'язані як із заміною ушкоджених клітин шляхом диференціювання та інтеграції трансплантованих клітин, так і з біологічно активними чинниками, здатними модулювати розвиток ушкодження при ПВЛ.

Вважають, що нейропротекторні властивості ММСК реалізуються здебільшого не прямо через диференціювання, а паракринно завдяки різноманітним факторам, які індукують міграцію ендогенних нейральних прогеніторів у зону пошкодження, стимулюють ріст дендритів і аксонів та зменшують постішемічне запалення [180]. Було показано, що кондиційне середовище з ММСК захищає культуру нейронів від індукованого апоптозу [325].

Мезенхімальні стовбурові клітини модулюють численні сигнальні каскади під час нейрогенезу, ангиогенезу, синаптогенезу та апоптозу за допомогою трансмітерів. Було виявлено збільшення експресії фактора росту фібробластів (FGF-2), епідермального фактора росту (EGF), нейротрофічного фактора гліальних клітин (GDNF) після трансплантації ММСК [169]. Ці фактори відіграють ключову роль у проліферації клітин-попередників, а також в нейрогенезі та диференціюванні клітин [267].

Крім того, стовбурові клітини спричиняють утворення нейропіліну-1 і 2, нейрегуліну-1 і ефрину-B2 – месенжерів, які відіграють важливу роль у регуляції росту аксонів, формуванні синапсів та інтеграції в нейронні мережі [318].

Встановлено, що мезенхімальні стовбурові клітини стимулюють проліферацію прогеніторних клітин у зубчастій звивині гіпокампа, їх міграцію у пошкоджену ділянку та диференціювання в астроцити, олігодендроцити та нейрони [316].

ММСК також підтримують проліферацію і диференціювання клітин-попередників олігодендроцитів і таким чином мієлінізацію новоутворених аксонів [316]. Крім того, мезенхімальні стовбурові клітини зменшують астрогліальну реакцію, запобігаючи утворенню гліальних рубців, які ускладнюють міграцію аксонів і дендритів [270].

Відомо, що постішемичне запалення супроводжується активацією мікроглії та макрофагів ЦНС [79]. Під час пошкодження головного мозку спостерігається активація місцевої мікроглії та міграція моноцитів периферичної крові до ушкодженої ділянки [62].

Розрізняють мікроглію типу M1 і M2. Мікроглія типу M1 вивільняє прозапальні цитокіни, вільні радикали та нейротоксини, що призводить до подальшого пошкодження тканини. Мікроглія M2, навпаки, має нейропротекторну дію і продукує IL-10, інсуліноподібний фактор росту-1, трансформуючий фактор росту- β та інші імуномодуючі

фактори [62]. Застосування мезенхімальних стовбурових клітин зменшує кількість активованої мікроглії M1 і таким чином уповільнює вивільнення прозапальних цитокінів, а також активує мікроглію M2, яка синтезує фактори росту, що підтримують регенерацію пошкодженої тканини [135].

Отже, головний мозок новонародженого більш пластичний порівняно з мозком дорослого і тому має більший регенеративний потенціал. Саме тому трансплантація ММСК може стати ефективною стратегією для відновлення пошкодженого мозку при перинатальній патології ЦНС.

9.6. Трансплантовані FGF-2-трансформовані НПК, що контактують із судинами, утворюють пул клітин з нейрогенним потенціалом після церебральної ішемії

Основний висновок цього розділу роботи полягає в тому, що надекспресія FGF-2 у трансплантованих нейральних прогеніторах збільшує їх здатність контактувати з кровоносними судинами і утворювати багатоклітинні нейрогенні кластери навколо судин реципієнта.

Навколосудинне середовище відіграє вирішальну роль у підтримці НПК у недиференційованому і проліферативному стані. Більш того, ми показали, що ішемічне середовище може сприяти генерації нових нейронів у безпосередній близькості від кровоносних судин, і таким чином утворені навколосудинні кластери НПК можуть функціонувати як нейроваскулярна ніша.

Ці результати можуть відкрити нові можливості для створення ектопічних ділянок нейрогенезу в пошкодженій корі головного мозку, які б генерували незрілі нейрони для відновлення пошкодженої тканини.

Результати багатьох досліджень свідчать про те, що загибель клітин, обмежена міграція і швидке диференціювання в гліальні клітини

обмежують використання трансплантованих НПК для нейрональної регенерації [115, 183, 264].

Ми показали, що надекспресія FGF-2 трансплантованими НПК може бути корисною стратегією для подолання цих обмежень за рахунок підтримки НПК у проліферативному стані і збільшення пулу незрілих нейронів, доступних для регенерації мозку. Представлені дані свідчать про те, що здатність FGF-2-трансформованих нейральних прогеніторів контактувати з судинами реципієнта може відігравати важливу роль у цьому процесі.

Також надекспресія FGF-2 значно підвищувала здатність НПК утворювати багатоклітинні навколосудинні кластери. Ми знайшли значно вищу частку клітин у проліферативному і недиференційованому стані в безпосередній близькості від кровоносних судин, порівняно із клітинами, які не контактували із судинами.

Було показано, що через 2 тижні після трансплантації у кору головного мозку, значна частина FGF-2 трансформованих НПК залишається Nestin-позитивною, в той час як лише незначна кількість контрольних НПК експресує цей маркер незрілих клітин-попередників. Більш того, понад 80% контрольних НПК експресували NG2 - маркер клітин-попередників олігодендроцитів [68].

Ці результати свідчать про те, що надекспресія FGF-2 нейральними прогеніторами сприяє тому, що ці клітини залишаються в незрілому проліферативному стані. Цей висновок узгоджується з іншими експериментальними даними в умовах *in vitro*, в яких було показано, що FGF-2 є основним чинником для підтримки популяції НПК у проліферативному недиференційованому стані [185].

Дані, представлені тут, крім того, вказують на те, що ефект FGF-2 на трансплантовані НПК залежить від навколосудинного середовища. Це узгоджується з гіпотезою, що збереження мультипотентного і

проліферативного фенотипу стовбуровими/прогеніторними клітинами в тканині не є автономним процесом, а залежить від зовнішнього контролю з боку ніші [257].

Фактор росту фібробластів-2 відомий своїм сильним ангіогенним потенціалом [233]. Було показано, що FGF-2 викликає церебральний ангіогенез після внутрішньошлуночкової ін'єкції [235], а також на органотиповій культурі кори мозку миші [20]. Хоча ми не можемо виключити можливість того, що у наших експериментах FGF-2-трансформовані НПК індукували ангіогенез, наш кількісний аналіз щільності судин після трансплантації показує, що це не так.

Показано, що тісний контакт між нейральними стовбуровими/прогеніторними клітинами і судинами необхідний для існування фізіологічних нейрогенних ніш у головному мозку дорослих ссавців [7]. Прямі докази існування функціонального взаємозв'язку між ендотеліальними і нейральними стовбуровими клітинами були продемонстровані в експериментах із співкультивування цих клітин.

Показано, що ендотеліальні клітини виділяють розчинні фактори, які стимулюють самовідновлення НСК та перешкоджають їх диференціюванню [268]. Наші дані підтримують цю концепцію, демонструючи вперше, що навколосудинне середовище має вирішальне значення у визначенні долі трансплантованих НПК *in vivo*.

Точні клітинні та молекулярні механізми, завдяки яким трансплантовані НПК, що надекспресують FGF-2, утворюють навколосудинні кластери, залишаються невідомими. Надекспресія FGF-2 нейральними прогеніторами важлива для цього процесу, оскільки, як ми показали, контрольні НПК утворювали значно менше клітинних навколосудинних кластерів. Крім контролю поділу і диференціювання клітин, FGF-2 може збільшувати частоту судинних контактів

опосередковано завдяки збільшенню міграційного та інвазивного потенціалу клітин-попередників [68].

Таким чином, взаємодія між НПК, що надекспресують FGF-2, та клітинами судин, такими як ендотеліальні клітини, перицити або фібробласти, сприяє утворенню регуляторного мікросередовища, яке підтримує стовбурові/прогеніторні клітини у недиференційованому і проліферативному стані. Стратегія надекспресії FGF-2 може стати потужною моделлю для вивчення взаємодії між НПК та ендотеліальними клітинами, а також для ідентифікації та дослідження сигналів, які забезпечують цю взаємодію.

Ми показали, що в інтактній корі головного мозку, навколосудинні кластери FGF-2-трансформованих НПК в основному містили недиференційовані і проліферативні клітини. Тоді як ішемічний інсульт значно збільшував кількість незрілих нейронів, які були виявлені в безпосередній близькості від кровоносних судин. У деяких випадках новоутворені нейрони мігрували вздовж кровоносних судин, що може свідчити про те, що навколосудинні кластери могли функціонувати як ектопічні нейрогенні судинні ніші. Ектопічні навколосудинні ніші нейральних прогеніторних клітин раніше були описані при патологічних станах, таких як запалення центральної нервової системи [188] та пухлини головного мозку [41].

Цікаво було дослідити які характеристики мають ектопічні навколосудинні ніші, описані в нашому дослідженні, - схожі на фізіологічні нейрогенні ніші субвентрикулярної зони чи зубчастої звивини? Тому у подальшій серії експериментів ми аналізували клітинний склад навколосудинних кластерів, утворених трансплантованими FGF-2-трансформованими НПК.

У нашій роботі ми вперше описали анатомічне явище (формування навколосудинних клітинних кластерів) і продемонстрували,

що трансплантовані FGF-2-трансформовані НПК переважно контактували з венулами на ділянках, вкритих астроцитними ніжками, та уникали контактів із перицитами. Клітинний склад і організація ектопічних навколосудинних кластерів із трансплантованих клітин був схожий на нативні нейроваскулярні ніші, які також містять стовбурові клітини, потовщену базальну пластинку, екстрацелюлярний матрикс та судини [277].

Відомо, що судини мозку є ключовим і невід'ємним компонентом нейроваскулярних ніш стовбурових клітин [27]. Стовбурові клітини отримують просторові і регуляторні сигнали від різних елементів судинної мережі, які підтримують їх самовідновлення та інгібують диференціювання [268]. Показано, що ендотеліальні клітини виробляють мітогени і різноманітні ростові фактори: bFGF, IGF-1, VEGF, PDGF, IL8 і BDNF [220].

Ми розглядаємо дві можливі причини чому трансплантовані FGF-2-трансформовані нейральні прогеніторні клітини переважно контактували з венулами. По-перше, трансплантовані НПК використовують ці кровоносні судини як каркас під час своєї міграції. Коїма та його колеги показали, що нейральні прогенітори з СВЗ мігрують уздовж кровоносних судин до зони ішемічного ушкодження і судинна мережа грає важливу роль як каркас для міграції НПК [157]. Друга причина полягає в тому, що нейральні прогеніторні клітини, як відомо, добре реагують на гіпоксичні умови [253]. У різних дослідженнях було показано, що нейральні прогенітори в культурі при помірній гіпоксії сильно підвищують самовідновлення і проліферацію шляхом активації молекулярних шляхів, які регулюють Wnt/ β -catenin, Oct4 і Notch сигналінг [45, 61, 230]. Цікаво, що при важкій формі гіпоксії ($< 1\% \text{ O}_2$) зупиняється проліферація стовбурових клітин і може навіть початися апоптоз. І

навпаки, умови культивування, які відтворюють атмосферний вміст кисню (20 % O₂), спричиняють диференціювання стовбурових клітин [253].

Крім того, було показано, що стовбурові клітини у СВЗ нейроваскулярній ніші часто контактують із судинною мережею на ділянках кровоносних судин, на яких відсутні AQP-4-позитивні астроцитні ніжки і відростки перицитів, таким чином маючи прямий доступ до сигналів, які надходять з крові та судинних компонентів [27]. Але такий переривчастий характер обгортання астроцитарними ніжками судин є унікальним лише для СВЗ, у той час як кровоносні судини у корі мозку або стріатумі повністю вкриті астроцитними ніжками [27]. Використовуючи імунофарбування на маркер астроцитних ніжок AQP-4, ми також підтвердили, що кровоносні судини постнатальної соматосенсорної кори щура були повністю огорнуті AQP-4-позитивними астроцитними ніжками. Таким чином, GFP-позитивні трансплантовані НПК контактувати з кровоносними судинами не напряму, а через AQP-4-позитивні астроцитарні ніжки.

Невід'ємною частиною ніші стовбурових клітин є також базальна пластинка і компоненти позаклітинного матриксу, які забезпечують клітини ніші необхідними сигналами [193]. СВЗ ніша постнатальних ссавців містить колаген-1, тенасцин-С, гепарансульфат, хондроїтинсульфат та інтегрини, які беруть участь як в проліферації, так і міграції клітин [204]. Наприклад, гепарансульфат зв'язує фактори росту (EGFs, FGFs, IGF-II, PDGF-AA і VEGF), морфогени і мітогени (BMP-2, -4, Shh, і Wnts), хемокіни і цитокіни [100, 134, 177]. Було показано, що в нейроваскулярних нішах базальна пластинка формує розгалужені лабіринтоподібні структури - фрактони [193]. У наших експериментах ми також показали, що трансплантовані FGF-2-трансформовані НПК стимулювали формування фрактоно-подібних структур навколо судин, які можуть зв'язувати

різноманітні фактори [193] та забезпечувати просторові сигнали усередині ектопічної ніші стовбурових клітин.

Отримані дані дають нове розуміння взаємозв'язку між трансплантованими НПК, що надекспресують FGF-2, та судинами реципієнта. Створення штучної ектопічної нейрогенної ніші може бути корисною стратегією для подолання низького регенеративного потенціалу кори головного мозку за рахунок підтримки міграційного та проліферативного стану НПК і за рахунок збільшення пулу незрілих нейронів, необхідних для регенерації мозку.

9.7. Трансформація НСК у напрямку надекспресії EMMPRIN покращує міграційні властивості цих клітин

Ми дослідили нову стратегію щодо посилення інвазивної здатності нейральних прогеніторних клітин шляхом модифікації експресії ММП. Було продемонстровано, що міграція культивованих НПК залежить від активності ММП і що надекспресія EMMPRIN є корисною стратегією для покращення міграційної здатності ендогенних НПК із СВЗ до ішемічної ділянки соматосенсорної кори.

Наші результати підтверджують попередні дані, що вказують на те, що EMMPRIN індукує активність ММП [146]. Залежно від типу клітин, EMMPRIN може збільшувати ММП-1, -2 і -3, однак, не має ніякого впливу на їх фізіологічні інгібітори (тканинний інгібітор металлопротеїнази-1 і -2 (TIMP-1 і TIMP-2)), змінюючи протеолітичний баланс у напрямку продукування та активації ММП [223].

Хоча й були запропоновані деякі можливі способи індукції ММП за допомогою EMMPRIN, точний механізм залишається невідомим [223]. EMMPRIN може збільшувати продукування ММП у сусідніх фібробластах, а також у власних клітинах. EMMPRIN - це поверхневий

трансмембранний білок, який може вивільнятися у вигляді міковезикул, які утворюються шляхом випинання плазматичної мембрани з клітини назовні з подальшим відділенням від поверхні клітини. Було показано, що у такій міковезикулярній формі EMMPRIN зберігає здатність індукувати активність ММП і таким чином може діяти на відстані.

Специфічний рецептор EMMPRIN до сих пір хоч і не ідентифікований, але за допомогою імунопреципітації та імунофлюоресценції було ідентифіковано два інтегрини ($\alpha 3 \beta 1$ і $\alpha 6 \beta$), які колокалізовані з EMMPRIN у точках міжклітинного контакту [3]. Завдяки такій асоціації EMMPRIN з інтегрінами можливо, що EMMPRIN може впливати на ламінін/інтегрин взаємодію і таким чином регулювати клітинну адгезію і міграцію клітин.

Ми продемонстрували, що ММП-2, -9, -10, -11, -13, -14 та -16 експресуються в НПК, і ці ММП беруть участь у міграції цих клітин *in vitro*. У нашому експерименті надекспресія EMMPRIN у НПК сприяла вищому рівню експресії ММП-2.

Механізм активації ММП-2 полягає у тому, що профермент проММП-2 рекрутується на поверхню клітини, утворюючи потрібний комплекс з ТІМП-2 та МТ1-ММП. У цьому потрібному комплексі МТ1-ММП виконує одночасно роль і рецептора, і активатора проММП-2 [206]. Таким чином активується ММП-2 і збільшується міграційний потенціал клітини.

Ми показали, що надекспресія EMMPRIN значно посилювала міграційні властивості НПК як в умовах 2D культури, так і в тканині. Цей ефект був специфічним і жодних змін у проліферації та диференціюванні клітин після надекспресії EMMPRIN не спостерігалось.

Ці результати узгоджуються з даними, в яких було показано, що підвищення рівня протеолітичної активності, яку спричиняє EMMPRIN, та

подальша деградація матриксу полегшують інвазивні здібності клітин [223].

Також була перевірена гіпотеза, що надекспресія EMMPRIN у НПК *in vivo* може збільшити їх міграцію з СВЗ до ішемізованої кори. На нашій моделі ми показали, що після ішемії головного мозку як EMMPRIN-трансформовані, так і GFP-позитивні контрольні клітини виявлялися в соматосенсорній корі в зоні ішемічного ушкодження.

Ці спостереження узгоджуються з попередніми результатами, які показали, що НПК мігрують у зону ішемічного ушкодження завдяки хемотаксису по градієнту хемоатрактантів, які продукуються в цій зоні [99]. Цікаво, що EMMPRIN-трансформовані НПК мігрували далі у ішемізовану кору і були виявлені у пошкодженій корі на відстані 1000 мкм або більше від СВЗ, тоді як більшість контрольних клітин залишалися в діапазоні 200 мкм, неподалік від субвентрикулярної зони. Ці дані вказують на те, що надекспресія EMMPRIN може впливати на міграційну здатність СВЗ-похідних прогеніторів *in vivo*.

Ці висновки також дозволяють припустити, що взаємодія через паракринну сигналізацію між EMMPRIN-трансформованими та контрольними клітинами не була достатньою, щоб збільшити міграційний потенціал контрольних клітин. Незважаючи на те, що ми не можемо повністю не враховувати ефект контактної взаємодії між EMMPRIN-трансформованими НПК та клітинами хазяїна, ми все ж таки припускаємо, що ефекти, які ми спостерігали, пояснюються в основному аутокринною сигналізацією.

Отже, наші результати вказують на те, що надекспресія EMMPRIN посилює міграцію нейральних прогеніторних клітин із субвентрикулярної зони в зону ішемічного ушкодження шляхом посилення експресії протеаз. Ці результати свідчать про те, що мозок має приховану здатність до більш ефективного самовідновлення за умов

підвищення активності протеаз, які діють у нейрогенних зонах, зокрема у субвентрикулярній зоні бокових шлуночків.

9.8. Інтеграція трансплантованих НПК, утворених з іПСК людини, у мозок щура після церебральної ішемії

У електронно-мікроскопічних дослідженнях ми показали, що трансплантовані НПК, утворені з іПСК людини, структурно інтегрувалися в нейронні мережі реципієнта. Але чи проявляють ці синаптичні контакти між трансплантованими клітинами і нейронами реципієнта функціональну активність?

Відомо, що в інтактному мозку, сенсорна інформація від тіла передається до соматосенсорної кори через таламокортикальні шляхи, зокрема вентробазальне та інтраламінальне ядра.

Для того, щоб з'ясувати, чи трансплантовані клітини реагують на сенсорні стимули, наші співавтори (Д. Торнеро та інші працівники Лабораторії стовбурових клітин і відновлювальної неврології Лундського університету під керівництвом проф. З. Кокайя) провели серію електрофізіологічних досліджень.

У десяти щурів була змодельована фокальна ішемія головного мозку і через 48 годин їм трансплантували НПК, утворені з іПСК людини, в коркову зону, прилеглу до ушкодженої ділянки.

Через три місяці виконували позаклітинну реєстрацію електричної активності нейронів з трансплантованої тканини у наркотизованих тварин ($n = 4$) під час проведення тактильної стимуляції різних ділянок тіла.

Для отримання високої якості реєстрації вибирали центральну частину трансплантату, яку візуалізували за допомогою ультрафіолетового освітлення кортикальної поверхні (**Рис. 9.1А,Б**) [295].

Було встановлено такі критерії для врахування сигналів від трансплантованих нейронів: (1) мінімальна відстань до межі трансплантату – 70 мкм (визначалося *post mortem* 3D імуногістохімією, **Рис. 9.1В**), (2) пікова амплітуда > 100 мкВ і (3) співвідношення сигнал-шум > 2,5 [290]. П'ять нативних щурів використовували як контроль.

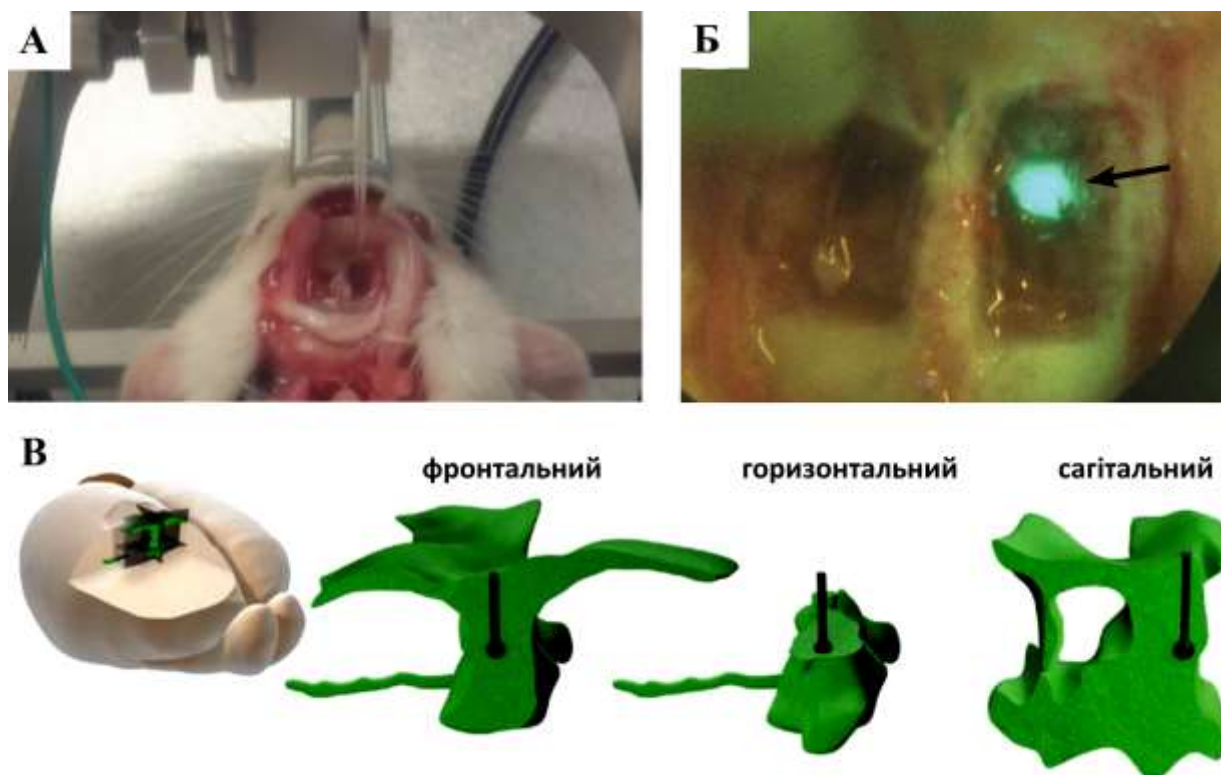


Рис. 9.1. Електрофізіологічний експеримент *in vivo* (А) Фото тварини під час електрофізіологічного експерименту *in vivo*. (Б) Фотографія GFP+ трансплантату (вказано стрілкою) під ультрафіолетовим освітленням у правій півкулі головного мозку. (В) Фронтальний, горизонтальний і сагітальний вигляди 3D реконструкції місця реєстрації активності нейронів трансплантату. Зелений колір відповідає трансплантованій GFP+ нейральній тканині, а чорні сфери на кінці капіляра вказують на ділянку навколо записуючого електрода.

Відомо, що соматосенсорна кора головного мозку має функціональні одиниці, орієнтовані перпендикулярно до поверхні. Десять записів електричних сигналів з таких функціональних одиниць у трансплантаті відповідали критеріям включення, вказаним вище (Табл. 9.1). Електричні сигнали реєстрували від трансплантованих нейронів на глибині від 700 до 1250 мкм нижче поверхні мозку. Усі, крім одного з цих нейронів, отримували коротколатентні (протягом перших 50 мс від початку стимуляції) збуджувальні входи від тактильного подразнення носа з початковою латентністю від 9 до 32 мс (Табл. 9.1) [295].

Таблиця 9.1.

In vivo реєстрація електричних сигналів від трансплантованих клітин
після периферичної сенсорної стимуляції

Номер	Ніс	Передня лапа		Задня лапа		ВСШ	Амплітуда (мкВ)
		Контра	Іпси	Контра	Іпси		
1	55	н.в.	н.в.	н.в.	н.в.	9.55	294
2	12	н.в.	н.в.	н.в.	н.в.	11.50	369
3	11	н.в.	н.в.	44	н.в.	3.68	116
4	32	н.в.	50	н.в.	78	10.58	301
5	16	н.в.	51	85	42	4.28	102
6	16	н.в.	33	н.в.	н.в.	20.19	463
7	9	н.в.	н.в.	н.в.	н.в.	3.43	110
8	31	н.в.	н.в.	н.в.	н.в.	9.97	381
9	21	н.в.	н.в.	н.в.	н.в.	2.54	106
10	13	34	46	н.в.	н.в.	5.09	175

Відповіді на периферичну стимуляцію в різних ділянках (Контра – контралатеральна; Іпси – іпсилатеральна; н.в. – немає відповіді). Збуджувальні відповіді позначені сірим кольором (початкова латентність, мс), гальмівні – чорним (початкова латентність, мс). ВСШ – відношення сигнал/шум. Амплітуда = максимальна амплітуда відповіді.

Чотири нейрони отримували додатковий коротколатентний збуджувальний вхід від однієї з кінцівок: іпсилатеральної передньої, контралатеральної передньої, іпсилатеральної задньої або контралатеральної задньої лапи.

Спонтанна активність у чотирьох нейронах була загальмована тактильною стимуляцією щонайменше однією з кінцівок з початковою латентністю від 46 до 85 мс (**Табл. 9.1**).

На **Рис. 9.2** показаний типовий приклад нейрона (запис номер 4 в **Табл. 9.1**), який реагував на тактильні подразнення носа із латентністю 32 мс з подальшим періодом гальмування спонтанної активності, в той час як стимуляція іпсилатеральної передньої кінцівки спричиняла лише коротколатентне гальмування спонтанної активності [295].

Одиниці ($n = 75$), записані в соматосенсорній корі контрольних щурів, отримували коротколатентні збуджувальні тактильні входи з контралатеральної передньої кінцівки (61 % одиниць), носа (45 % одиниць) і іпсилатеральної передньої кінцівки (25 % одиниць).

Гальмівний тактильний вхід отримували з контралатеральної передньої кінцівки (24 % одиниць), іпсилатеральної передньої кінцівки (19 % одиниць) і носа (24 % одиниць).

Для оцінки впливу ішемії на відповідь на тактильну стимуляцію реєстрували електричні сигнали з кортикальної ділянки, суміжної з зоною ішемічного пошкодження.

Ці одиниці ($n = 12$) отримували збуджувальний вхід, в основному, з іпсилатеральної передньої кінцівки (75 % одиниць), носа (58 % одиниць) і контралатеральної передньої кінцівки (33 % одиниць).

Жоден гальмівний вхід не був знайдений.

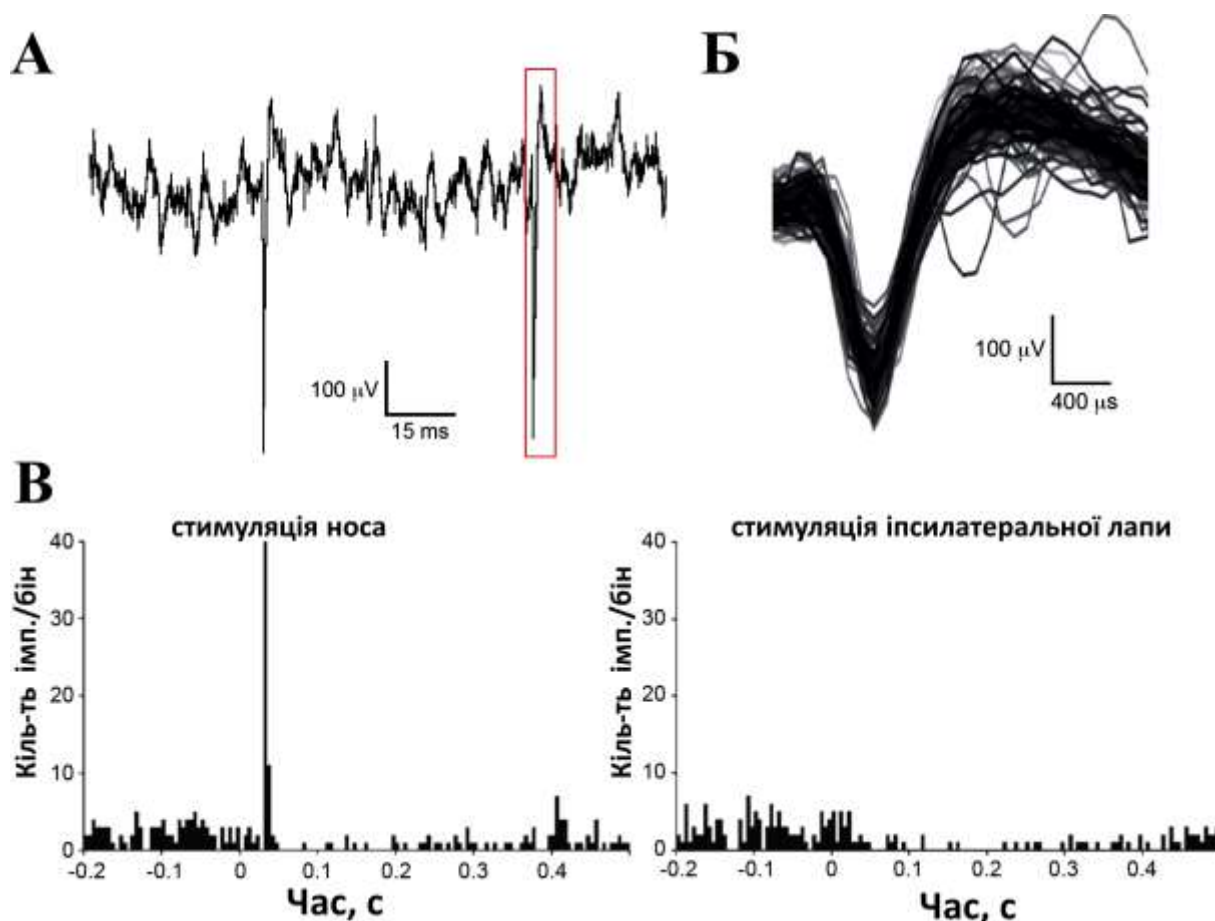


Рис. 9.2. Трансплантовані нейрони, утворені з іПСК людини, активуються фізіологічними сенсорними стимулами. (А) Один із прикладів нефільтрованої спонтанної активності нейронів. (Б) Осцилограми, виділені на (А) червоним прямокутником, з ідентифікованого нейрона зі збільшеною шкалою часу. (В) Перистимульні гістограми активності ідентифікованого нейрона на основі відповідей на 100 тактильних подразнень (частота 1 Гц) носа (ліворуч) та іпсилатеральної лапи (праворуч). По осі ординат – кількість імпульсів в біні, по осі абсцис – час в секундах. Залежно від місця стимуляції спостерігаються різні відповіді.

Аналіз початкової латентності збуджувального входу від тактильної стимуляції носа показав значне покращення цього показника у

групі ішемізованих тварин з трансплантацією в порівнянні з тваринами після ішемії ($16,9 \pm 7,6$ мс і $28,1 \pm 8,4$ мс відповідно), але цей показник не сягав значень контрольної групи тварин ($11,2 \pm 3,2$ мс) (Рис. 9.3Б).

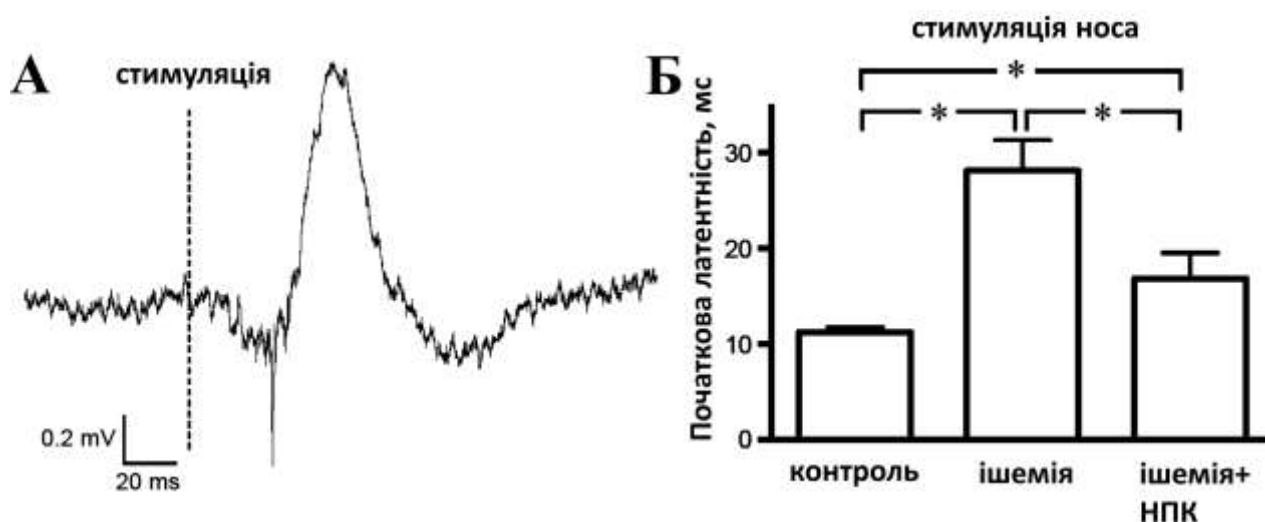


Рис. 9.3. Трансплантовані нейрони, утворені з іПСК людини, активуються фізіологічними сенсорними стимулами після ішемічного ушкодження мозку і трансплантації НПК. (А) Приклад викликаного потенціалу, спричиненого тактильною стимуляцією носа. (Б) Початкова латентність збуджувальних сигналів від тактильного подразнення носа контрольних тварин ($n = 34$), тварини з фокальною ішемією ($n = 7$), а також тварини з фокальною ішемією та трансплантацією НПК ($n = 7$). Дані представлені у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка середнього; * $P < 0,05$; однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA).

Для дослідження клітинного складу трансплантатів і переконання, що записані сигнали походять від трансплантованих нейронів, після завершення процедури реєстрації електричних сигналів від трансплантатів, мізки експериментальних тварин були проаналізовані за допомогою імуногістохімії.

Імуногістохімічний аналіз показав, що приблизно одна п'ята

трансплантованих НПК, утворених з іПСК людини, диференціювалися в зрілі NeuN-позитивні нейрони ($20,6 \pm 1,4\%$ клітин, імунореактивних до SC101 – ядерного маркера клітин людини) (Рис. 9.4А).

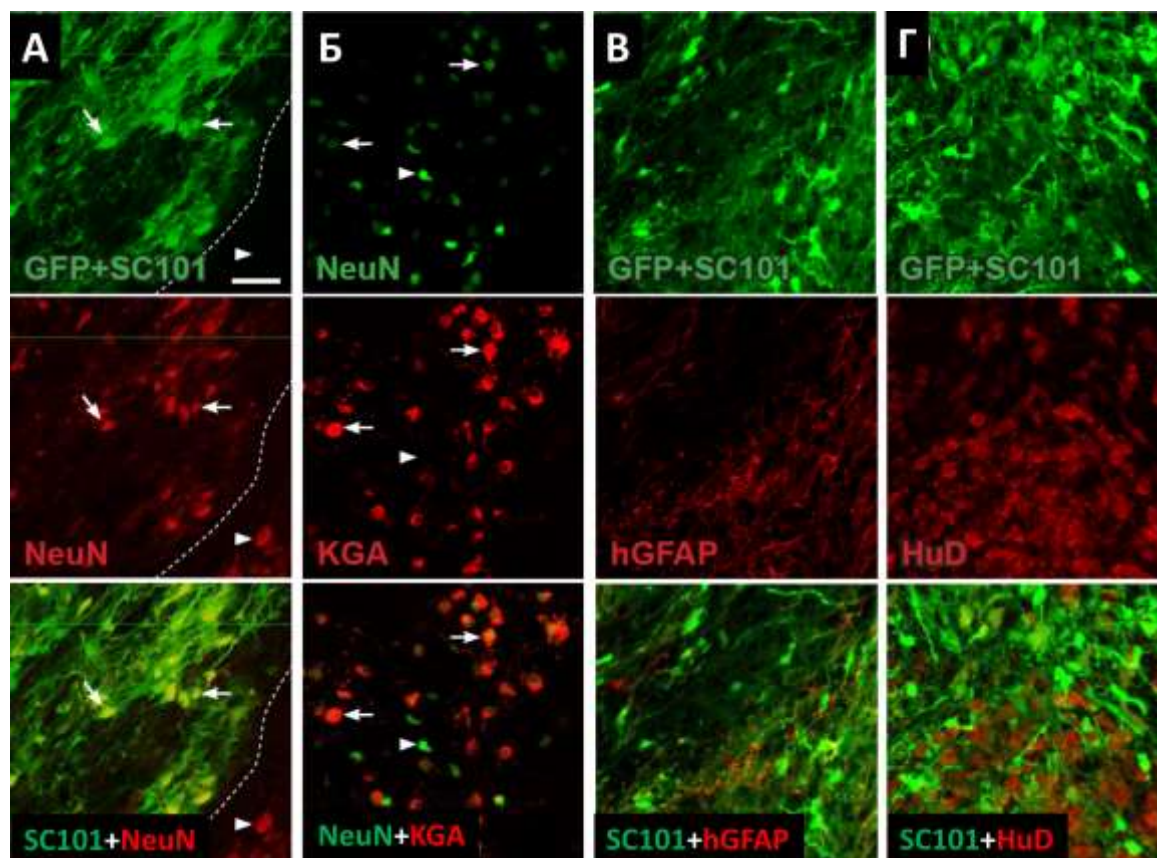


Рис. 9.4. Трансплантовані кортикальні НПК утворюють переважно збуджувальні нейрони. (А-Г) Конфокальні мікрофотографії, що демонструють експресії (червоний колір) NeuN (А), KGA (Б), GFAP людини (В) і HuD (Г) у трансплантованих SC101-позитивних клітинах (зелений колір) із трансплантатів, в яких робили реєстрацію електричних сигналів. (А) Стрілки вказують на двічі імунопозитивні клітини в зоні трансплантату, окреслену білою пунктирною лінією, а трикутник вказує на нейрон реципієнта поза зоною трансплантату, імунопозитивний лише на NeuN. (Б) Більшість трансплантованих NeuN-позитивних нейронів експресують маркер збуджуючих нейронів – KGA (вказано стрілками), трикутником вказано на NeuN+, але KGA- трансплантовану клітину. Шкала = 40 мкм.

Імунофарбування на маркер глютаматергічних збуджувальних нейронів KGA (kidney-type glutaminase) показало, що більшість з цих NeuN+ нейронів були KGA-позитивними ($89,3 \pm 2,7$ % від NeuN-позитивних клітин) (**Рис. 9.4Б**). Зрілі астроцити, імунореактивні до GFAP людини, були виявлені в невеликій кількості ($4,5 \pm 0,5$ % від SC101-позитивних клітин) (**Рис. 9.4В**). Значна частина трансплантованих клітин експресувала маркер незрілих нейронів HuD ($69,9 \pm 5,6$ % від SC101+ клітин) (**Рис. 9.4Г**).

Імуногістохімічне фарбування проти GFP і SC101 (**Рис. 9.4**) використовували для визначення об'єму, який займали трансплантовані клітини, і для створення 3D реконструкції морфології і розміщення GFP-позитивного трансплантату (**Рис. 9.1В**) [295]. У зоні трансплантату були виявлені такі клітини реципієнта: Іба-1-позитивні мікрогліальні клітини та GFAP-позитивні астроцити ($11,1 \pm 1,7$ % і $1,6 \pm 0,6$ % від загальної кількості клітин в зоні трансплантату, відповідно) (**Рис 9.5А,Б**). Абсолютна більшість NeuN+ зрілих нейронів у зоні трансплантату були SC101+ трансплантованими клітинами ($91,8 \pm 3,1$ % від NeuN+ клітин), і лише невеликий відсоток – нейронами реципієнта ($8,1 \pm 2,1$ % від NeuN+ клітин), причому більшість з них були розташовані на периферії трансплантату.

Для того, щоб підтвердити, що реєстрацію електричних сигналів після периферичної сенсорної стимуляції виконували з трансплантованих клітин, а не з невеликої кількості нейронів реципієнта, які перебувають в зоні трансплантату, робили детальний мікроскопічний аналіз трансплантату. У послідовних коронарних зрізах визначали розташування і кількість трансплантованих клітин і нейронів реципієнта, які перебували в безпосередній близькості від всіх ділянок реєстрації (**Рис. 9.5В,Г**).

Також вимірювали відстань між найближчим нейроном реципієнта і місцем запису (**Рис. 9.5В,Г**) [295].

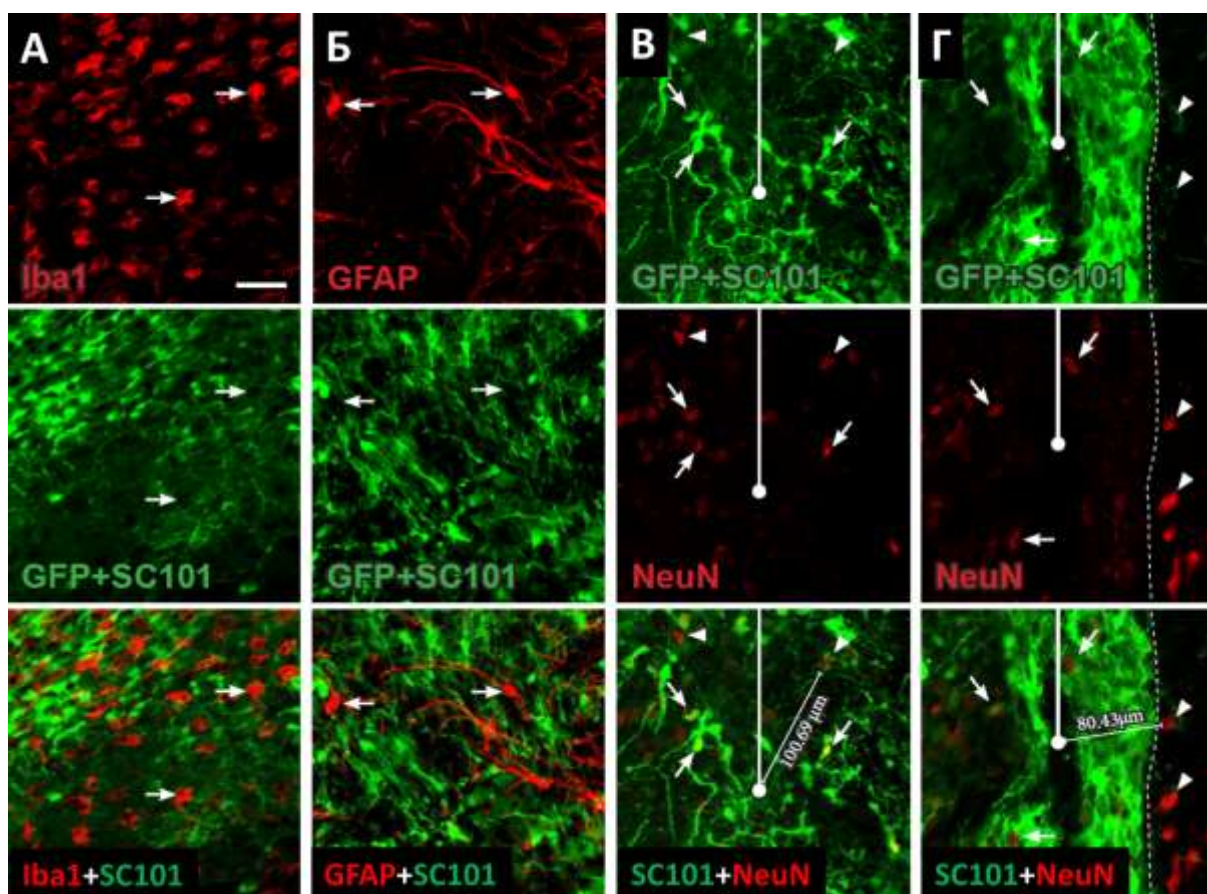


Рис. 9.5. Абсолютна більшість нейронів, розташованих близько до записуючого електрода, були трансплантованими клітинами. (А-Б) *Iba1*-позитивні мікрогліальні клітини (червоний колір, А) та *GFAP*-позитивні астроцити (червоний, Б) реципієнта (імунонегативні на ядерний маркер клітин людини *SC101*, зелений колір, стрілки) в зоні трансплантату. (В-Г) Конфокальні мікрофотографії, на яких показано два типові приклади місця введення записуючого електрода. Положення електрода позначено білим кружечком на кінці білої лінії, яка зображує слід від введеного електрода. Стрілки вказують на трансплантовані нейрони, а трикутники – на нейрони реципієнта. Зелений колір – *SC101*, червоний – *NeuN*. Зона трансплантату окреслена пунктирною білою лінією (Г). Відстань до найближчого нейрона реципієнта в обох прикладах представлена суцільною білою лінією. Шкала = 40 мкм.

Абсолютна більшість нейронів, що оточували електроди у зоні

реєстрації мала донорське походження (трансплантовані клітини). Лише в двох положеннях електродів, виявили нейрони реципієнта, розташовані ближче, ніж 70 мкм (69,3 і 22,1 мкм відповідно), а отже не можна повністю виключити можливість, що реєстрація була зроблена не з нейронів реципієнта в цих положеннях, і тому вони не були включені до аналізу початкової латентності.

Таким чином, відсутність будь-яких нейронів реципієнта в межах 70 мкм в інших положеннях електродів вказує на те, що записи електричних сигналів були зроблені з трансплантованих нейронів.

У наступній серії експериментів наші співавтори підтвердили функціональність аферентних входів від нейронів реципієнта вентрального таламуса до інтракортикально трансплантованих нейронів шляхом поєднання оптогенетики та методу петч-клемп.

Для перевірки придатності експериментального підходу чотирьом інтактним щурам робили ін'єкції вірусу, що експресує каналний родопсин-2 (ChR2), у вентральні ядра таламуса, які містили значну кількість трасованих нейронів.

Через десять днів після ін'єкції вірусу виготовляли фронтальні зрізи мозку та реєстрували струми від коркових нейронів, розташованих у соматосенсорній корі, методом петч-клемп у конфігурації ціла клітина. Сім із семи клітин кори головного мозку відповіли на фотостимуляцію (**Рис. 9.6А, Рис. 9.7А**).

На підставі електрофізіологічних характеристик цих клітин розрізняли як пірамідні нейрони (**Рис. 9.6А**), так і інтернейрони, що швидко розряджаються (fast-spiking) (**Рис. 9.7А**).

Потім викликали фокальну ішемію у дванадцяти щурів і через 48 годин інтракортикально трансплантували їм НПК, що експресують GFP. Через 2 місяці цим щурам робили ін'єкції вірусу, що експресує ChR2, у вентральні ядра таламуса.

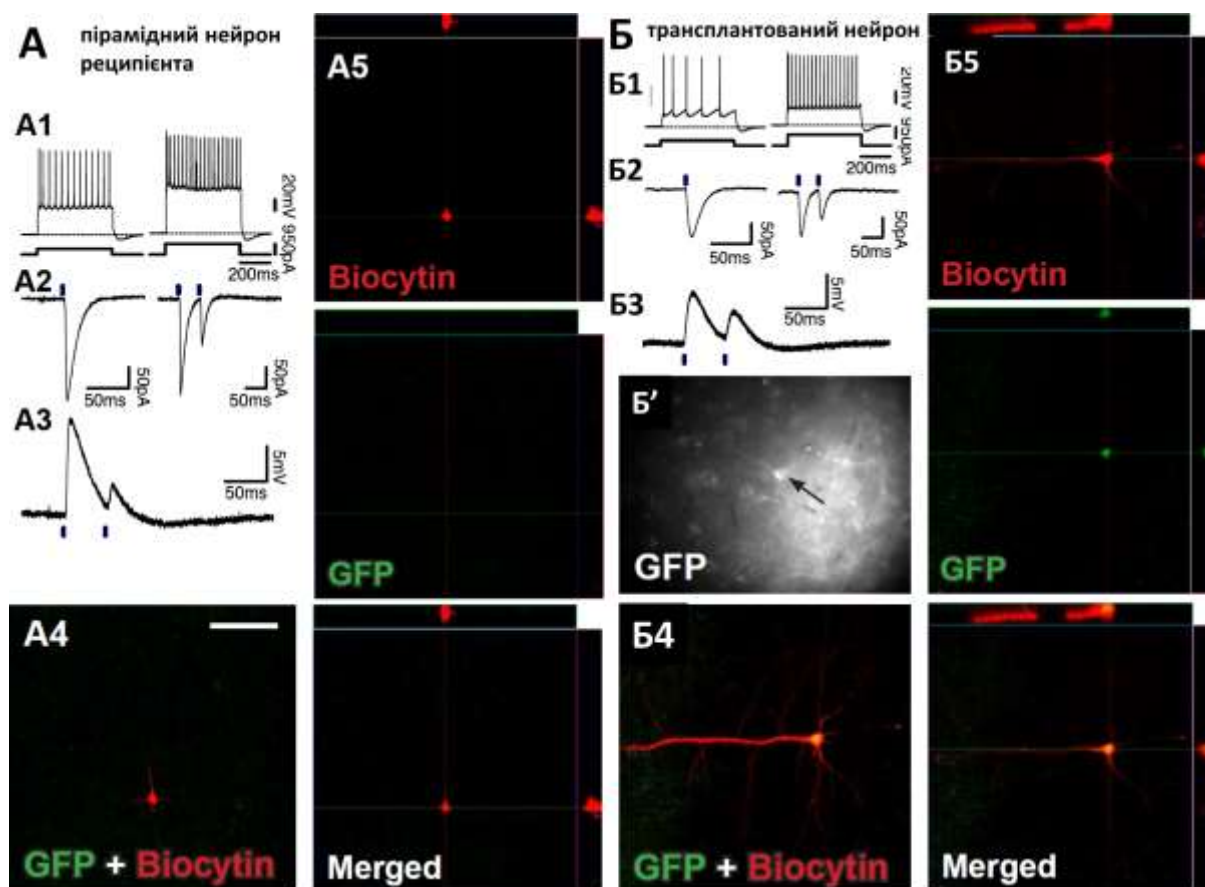


Рис. 9.6. Трансплантовані клітини, утворені з іПСК людини, з електрофізіологічними характеристиками пірамідних нейронів відповідають на оптогенетичну активацію аферентних аксонів таламуса. Реєстрація постсинаптичних струмів і потенціалів методом петч-клемпу нейрона реципієнта (А) і трансплантованого нейрона (Б). Реєстрація в режимі фіксації струму (current-clamp) (А1, Б1) показує, що клітини здатні генерувати потенціали дії при нанесенні прямокутних стимулів. Постсинаптичні струми (А2, Б2) і постсинаптичні потенціали (А3, Б3), викликані фотостимуляцією ChR2-експресуючих таламічних аферентних аксонів. Синя смуга вказує на початок фотостимуляції. Оптимальні (А4, Б4) та ортогональні проекції (А5, Б5) конфокальних зображень записаних клітин, імунофарбованих проти GFP і біоцитин. Мікрофото GFP+ клітини під час електрофізіологічних досліджень (Б'). Стрілка вказує на досліджувану клітину. Шкала = 100 мкм.

Між 10 і 34 днями після ін'єкції вірусу петч-клемп реєстрація

була зроблена на сомі трансплантованих GFP-позитивних клітин під час фотостимуляції таламічних претермінальних аксонів, які йдуть у соматосенсорну кору головного мозку, в тому числі у зону трансплантату.

З десяти клітин з електрофізіологічними характеристиками нейронів, дві записані клітини відповіли на фотостимуляцію (**Рис. 9.6Б, Рис. 9.7Б**). Одна з них показала повільну частоту потенціалів дії під час стимуляції (**Рис. 9.6Б1**), типову для глутаматергічних пірамідний нейронів, у той час як інша клітина мала швидко розряджувальну поведінку, типову для ГАМКергічних інтернейронів (**Рис. 9.7Б1**) [295]. Більшість нейронів, що не відповіли на фотостимуляцію, мали глутаматергічний фенотип. Морфологія і походження трансплантованих записаних нейронів, завантажених біоцитином, були оцінені за допомогою імуофарбування зрізів проти GFP (**Рис. 9.6Б, Рис. 9.7Б**).

Таким чином, були представлені експериментальні докази, які вперше демонструють, що інтракортикально трансплантовані нейральні прогенітори, утворені з іПСК людини, отримують прямі синаптичні входи від нейронів реципієнта ішемізованого мозку, і що ці аференти є функціональними.

По-перше, ми продемонстрували за допомогою імуно-електронно-мікроскопічного аналізу, що GFP-негативні аксони реципієнта утворювали синаптичні контакти на GFP-позитивних трансплантованих нейронах і більшість цих контактів мали ультраструктурні характеристики збуджувальних глутаматергічних синапсів.

По-друге, було продемонстровано за допомогою електрофізіологічної реєстрації відповідей на сенсорну стимуляцію передніх і задніх лап, а також носа, що синаптичні входи від значної кількості нейронів з іпси- та контралатеральної кори і різних ядер таламуса на трансплантовані нейрони є функціональними, і що ці нейрони інтегруються в нейрональні мережі реципієнта.

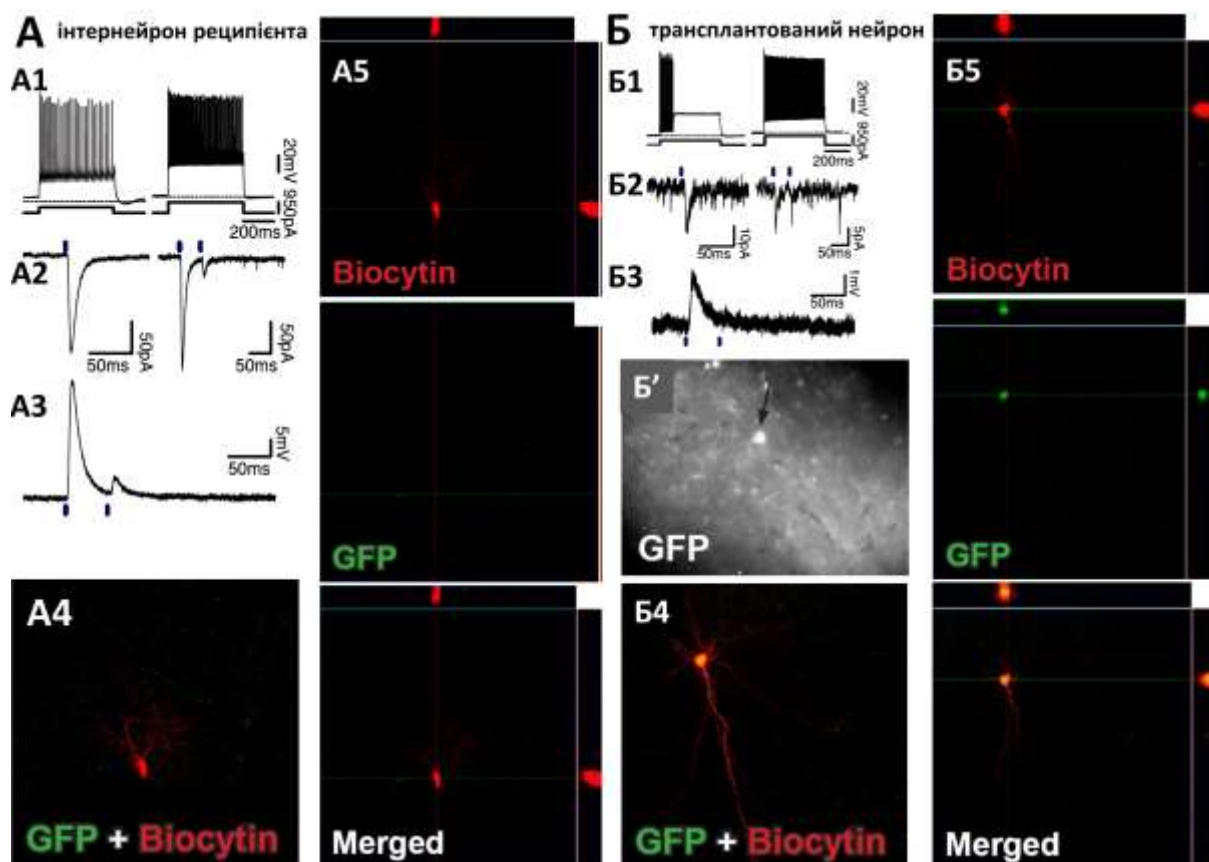


Рис. 9.7. Трансплантовані клітини, утворені з іПСК людини, з електрофізіологічними характеристиками інтернейронів, що швидко розряджаються, відповідають на оптогенетичну активацію аферентних аксонів таламуса. Реєстрація постсинаптичних струмів і потенціалів методом петч-клемпу нейрона реципієнта (А) і трансплантованого нейрона (Б). Реєстрація в режимі фіксації струму (current-clamp) (А1, Б1) показує, що клітини здатні генерувати потенціали дії при нанесенні прямокутних стимулів. Постсинаптичні струми (А2, Б2) і постсинаптичні потенціали (А3, Б3), викликані фотостимуляцією ChR2-експресуючих таламічних аферентних аксонів. Синя смуга вказує на початок фотостимуляції. Оптимальні (А4, Б4) та ортогональні проекції (А5, Б5) конфокальних зображень записаних клітин, імунофарбованих проти GFP і біоцитин. Мікрофотографії GFP аутофлюоресценції трансплантованих клітин під час електрофізіологічних досліджень (Б'). Стрілка вказує на досліджувану клітину. Шкала = 100 мкм.

По-третє, було запропоновано додаткові докази щодо

функціональності аферентних входів, і, використовуючи оптогенетику та метод петч-клемпу на зрізах головного мозку, показано, що трансплантовані нейрони реагують на фотостимуляцію таламо-кортикальних аксонів, експресуючих ChR2.

Ці дані свідчать про те, що більшість електрофізіологічних записів *in vivo* у відповідь на сенсорну стимуляцію були зроблені саме з трансплантованих нейронів.

Викликані постсинаптичні потенціали, від 102 до 463 мкВ, були зареєстровані у центральній частині трансплантатів з мінімальною відстанню до межі трансплантату від 70 до 175 мкм. Не було знайдено нейронів реципієнта в межах 70 мкм від місць реєстрації. Відомо, що при позаклітинній реєстрації потенціали дії можуть бути розрізнені від фонового шуму на відстані від клітини приблизно до 50 мкм [290]. Слід зазначити, що ця відстань застосовується до функціональних одиниць з найнижчими амплітудами.

Реєстрація одиниць з великими амплітудами може бути отримана на набагато меншій відстані. У наших експериментах трансплантовані нейрони отримували збуджувальний тактильний стимул, перш за все, з носа, і лише деякі нейрони отримували з однієї з чотирьох лап. Також спостерігалось гальмування спонтанної активності шляхом стимуляції лап і носа.

Отримані дані вказують на формування функціональних зв'язків, які можуть викликати потенціали дії або інгібувати спонтанну активність у трансплантованих нейронах у відповідь на фізіологічну стимуляцію шкіри. Характеристики викликаних відповідей, які спостерігали у трансплантованих нейронах, нагадують вхідні характеристики, описані раніше, у соматосенсорній корі нативних щурів, зокрема, в інфраламінарній корі у нативних щурів [339]. Однак, з огляду на те, що кортикальна зона, де були розміщені трансплантати, як правило, отримує

сильні збуджувальні входи від контралатеральної передньої та задньої кінцівок, відносна відсутність збуджувальних входів у наших експериментах з цих частин тіла вказує на те, що нормальна соматотопічна організація була відновлена не повністю.

Раніше були отримані непрямі експериментальні докази того, що нейральні клітини, трансплантовані в мозок після ішемічного ушкодження здатні реагувати на фізіологічні подразники через аферентні входи. Grabowski та інші [108] показали, що стимуляція зони вібрисів викликає більш високе поглинання глюкози в інтракортикальних трансплантатах ембріональної кортикальної тканини у щурів після ішемічного пошкодження кори.

На інших моделях, в яких використовували інтракортикальні трансплантати ембріональної тканини мозку миші або кортикальні нейрони людини, утворені з ембріональних стовбурових клітин, було показано, що мозок реципієнта може впливати на активність трансплантованих нейронів. Bragin та інші зазначають, що більшість нейронів, утворених з ембріональної соматосенсорної кори, які були трансплантовані у стовпчасту кору (barrel cortex) дорослого щура, відповідали на зміщення вібрисів нормальними діапазонами латентності [35].

Girman і Golovina виявили, що більшість нейронів, утворених з ембріональної потиличної кори щурів і трансплантованих у первинну зорову кору дорослих щурів, відповідали на візуальні стимули [104]. Michelsen та інші трансплантували кортикальні нейрони, утворені з ембріональних стовбурових клітин миші, у зорову кору дорослих мишей з нейротоксин-індукованим ураженням [195]. Вони показали, що нейрони реципієнта формували синаптичні контакти з трансплантованими нейронами і ін'єкція антероградної мітки в колінчасте ядро або контралатеральну зорову кору спричиняла мічення волокон всередині

трансплантату. Трансплантовані нейрони також відповідали на світлову стимуляцію [195].

Відповідно до попередніх досліджень з використанням кортикальних ембріональних стовбурових клітин миші [96], Michelsen та інші [195] представили докази того, що кількість еферентів і аферентів та рівень функціональної інтеграції нейронів, утворених з мишачих ембріональних стовбурових клітин, після трансплантації їх у головний мозок дорослих мишей, залежать, в основному, від ступеня ідентичності між трансплантованими клітинами і нейронами пошкодженої кори головного мозку.

У нашій роботі ми показали можливість утворення великої кількості зв'язків, у тому числі відповідних таламічних входів, та функціональну інтеграцію трансплантованих нейронів у соматосенсорну кору щурів після фокальної ішемії мозку. Ці дані свідчать про те, що ці ксенотрансплантовані клітини людини, перетворювалися у нейрони з кортикальним фенотипом, і ставали ідентичними до коркових нейронів соматосенсорної кори.

Наші результати вказують на те, що встановлення прямих синаптичних входів на трансплантованих нейронах, наприклад, від вентральних і задніх ядер таламуса і контралатеральної кори, сприяло функціональному відновленню пошкодженої соматосенсорної кори через 8 тижнів після трансплантації. У цей проміжок часу, більшість клітин у трансплантаті експресували маркери незрілих і зрілих нейронів, а також були виявлені еферентних проекцій в іпси- та контралатеральну кору [296]. Проте, основний механізм функціонального відновлення через 8 тижнів після трансплантації, ймовірно, пов'язаний не з заміною ушкоджених нейронів і структурною інтеграцією трансплантованих клітин, а з іншими чинниками, такими як модуляція запалення і трофічні фактори [296]. Швидше за все, функціональне відновлення за рахунок структурної

інтеграції трансплантованих нейронів і відновлення нейронних мереж розвивається більш повільно, сягаючи свого максимуму в більш пізні терміни, і відіграє лише незначну роль через 8 тижнів після трансплантації.

Через 5 місяців після трансплантації інтегровані клітини уже мали електрофізіологічні властивості зрілих нейронів [296]. Ілюструючи повільний і тривалий розвиток трансплантованих нейронів людини, Espuny-Camacho та ін. зазначають, що рівень іннервації мозку реципієнта нейронами, утвореними з ембріональних стовбурових клітин людини і трансплантованими в неонатальну кору миші, помітно зростає у проміжок від 2 до 6 місяців [82].

Аналогічним чином, коли нейрони, утворені з культури нейроепітеліальних клітин людини, були трансплантовані в гіпокамп щурів або на органотипову культуру зрізів гіпокампа миші, то оптогенетична стимуляція нейронів реципієнта виявляла більш зрілі властивості трансплантованих клітин і значну кількість синаптичних аферентів через 6 місяців у порівнянні з 6 тижнями [14].

Отримані нами результати варто також розглядати з клінічної точки зору. Ми продемонстрували, що кортикальні нейрони, утворені з перепрограмованих дорослих соматичних клітин людини, отримують прямі аферентні синаптичні входи від відповідних ділянок мозку після ішемічного ушкодження, адекватно реагують на сенсорну стимуляцію, а також утворюють численні проекції до інших ділянок головного мозку.

Таким чином, трансплантовані нейрони стають морфологічно і функціонально інтегрованими в нейронні мережі реципієнта після ішемічного ушкодження мозку. Залишається однак продемонструвати, що цей механізм відновлення функціональних порушень буде працювати і на більш пізніх строках після інсульту.

Незважаючи на те, що наші дослідження - це лише перший крок до клінічних випробувань, вони вже демонструють значний потенціал

функціонального відновлення втрачених функцій шляхом трансплантації НПК у соматосенсорну кору, що може стати майбутнім перспективним терапевтичним підходом у лікуванні наслідків ішемічного інсульту.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено детальний аналіз впливу трансплантації стовбурових клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини головного мозку та поведінкові феномени на різних моделях ішемічного ушкодження як у новонароджених, так і у дорослих тварин. За матеріалами дисертаційної роботи зроблено такі висновки:

1. Стереотаксична трансплантація суспензії фетальної нервової тканини в СА1 зону гіпокампа щурів через 30 діб після ішемії сприяє відновленню цитоархітектоніки гіпокампа навіть у тривалі строки після трансплантації (до 6 міс) шляхом зростання лінійної щільності нейронів (до 150 (128–168) кл/мм порівняно із групою ішемії – 134 (117–154) кл/мм, $U = 1414$, $U_p = 1920$, $P = 0,012$) у пірамідному шарі та ширини променистого шару (до 582 ± 130 мкм порівняно із групою ішемії – 432 ± 108 мкм, $t = -7,88$, $t_{crit} = 1,65$, $P < 1 \times 10^{-9}$), а також зменшення реактивного астрогліозу.
2. На моделі глобальної короткотривалої ішемії головного мозку мишей показано, що субокципітально трансплантовані фетальні GFP-позитивні нейральні прогеніторні клітини здатні мігрувати в ушкоджені ділянки зони СА1 гіпокампа, диференціюватися як в астроцити, так і в зрілі нейрони та виживати у мозку ішемізованих тварин як мінімум 90 діб після трансплантації. Нейрони, утворені з GFP-позитивних трансплантованих нейральних прогеніторів, здатні формувати як пост-, так і пресинаптичні структури з GFP-негативними нейронами реципієнта.
3. Нейральні прогеніторні клітини, трансплантовані в гіпокамп ішемізованих мишей, здатні стимулювати ендогенний нейрогенез (збільшувати кількість BrdU-позитивних вдвічі та DCX-позитивних клітин

у 1,6 рази порівняно із ішемізованими тваринами) у субгранулярній зоні зубчастої звивини.

4. Стереотаксична трансплантація нейральних прогеніторних клітин сприяє покращенню просторової пам'яті у тварин після ішемічного ушкодження мозку (час пошуку платформи у лабіринті Морріса зменшувався з $36 \pm 2,3$ с у ішемізованих тварин до $28,8 \pm 1,4$ с ($P < 0,05$) – у групі тварин з ішемією плюс трансплантація нейральних прогеніторів, але не сягав контрольних значень – $24,3 \pm 2,7$ с ($P < 0,05$)).

5. На *in vivo* моделі ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярній лейкомаляції – показано, що сингенна стереотаксична трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) сприяє відновленню кортикоспинальної функції у тварин після перивентрикулярної лейкомаляції, зменшує деградацію основного білка мієліну і гальмує розвиток астро- та мікрогліозу.

6. З використанням розробленої нами *in vitro* моделі перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші показано, що ММСК гальмують розвиток реактивного гліозу та збільшують кількість олігодендроцитів (інтегральна щільність флюоресценції Rir-позитивного сигналу – $4,0 \pm 1,1$ у.о. у порівнянні з групою ПВЛ ($1,9 \pm 0,4$ у.о., $P < 0,05$) шляхом безконтактної взаємодії зі зрізами головного мозку.

7. Надекспресія FGF-2 у нейральних прогеніторних клітинах сприяє їх тісному контакту з судинною мережею та формуванню навколосудинних BrdU-позитивних спіралеподібних проліферативних кластерів. Трансплантовані FGF-2-трансформовані нейральні прогенітори переважно

контактують з венулами на ділянках, вкритих астроцитними ніжками, та уникають контактів із перицитами. При цьому виявлено, що трансплантовані FGF-2-трансформовані нейральні прогенітори утворюють пул незрілих DCX-позитивних нейронів у відповідь на ішемічне ушкодження мозку.

8. Ендогенні нейральні прогеніторні клітини, трансформовані в напрямку надекспресії EMMPRIN, мігрують із субвентрикулярної зони у пошкоджену соматосенсорну кору далі порівняно із контрольними клітинами та утворюють популяцію нейральних прогеніторів у пошкодженій ділянці кори.

9. З використанням імуно-електронно-мікроскопічного аналізу показано, що GFP-негативні аксони реципієнта формують синаптичні контакти на GFP-позитивних трансплантованих нейронах, утворених з іПСК людини, і більшість з цих контактів мають ультраструктурні характеристики збуджувальних глутаматергічних синапсів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745–56.
2. Agrawal SM, Lau L, Yong VW. MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19(1):42–51.
3. Agrawal SM, Yong VW. The many faces of EMMPRIN-Roles in neuroinflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812:213–9.
4. Aguirre A, Rubio ME, Gallo V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature*. 2010;467(7313):323–7.
5. Ahn SY, Chang YS, Park WS. Mesenchymal stem cells transplantation for neuroprotection in preterm infants with severe intraventricular hemorrhage. *Korean J Pediatr*. 2014;57(6):251–6.
6. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*. 1962;135(3509):1127–8.
7. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: Maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*. 2004;41:683–6.
8. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press; 2007.
9. Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, Cifelli P, Galié M, Sbarbati A, et al. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17(5):909–16.
10. Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*. 2004;41:881–90.
11. Apple DM, Solano-Fonseca R, Kokovay E. Neurogenesis in the aging brain. *Biochem Pharmacol*. 2017;141:77–85.
12. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal

- replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.* 2002;8(9):963–70.
13. Auerbach JM, Eiden MV, McKay RD. Transplanted CNS stem cells form functional synapses *in vivo*. *Eur J Neurosci.* 2000;12:1696–704.
 14. Avaliani N, Sorensen AT, Ledri M, Bengzon J, Koch P, Brustle O, et al. Optogenetics reveal delayed afferent synaptogenesis on grafted human-induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors. *Stem Cells.* 2014;32(12):3088–98.
 15. Avignone E, Frenguelli BG, Irving AJ. Differential responses to NMDA receptor activation in rat hippocampal interneurons and pyramidal cells may underlie enhanced pyramidal cell vulnerability. *Eur J Neurosci.* 2005;22:3077–90.
 16. Babu H, Claasen H, Kannan S, Rünker AE, Palmer T, Kempermann G. A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. *Front Neurosci.* 2011;5:article 89.
 17. Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, Morris RGM. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature.* 1995;378:182–6.
 18. Bayer SA. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol.* 1980;190(1):87–114.
 19. Beaulieu C. Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. *Brain Res.* 1993;609:284–92.
 20. Bendfeldt K, Radojevic V, Kapfhammer J, Nitsch C. Basic fibroblast growth factor modulates density of blood vessels and preserves tight junctions in organotypic cortical cultures of mice: A new *in vitro* model of the blood-brain barrier. *J Neurosci.* 2007;27:3260–7.
 21. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al.

- American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135(10):e146–e603.
22. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem*. 1984;43:1369–74.
 23. Berger R, Söder S. Neuroprotection in Preterm Infants. *BioMed Res Inter*. 2015; 2015:14 pages.
 24. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*. 2005;7:452–64.
 25. Bingham B, Liu D, Wood A, Cho S. Ischemia-stimulated neurogenesis is regulated by proliferation, migration, differentiation and caspase activation of hippocampal precursor cells. *Brain Res*. 2005;1058:167–77.
 26. Björklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci*. 2000; 3(6):537–44.
 27. Bjornsson CS, Apostolopoulou M, Tian Y, Temple S. It Takes a Village: Constructing the Neurogenic Niche. *Dev Cell* 2015;32:435–46.
 28. Blakemore WF, Franklin RJ. Transplantation options for therapeutic central nervous system remyelination. *Cell Transplant*. 2000;9(2):289-94.
 29. Bliss TM, Kelly S, Shah AK, Foo WC, Kohli P, Stokes C, et al. Transplantation of hNT neurons into the ischemic cortex: cell survival and effect on sensorimotor behavior. *J Neurosci Res*. 2006;8:1004–14.
 30. Bohl D, Liu S, Blanchard S, Hocquemiller M, Haase G, Heard JM. Directed evolution of motor neurons from genetically engineered neural precursors. *Stem Cells*. 2008;26:2564–75.
 31. Boitard M, Bocchi R, Egervari K, Petrenko V, Viale B, Gremaud S, et al. Wnt signaling regulates multipolar-to-bipolar transition of migrating

- neurons in the cerebral cortex. *Cell Rep.* 2015;10(8):1349–61.
32. Bonanni L1, Chachar M, Jover-Mengual T, Li H, Jones A, Yokota H, et al. Zinc-dependent multi-conductance channel activity in mitochondria isolated from ischemic brain. *J Neurosci.* 2006;26:6851–62.
 33. Bonn D. First cell transplant aimed to reverse stroke damage. *Lancet.* 1998;352(9122):119.
 34. Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke.* 2004;35(10):2385–9.
 35. Bragin AG, Bohne A, Vinogradova OS. Transplants of the embryonal rat somatosensory neocortex in the barrel field of the adult rat: responses of the grafted neurons to sensory stimulation. *Neuroscience.* 1988;25(3):751–8.
 36. Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, et al. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci.* 2003;24:603–13.
 37. Bredt DS. Nitric oxide signaling in brain: potentiating the gain with YC-1. *Mol Pharmacol.* 2003;63(6):1206–8.
 38. Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, et al. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2003;17(10):2042–6.
 39. Brüstle O. Building brains: neural chimeras in the study of nervous system development and repair. *Brain Pathol.* 1999;9(3):527–45.
 40. Buddle M, Eberhardt E, Ciminello LH, Levin T, Wing R, DiPasquale K, et al. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) associates with the NMDA receptor and is spatially redistributed within rat hippocampal neurons after oxygen-glucose deprivation. *Brain Res.* 2003;978:38–50.

41. Calabrese V, Boyd-Kimball D, Scapagnini G, Butterfield DA. Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. *In Vivo*. 2004;18:245–27.
42. Calabresi P, Centonze D, Cupini LM, Costa C, Pisani F, Bernardi G. Ionotropic glutamate receptors: still a target for neuroprotection in brain ischemia? Insights from in vitro studies. *Neurobiol Dis*. 2003;12(1):82–8.
43. Candelario-Jalil E, Gonzalez-Falcon A, Garcia-Cabrera M, Alvarez D, Al Dalain S, Martinez G, et al. Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. *J Neurochem*. 2003;86:545–55.
44. Castro-Alamancos MA, Donoghue JP, Connors BW. Different forms of synaptic plasticity in somatosensory and motor areas of the neocortex. *J Neurosci*. 1995;15:5324–33.
45. Chavali PL, Saini RK, Matsumoto Y, Ågren H, Funa K. Nuclear orphan receptor TLX induces Oct-3/4 for the survival and maintenance of adult hippocampal progenitors upon hypoxia. *J Biol Chem*. 2010;286:9393–404.
46. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(8):1505–17.
47. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, et al. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci*. 1998;18:4914–28.
48. Chen J, Xu ZC, Xu XM, Zhang JH. Animal models of acute neurological injuries. Humana Press; 2009.
49. Chenn A, Walsh CA. Regulation of cerebral cortical size by control of

- cell cycle exit in neural precursors. *Science*. 2002;297:365–69.
50. Chernykh ER, Kafanova MY, Shevela EY, Sirota SI, Adonina EI, Sakhno LV, et al. Clinical experience with autologous M2 macrophages in children with severe cerebral palsy. *Cell Transplant*. 2014; 23 Suppl 1:S97–104.
 51. Cho JM, Shin YJ, Park JM, Kim J, Lee MY. Characterization of nestin expression in astrocytes in the rat hippocampal CA1 region following transient forebrain ischemia. *Anat Cell Biol*. 2013;46:131–40.
 52. Cho T, Bae JH, Choi HB, Kim SS, McLarnon JG, Suh-Kim H, et al. Human neural stem cells: electrophysiological properties of voltage-gated ion channels. *Neuroreport*. 2002;13(43):1447–52.
 53. Choi JH, Yoo KY, Lee CH, Park JH, Yan BC, Kwon SH, et al. Comparison of neurogenesis in the dentate gyrus between the adult and aged gerbil following transient global cerebral ischemia. *Neurochem Res*. 2012;37(4):802–10.
 54. Chu K, Kim M, Jeong SW, Kim SU, Yoon BW. Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett*. 2003;343(2):129–33.
 55. Chu X, Fu X, Zou L, Qi C, Li Z, Rao Y, et al. Oncosis, the possible cell death pathway in astrocytes after focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2007;1149:157–64.
 56. Clowry GJ, Basuodan R, Chan F. What are the best animal models for testing early intervention in cerebral palsy? *Frontiers in Neurology*. 2014;5:article 258.
 57. Colbourne F, Sutherland GR, Auer RN. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. *J Neurosci*. 1999;19:4200–10.
 58. Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, et

- al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells*. 2009;27(10):2624–35.
- 59.Costa A, Poma A, Navarra P, Forsling ML, Grossman A. Gaseous transmitters as new agents in neuroendocrine regulation. *J Endocrinol*. 1996;149(2):199–207.
- 60.Coulombel L. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene*. 2004;23(43):7210–22.
- 61.Cui XP, Xing Y, Chen JM, Dong SW, Ying DJ, Yew DT. Wnt/beta-catenin is involved in the proliferation of hippocampal neural stem cells induced by hypoxia. *Ir J Med Sci*. 2010;180:387–93.
- 62.Czeh M, Gressens P, Kaindl AM. The yin and yang of microglia. *Dev Neurosci*. 2011; 33(3-4):199–209.
- 63.Damjanov I. Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis. *Int J Dev Biol*. 1993;37(1):39–46.
- 64.Darsalia V, Allison SJ, Cusulin C, Monni E, Kuzdas D, Kallur T, et al. Cell number and timing of transplantation determine survival of human neural stem cell grafts in stroke-damaged rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31:235–42.
- 65.Darsalia V, Kallur T, Kokaia Z. Survival, migration and neuronal differentiation of human fetal striatal and cortical neural stem cells grafted in stroke-damaged rat striatum. *Eur J Neurosci*. 2007;26:605–14.
66. Davenport RJ, Dennis MS, Wellwood I, Warlow CP. Complications after acute stroke. *Stroke*. 1996;27(3):415–20.
- 67.David T, Laidley D., Colbourne F. Increased behavioral and histological variability arising from changes in cerebrovascular anatomy of the Mongolian Gerbil. *Cur Neurovasc Res*. 2005;2(5):1–7.
- 68.Dayer AG, Jenny B, Sauvain MO, Potter G, Salmon P, Zraggen E, et al.

- Expression of FGF-2 in neural progenitor cells enhances their potential for cellular brain repair in the rodent cortex. *Brain*. 2007;130(Pt 11):2962–76.
69. Decimo I, Bifari F, Krampera M, Fumagalli G. Neural stem cell niches in health and diseases. *Curr Pharm Des*. 2012;18(13):1755–83.
 70. Deng W, Pleasure J, Pleasure D. Progress in periventricular leukomalacia. *Arch Neurol*. 2008;65(10):1291–5.
 71. Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, Phillips N, Kay MA, Eiermann T, Phan TT, Volk HD, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20:655–667.
 72. Dietrich WD, Ginsberg MD, Busto R, Watson BD, Yoshida S. Vascular aspects and hemodynamic consequences of central nervous system injury. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1986;3:265–80.
 73. Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2003;13:543–50.
 74. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2003;6:1127–34.
 75. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–17.
 76. Dong J, Liu B, Song L, Lu L, Xu H, Gu Y. Neural stem cells in the ischemic and injured brain: endogenous and transplanted. *Cell Tissue Bank*. 2012;13(4):623–9.
 77. Drew LJ, Fusi S, Hen R. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus? *Learn Mem*. 2013;20(12):710–29.
 78. Duan H, Song W, Zhao W, Gao Y, Yang Z, Li X. Endogenous neurogenesis in adult mammals after spinal cord injury. *Sci China Life*

- Sci. 2016;59(12):1313–8.
- 79.Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience*. 2009;158(3):1021–9.
 - 80.Englund U, Bjorklund A, Wictorin K, Lindvall O, Kokaia M. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:17089–94.
 - 81.Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998;4(11):1313–17.
 - 82.Espuny-Camacho I, Michelsen Kimmo A, Gall D, Linaro D, Hasche A, Bonnefont J, et al. Pyramidal Neurons Derived from Human Pluripotent Stem Cells Integrate Efficiently into Mouse Brain Circuits In Vivo. *Neuron*. 2013;77(3):440–56.
 - 83.European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg. 1986:48.
 - 84.Faissner A, Reinhard J. The extracellular matrix compartment of neural stem and glial progenitor cells. *Glia*. 2015;63(8):1330–49.
 - 85.Fang JD, Chou HC, Tung HH, Huang PY, Lee SL. Endogenous expression of matriptase in neural progenitor cells promotes cell migration and neuron differentiation. *J Biol Chem*. 2011;286(7):5667–79.
 - 86.Feldmeyer D, Brecht M, Helmchen F, Petersen CC, Poulet JF, Staiger JF, et al. Barrel cortex function. *Prog Neurobiol*. 2013;103:3–27.
 - 87.Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, et al. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*. 2000;28(1):41–51.
 - 88.Field PM, Seeley PJ, Frotscher M, Raisman G. Selective innervation of embryonic hippocampal transplants by adult host dentate granule cell axons. *Neuroscience*. 1991; 41(2-3):713–27.

- 89.Fineschi V, Viola RV, La Russa R, Santurro A, Frati P. A Controversial Medicolegal Issue: Timing the Onset of Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:6024959.
- 90.Finsen BR, Sørensen T, Castellano B, Pedersen EB, Zimmer J. Leukocyte infiltration and glial reactions in xenografts of mouse brain tissue undergoing rejection in the adult rat brain. A light and electron microscopical immunocytochemical study. *J Neuroimmunol.* 1991;32(2):159–83.
- 91.Fisher M, Takano K. The penumbra, therapeutic time window and acute ischaemic stroke. *Baillieres Clin Neurol.* 1995;4(2):279–95.
- 92.Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3445–54.
- 93.Ford-Perriss M, Abud H, Murphy M. Fibroblast growth factors in the developing central nervous system. *Clin Exp Pharm Physiol.* 2001;28(7):493–503.
- 94.Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004;116:769–78.
- 95.Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie,* 2005;87(3-4):361–8.
- 96.Gaillard A, Prestoz L, Dumartin B, Cantereau A, Morel F, Roger M, et al. Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons. *Nat Neurosci.* 2007;10(10):1294–9.
- 97.Gano D, Andersen SK, Partridge JC, Bonifacio SL, Xu D, Glidden DV, et al. Diminished white matter injury over time in a cohort of premature newborns. *J Pediatr.* 2015;166(1):39–43.
- 98.Garashchuk OV, Tsupikov OM, Tsymbaliuk VI. Impact of late transplantation of fetal neural tissue on hippocampal cytoarchitectonics in

- remote period after transient global cerebral ischemia in rats. *Int J Phys Pathophysiol.* 2012;3(1):39–52.
99. Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Neural stem cell niches and homing: recruitment and integration into functional tissues. *ILAR J.* 2009;51;3–23.
 100. Gates MA, Thomas LB, Howard EM, Laywell ED, Sajin B, Faissner A, et al. Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. *J Comp Neurol.* 1995;361:249–66.
 101. Giachino C, Taylor V. Notching up neural stem cell homogeneity in homeostasis and disease. *Front Neurosci.* 2014;8:32.
 102. Gil-Perotín S, Duran-Moreno M, Cebrián-Silla A, Ramírez M, García-Belda P, García-Verdugo JM. Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anat Rec (Hoboken).* 2013;296(9):1435–52.
 103. Ginsberg MD, Pulsinelli WA. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol.* 1994;36(4):553–4.
 104. Girman SV, Golovina IL. Electrophysiological properties of embryonic neocortex transplants replacing the primary visual cortex of adult rats. *Brain Res.* 1990;523(1):78–86.
 105. Goldman SA, Nottebohm F. Neuronal production, migration, and differentiation in vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80:2390–94.
 106. Gonzalez AM, Berry M, Maher PA, Logan A, Baird A. A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. *Brain Res.* 1995;701(1-2):201–26.
 107. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E.. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by

- psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 1997;17:2492–8.
108. Grabowski M, Brundin P, Johansson BB. Functional integration of cortical grafts placed in brain infarcts of rats. *Ann Neurol.* 1993;34(3):362–8.
 109. Gubellini P, Bisso GM, Ciofi-Luzzatto A, Fortuna S, Lorenzini P., Michalek H, et al. Ubiquitin-mediated stress response in a rat model of brain transient ischemia/hypoxia. *Neurochem Res.* 1997;22:93–100.
 110. Hahn JN, Kaushik DK, Yong VW. The role of EMMPRIN in T cell biology and immunological diseases. *J Leukoc Biol* 2015;98:33–48.
 111. Hao JL, Cozzi PJ, Khatri A, Power CA, Li Y. CD147/EMMPRIN and CD44 are potential therapeutic targets for metastatic prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10(3):287–306.
 112. Haobam R, Tripathy D, Kaidery NA, Mohanakumar KP. Embryonic stem cells derived neuron transplantation recovery in models of parkinsonism in relation to severity of the disorder in rats. *Rejuvenation Res.* 2015;18(2):173–84.
 113. Harris KM, Kater SB. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annual review of neuroscience.* 1994;17:341–71.
 114. Harry GJ, Lefebvre d'Hellencourt C. Dentate gyrus: alterations that occur with hippocampal injury. *Neurotoxicology.* 2003;24:343–56.
 115. Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol.* 1999;46:867–77.
 116. Heyes MP, Saito K, Chen CY, Proescholdt MG, Nowak TS Jr, Li J et al. Species heterogeneity between gerbils and rats: quinolate production by microglia and astrocytes and accumulations in response to ischemic brain injury and systemic immune activation. *J Neurochem.*

- 1997;69(4):1519–29.
117. Hillis AE. Acute ischemic stroke. In: Johnson RT, Griffin J, McArthur J, editors. *Current Therapy in Neurologic Disease* (7th edition). St. Louis, MO: Mosby; 2005. p. 213–7.
 118. Hirabayashi Y, Gotoh Y. Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain. *Neurosci Res.* 2005;51:331–6.
 119. Hirota Y, Sawada M, Huang SH, Ogino T, Ohata S, Kubo A, et al. Roles of Wnt signaling in the neurogenic niche of the adult mouse ventricular-subventricular zone. *Neurochem Res.* 2016;41(1-2):222–30.
 120. Hodges H, Nelson A, Virley D, Kershaw TR, Sinden JD. Cognitive deficits induced by global cerebral ischaemia: prospects for transplant therapy. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997;56(4):763–80.
 121. Hodges H, Sowinski P, Fleming P, Kershaw TR, Sinden JD, Meldrum BS, et al. Contrasting effects of fetal CA1 and CA3 hippocampal grafts on deficits in spatial learning and working memory induced by global cerebral ischaemia in rats. *Neuroscience.* 1996;72(4):959–88.
 122. Hoffmann MC, Nitsch C, Scotti AL, Reinhard E, Monard D. The prolonged presence of glia-derived nexin, an endogenous protease inhibitor, in the hippocampus after ischemia-induced delayed neuronal death. *Neuroscience.* 1992;49:397–408.
 123. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol.* 1994;36(4):557–65.
 124. Houghton BC, Booth C, Thrasher AJ. Lentivirus technologies for modulation of the immune system. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;24:119–27.
 125. Hsu M, Sik A, Gallyas F, Horváth Z, Buzsáki G. Short-term and long-term changes in the postischemic hippocampus. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;743:121–39.

126. Humpel C. Organotypic brain slice cultures: a review. *Neuroscience*. 2015;305:86–98.
127. Iannotti F, Crockard A, Ladds G, Symon L. Are prostaglandins involved in experimental ischemic edema in gerbils? *Stroke*. 1981;12(3):301–6.
128. Isaacs JD, Burrows N, Wing M, Keogan MT, Rebello PR, Watts RA, et al. Humanized anti-CD4 monoclonal antibody therapy of autoimmune and inflammatory disease. *Clin Exp Immunol*. 1997;110(2):158–66.
129. Ishimaru H, Casamenti F, Uéda K, Maruyama Y, Pepeu G. Changes in presynaptic proteins, SNAP-25 and synaptophysin, in the hippocampal CA1 area in ischemic gerbils. *Brain Res*. 2001;903(1-2):94–101.
130. Isik S, Zaim M, Yildiz MT, Negis Y, Kunduraci T, Karakas N, et al. DNA topoisomerase II β as a molecular switch in neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Ann Hematol*. 2015;94(2):7–18.
131. Israsena N, Hu M, Fu W, Kan L, Kessler JA. The presence of FGF-2 signaling determines whether b-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Dev Biol*. 2004;268:220–31.
132. Iwai M, Sato K, Omori N, Nagano I, Manabe Y, Shoji M, et al. Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:411–9.
133. Jander S, Schroeter M, Saleh A. Imaging inflammation in acute brain ischemia. *Stroke*. 2007;38(2 Suppl):642–5.
134. Jankovski A, Sotelo C. Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *J Comp Neurol*. 1996;371:376–96.
135. Jellema RK, Wolfs TG, Lima Passos V, Zwanenburg A, Ophelders

- DR, Kuypers E, et al. Mesenchymal stemcells induce T-cell tolerance and protect the preterm brain after global hypoxia-ischemia. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e73031.
136. Jenny B, Kanemitsu M, Tsupikov O, Potter G, Salmon P, Zraggen E, et al. FGF-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential. *Stem cells*. 2009;27(6):1309–17.
 137. Jezierska A, Motyl T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Med Sci Monit*. 2009;15(2):32–40.
 138. Jones KS, Connor B. Intrinsic regulation of adult subventricular zone neural progenitor cells and the effect of brain injury. *Am J Stem Cells*. 2011;1(1):48–58.
 139. Joo S, Kim JY, Lee E, Hong N, Sun W, Nam Y. Effects of ECM protein micropatterns on the migration and differentiation of adult neural stem cells. *Sci Rep*. 2015;12(5):13043.
 140. Jourdain P, Nikonenko I, Alberi S, Muller D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. *J Neurosci*. 2002;22(8):3108–16.
 141. Kajihara H, Tsutsumi E, Kinoshita A, Nakano J, Takagi K, Takeo S. Activated astrocytes with glycogen accumulation in ischemic penumbra during the early stage of brain infarction: immunohistochemical and electron microscopic studies. *Brain Res*. 2001;909:92–101.
 142. Kanemitsu M, Tsupikov O, Potter G, Boitard M, Salmon P, Zraggen E, et al. EMMPRIN overexpression in SVZ neural progenitor cells increases their migration towards ischemic cortex. *Exp Neurol*. 2017;297:14–24.
 143. Kang SK, Putnam LA, Ylostalo J, Popescu IR, Dufour J, Belousov

- A, et al. Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 18):4289–99.
144. Kang SK, Shin MJ, Jung JS, Kim YG, Kim CH. Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Dev.* 2006;15(4):583–94.
 145. Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science.* 1977;197:1092–4.
 146. Kaushik DK, Hahn JN, Yong VW, EMMPRIN, an upstream regulator of MMPs, in CNS biology. *Matrix Biol.* 2015;44–46:138–46.
 147. Kayali F, Montie HL, Rafols JA, DeGracia DJ. Prolonged translation arrest in reperfused hippocampal cornu Ammonis 1 is mediated by stress granules. *Neuroscience.* 2005;134:1223–45.
 148. Kempermann GS, Jessberger B, Steiner, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 2004;27:447–52.
 149. Kempermann G, Song H, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015;5(7):a018812.
 150. Kettenmann H, Ransom BR. *Neuroglia.* Oxford University Press; 2005.
 151. Kim JM, Lee ST, Chu K, Jung KH, Song EC, Kim SJ, et al. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. *Brain Res.* 2007;1183:43–5.
 152. Kirino T, Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol.* 1984;62:201–8.
 153. Kirino T. Delayed neuronal death. *Neuropathology.* 2000;20:95–7.
 154. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 1982;239(1):57–69.
 155. Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M,

- Hellings JA, et al. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(11):643–60.
156. Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, et al. Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation*. 2001;68(4-5):235–44.
 157. Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, Okano H, et al. Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells*. 2010;28(3):545–54.
 158. Kokovay E, Goderie S, Wang Y, Lotz S, Lin G, Sun Y, et al. Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling. *Cell Stem Cell*. 2010;7:163–73.
 159. Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. *Stroke*. 2001;32:2712–6.
 160. Kovalenko TM, Osadchenko IO, Tsupikov OM, Pivneva TA, Shalamai AS, Moibenko OO, et al. Neuroprotective effect of quercetin during experimental brain ischemia. *Fiziol Zh* .2006;52:21–7.
 161. Kovalenko T, Osadchenko I, Nikonenko A, Lushnikova I, Voronin K, Nikonenko I, et al. Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus*. 2006;16:814–25.
 162. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci*. 1997;17(15):5820–9.
 163. Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, et al. Multipotent stem/progenitor cells with similar

- properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol*. 1999;156(2):333–44.
164. Kunz J, Krause D, Kremer M, Dermietzel R. The 140-kDa protein of blood-brain barrier-associated pericytes is identical to aminopeptidase N. *J Neurochem*. 1994;62:2375–86.
 165. Lai JC, Rocha-Ferreira E, Ek CJ, Wang X, Hagberg H, Mallard C. Immune responses in perinatal brain injury. *Brain Behav Immun*. 2017;63:210–23.
 166. Lancelot J, Millar, Lei Shi, Anna Hoerder-Suabedissen, Zoltán Molnár. Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:78.
 167. Larsson E, Lindvall O, Kokaia Z. Stereological assessment of vulnerability of immunocytochemically identified striatal and hippocampal neurons after global cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 2001;913:117–32.
 168. Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:13883–8.
 169. Lee JA, Kim BI, Jo CH, Choi CW, Kim EK, Kim HS, et al. Mesenchymal stem-cell transplantation for hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat model. *Pediatric Res*. 2010;67(1):42–6.
 170. Lee SR, Kim HY, Rogowska J, Zhao BQ, Bhide P, Parent JM, et al. Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. *J Neurosci*. 2006;26(13):3491–5.
 171. Lee SR, Tsuji K, Lee SR, Lo EH. Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2004;24:671–8.
 172. Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen

- FE, et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci*. 2002;22(7):2478–86.
173. Li M, Pevny L, Lovell-Badge R, Smith A. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol*. 1998;8(17):971–4.
 174. Licht T, Keshet E. The vascular niche in adult neurogenesis. *Mech Dev*. 2015;138P1:56–62.
 175. Lien CY, Chih-Yuan Ho K, Lee OK, Blunn GW, Su Y. Restoration of bone mass and strength in glucocorticoid-treated mice by systemic transplantation of CXCR4 and cbfa-1 co-expressing mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res*. 2009;24(5):837–48.
 176. Lim DA, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells stake their ground. *Trends Neurosci*. 2014;37(10):563–71.
 177. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. 2000;28(3):713–26.
 178. Lin R, Cai J, Nathan C, Wei X, Schleidt S, Rosenwasser R, et al. Neurogenesis is enhanced by stroke in multiple new stem cell niches along the ventricular system at sites of high BBB permeability. *Neurobiol Dis*. 2015;74:229–39.
 179. Lin R, Iacovitti L. Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair. *Brain Res*. 2015;1628(Pt B):327–42.
 180. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One*. 2014;9(9):e107001.
 181. Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci*. 1998;18:7768–78.

182. Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med*. 2008;14:497–500.
183. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994;264:1145–8.
184. Mariano ED, Teixeira MJ, Marie SK, Lepski G. Adult stem cells in neural repair: Current options, limitations and perspectives. *World J Stem Cells*. 2015;7(2):477–82.
185. Maric D, Maric I, Chang YH, Barker JL. Prospective cell sorting of embryonic rat neural stem cells and neuronal and glial progenitors reveals selective effects of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on self-renewal and differentiation. *J Neurosci*. 2003;23:240–51.
186. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull*. 1998;46:281–309.
187. Martinez S, Crossley PH, Cobos I, Rubenstein JL, Martin GR. FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmo-cerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development*. 1999;126(6):1189–200.
188. Martino G, Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:395–406.
189. Massirer KB, Carromeu C, Griesi-Oliveira K, Muotri AR. Maintenance and differentiation of neural stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2011;3(1):107–14.
190. Matsuda S, Wen TC, Morita F, Otsuka H, Igase K, Yoshimura H, et al. Interleukin-6 prevents ischemia-induced learning disability and neuronal and synaptic loss in gerbils. *Neurosci Lett*. 1996;204:109–12.
191. Mélanie Morin-Brureau M, De Bock F, Lerner-Natoli M. Organotypic brain slices: a model to study the neurovascular unit micro-

- environment in epilepsies. *Fluids Barriers CNS*. 2013;10:11.
192. Meloni BP, Zhu H, Knuckey NW. Is magnesium neuroprotective following global and focal cerebral ischaemia? A review of published studies. *Magnes Res*. 2006;19(2):123–37.
 193. Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol*. 2002;451:170–88.
 194. Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:17528–32.
 195. Michelsen KA, Acosta-Verdugo S, Benoit-Marand M, Espuny-Camacho I, Gaspard N, Saha B, et al. Area-specific reestablishment of damaged circuits in the adult cerebral cortex by cortical neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Neuron*. 2015;85(5):982–97.
 196. Mizushima H, Zhou CJ, Dohi K, Horai R, Asano M, Iwakura Y, et al. Reduced postischemic apoptosis in the hippocampus of mice deficient in interleukin-1. *J Comp Neurol*. 2002;448:203–16.
 197. Montalbán-Loro R, Domingo-Muelas A, Bizy A, Ferrón SR. Epigenetic regulation of stemness maintenance in the neurogenic niches. *World J Stem Cells*. 2015;7(4):700–10.
 198. Montesano R, Orci L. Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. *Cell*. 1985;42:469–77.
 199. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984;11:47–60.
 200. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*. 1997;124(10):1929–39.
 201. Mudo G, Belluardo N, Mauro A, Fuxe K. Acute intermittent nicotine treatment induces fibroblast growth factor-2 in the subventricular

- zone of the adult rat brain and enhances neuronal precursor cell proliferation. *Neuroscience*. 2007;145(2):470–83.
202. Müller GJ, Stadelmann C, Bastholm L, Elling F, Lassmann H, Johansen FF. Ischemia leads to apoptosis--and necrosis-like neuron death in the ischemic rat hippocampus. *Brain Pathol*. 2004;14:415–24.
 203. Muramatsu T. Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *J Biochem*. 2016:1–10.
 204. Murase S, Horwitz AF. Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J Neurosci*. 2002;22:3568–79.
 205. Naganuma Y. Changes of the cerebral microvascular structure and endothelium during the course of permanent ischemia. *Keio J Med*. 1990;39:26–31.
 206. Nagase H. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res*. 1998;8:179–86.
 207. Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Baron-Van Evercooren A. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci*. 1999;11:4357–66.
 208. Nam H, Lee KH, Nam DH, Joo KM. Adult human neural stem cell therapeutics: Current developmental status and prospect. *World J Stem Cells*. 2015;7(1):126–36.
 209. Nelson PT, Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Gebel J, DeCesare S, Eet al. Clonal human (hNT) neuron grafts for stroke therapy: neuropathology in a patient 27 months after implantation. *Am J Pathol*. 2002;160(4):1201–6.
 210. Neumar RW, Meng FH, Mills AM, Xu YA, Zhang C, Welsh FA, et al. Calpain activity in the rat brain after transient forebrain ischemia. *Exp*

- Neurol. 2001;170:27–35.
211. Neuroscience (4th ed.). Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, McNamara JO, White LE (Eds.) Sunderland, MA: Sinauer Associates; 2007.
 212. Nicholson Ch, Sykova E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci.* 1998;21:207–15.
 213. Nikonenko I, Bancila M, Bloc A, Muller D, Bijlenga P. Inhibition of T-type calcium channels protects neurons from delayed ischemia-induced damage. *Mol Pharmacol.* 2005;68(1):84–9.
 214. Nitatori T, Sato N, Kominami E, Uchiyama Y. Participation of cathepsins B, H, and L in perikaryal condensation of CA1 pyramidal neurons undergoing apoptosis after brief ischemia. *Adv Exp Med Biol.* 1996;389:177–85.
 215. Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibana K, et al. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci.* 1995;15(2):1001–11.
 216. Oberlaender M, de Kock CP, Bruno RM, Ramirez A, Meyer HS, Dercksen VJ, et al. Cell type-specific three-dimensional structure of thalamocortical circuits in a column of rat vibrissal cortex. *Cerebral Cortex.* 2012;22(10):2375–91.
 217. Okada T, Kataoka Y, Takeshita A, Mino M, Morioka H, Kusakabe KT, et al. Effects of transient forebrain ischemia on the hippocampus of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): an immunohistochemical study. *Zoolog Sci.* 2013;30:484–9.
 218. Olney JW. New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl.* 1994;43:47–51.
 219. Ottoboni L, Merlini A, Martino G. Neural stem cell plasticity: advantages in therapy for the injured central nervous system. *Front Cell*

- Dev Biol. 2017;5:52.
220. Ottone C, Krusche B, Whitby A, Clements M, Quadrato G, Pitulescu ME, et al. Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nature Cell Biol.* 2014;16:1045–56.
 221. Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, et al. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells.* 2000;18(4):295–300.
 222. Palmer TD, Ray J, Gage FH. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci.* 1995;6:474–86.
 223. Papadimitropoulou A, Mamalaki A, The glycosylated IgII extracellular domain of EMMPRIN is implicated in the induction of MMP-2. *Mol Cell.Biochem.* 2013;379:107–13.
 224. Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol.* 2002;52(6):802–13.
 225. Park K, Nam Y, Choi Y. An agarose gel-based neurosphere culture system leads to enrichment of neuronal lineage cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2015; 51(5):455–62.
 226. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press; 1982.
 227. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee JM, Parpura V, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol.* 2016;131(3):323–45.
 228. Peters A, Palay SL, Webster HD. The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells. Philadelphia: WB Saunders; 1991.
 229. Petito CK, Pulsinelli WA. Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia: possible

- relationship to abnormalities in neuronal processes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1984;4:194–205.
230. Pistollato F, Rampazzo E, Persano L, Abbadi S, Frasson C, Denaro L, et al. Interaction of hypoxia-inducible factor-1alpha and Notch signaling regulates medulloblastoma precursor proliferation and fate. *Stem Cells.* 2010;28:1918–29.
 231. Pivneva TA, OM Tsupikov M, Pilipenko N. Structural modifications of astrocytes in the hippocampus after experimental cerebral ischemia in gerbils. 2005;37(5/6):410–5.
 232. Platel JC, Bordey A. The multifaceted subventricular zone astrocyte: From a metabolic and pro-neurogenic role to acting as a neural stem cell. *Neuroscience.* 2016;323:20–8.
 233. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:159–78.
 234. Putnam AJ. The instructive role of the vasculature in stem cell niches. *Biomater Sci.* 2014;2:1562–73.
 235. Puumala M, Anderson RE, Meyer FB. Intraventricular infusion of FGF-2 promotes cerebral angiogenesis in Wistar rat. *Brain Res.* 1990;534:283–6.
 236. Raballo R, Rhee J, Lyn-Cook R, Leckman JF, Schwartz ML, Vaccarino FM. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. *J Neurosci.* 2000;20(13):5012–23.
 237. Rakic P. Limits of neurogenesis in primates. *Science.* 1985;227(4690):1054–6.
 238. Ramasamy S, Narayanan G, Sankaran S, Yu YH, Ahmed S. Neural stem cell survival factors. *Arch Biochem Biophys.* 2013; 534(1-2):71–87.
 239. Rami A. Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the

- calpain-calpastatin-caspase hypothesis. *Neurobiol Dis.* 2003;13:75–88.
240. Rami A, Kögel D. Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: Two sides of the same coin? *Autophagy.* 2008;4:422–6.
 241. Reuss B, O. von Bohlen und Halbach. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 2003;313(2):139–57.
 242. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414:105–11.
 243. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci.* 1992;12:4565–74.
 244. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 1992;255:1707–10.
 245. Rinsch C, Quinodoz P, Pittet B, Alizadeh N, Baetens D, Montandon D, et al. Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia. *Gene Ther.* 2001;8(7):523–33.
 246. Robin AM, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Katakowski M, Zhang L, et al. Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(1):125–34.
 247. Robins SC, Stewart I, McNay DE, Taylor V, Giachino C, Goetz M, et al. α -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat Commun.* 2013; 4:2049.
 248. Rodriguez-Yanez M, Castillo J. Role of inflammatory markers in brain ischemia. *Curr Opin Neurol.* 2008;21:353–7.

249. Rosenblum WI. Histopathologic clues to the pathways of neuronal death following ischemia/hypoxia. *J Neurotrauma*. 1997;14:313–26.
250. Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci*. 2007;10(11):1377–86.
251. Rueger MA, Schroeter M. In vivo imaging of endogenous neural stem cells in the adult brain. *World J Stem Cells*. 2015;7(1):75–83.
252. Ryu HH, Lim JH, Byeon YE, Park JR, Seo MS, Lee YW, et al. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *J Vet Sci*. 2009;10(4):273–84.
253. Santilli G, Lamorte G, Carlessi L, Ferrari D, Rota Nodari L, Binda E, et al. Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells. *PLoS One*. 2009;5:e8575.
254. Sapolsky RM, Steinberg GK. Gene therapy using viral vectors for acute neurologic insults. *Neurology*. 1999;53(9):1922–31.
255. Savitz SI, Rosenbaum DM, Dinsmore JH, Wechsler LR, Caplan LR. Cell transplantation for stroke. *Ann Neurol*. 2002;52(3):266–75.
256. Savitz SI, Dinsmore JH, Wechsler LR, Rosenbaum DM, Caplan LR. Cell therapy for stroke. *NeuroRx*. 2004;1:406–14.
257. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006; 441(7097):1075–9.
258. Schild L, Huppelsberg J, Kahlert S, Keilhoff G, Reiser G. Brain mitochondria are primed by moderate Ca^{2+} rise upon hypoxia/reoxygenation for functional breakdown and morphological disintegration. *J Biol Chem*. 2003;278:25454–60.
259. Schiozer WA, Hartinger A, von Donnersmarck GH, Mühlbauer W. Composite grafts of autogenic cultured epidermis and glycerol-preserved allogeneic dermis for definitive coverage of full thickness burn wounds: case reports. *Burns*. 1994;20(6):503–7.

260. Schneggenburger R, Sakaba T, Neher E. Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends in neurosciences*. 2002;25(4):206–12.
261. Schubert D, Kötter R, Staiger JF. Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer- and cell type-specific microcircuits. *Brain Struct Func*. 2007;212:107–19.
262. Seaberg RM, van der Kooy DJ. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *Neurosci*. 2002; 22(5):1784–93.
263. Seibenhener ML, Wooten MW. Isolation and culture of hippocampal neurons from prenatal mice. *J Vis Exp*. 2012;65:3634.
264. Seidenfaden R, Desoeuvre A, Bosio A, Virard I, Cremer H. Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain. *Mol Cell Neurosci*. 2006;32:187–98.
265. Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001;21(18):7153–60.
266. Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honoré T. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science*. 1990;247(4942):571-4.
267. Shen LH, Li Y, Chopp M. Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats. *Glia*. 2010;58(9):1074–81.
268. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*. 2004;304:1338–40.
269. Shen Y, Plane M, Deng W. Mouse models of periventricular leukomalacia. *J Vis Exp*. 2010;39:e1951.

270. Shen LH, Li Y, Gao Q, Savant-Bhonsale S, Chopp M. Down-regulation of neurocan expression in reactive astrocytes promotes axonal regeneration and facilitates the neurorestorative effects of bone marrow stromal cells in the ischemic rat brain. *Glia*. 2008;56(16):1747–54.
271. Shetty AK, Hattiangady B, Shetty GA. Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia*. 2005;51:173–86.
272. Skibo GG, Lushnikova IV, Voronin KY, Dmitrieva O, Novikova T, Klementiev B, et al. A synthetic NCAM-derived peptide, FGL, protects hippocampal neurons from ischemic insult both in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci*. 2005;22(7):1589–96.
273. Smith CS, Ortega G, Parker L, Shearer WT. Cyclosporin A blocks induction of tumor necrosis factor-alpha in human B lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;204(1):383–90.
274. Snyder EY, Yoon C, Flax J. Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:11663–8.
275. Song HJ, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci*. 2002;5(5):438–45.
276. Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia*. 2004;46:41–52.
277. Stolp HB, Molnár Z. Neurogenic niches in the brain: help and hindrance of the barrier systems. *Front Neurosci*. 2015;9:1–7.
278. Sugawara T, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Chan PH. Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective

- vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci.* 1999;19:RC39.
279. Sun CR, Chen ZH, Yin SY, Chen S, Hong Y, Yan W. et al. Brain ischemia induces regeneration of interneurons but not projection neurons. *Restor Neurol Neurosci.* 2013;31(4):461–72.
 280. Sun YJ, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: Evidence from knockout mice and growth factor administration. *Dev Biol.* 2006;289(2):329–35.
 281. Suzuki T, Mandai M, Akimoto M, Yoshimura N, Takahashi M. The simultaneous treatment of MMP-2 stimulants in retinal transplantation enhances grafted cell migration into the host retina. *Stem Cells.* 2006;24(11):2406–11.
 282. Taguchi Y, Takashima S, Sasahara E, Inoue H, Ohtani O. Morphological changes in capillaries in the ischemic brain in Wistar rats. *Arch Histol Cytol.* 2004;67:253–61.
 283. Tallent MK. Somatostatin in the dentate gyrus. *Prog Brain Res.* 2007;163:265–84.
 284. Tan J, Zheng X, Zhang S, Yang Y, Wang X, Yu X, et al. Response of the sensorimotor cortex of cerebral palsy rats receiving transplantation of vascular endothelial growth factor 165-transfected neural stem cells. *Neural Regen Res.* 2014;9(19):1763–9.
 285. Tang Y, Yu P, Cheng L. Current progress in the derivation and therapeutic application of neural stem cells. *Cell Death Dis.* 2017;8(10):e3108.
 286. Tao Y, Ma L, Liao Z, Le Q, Yu J, Liu X, et al. Astroglial β -arrestin1-mediated nuclear signaling regulates the expansion of neural precursor cells in adult hippocampus. *Sci Rep.* 2015;5:15506.
 287. Tatarishvili J, Oki K, Monni E, Koch P, Memanishvili T, Buga

- AM, et al. Human induced pluripotent stem cells improve recovery in stroke-injured aged rats. *Restor Neurol Neurosci*. 2014;32(4):547–58.
288. Taupin P, Gage FH. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res*. 2002;69(6):745–9.
 289. Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, et al. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):279–88.
 290. Thorbergsson PT, Garwicz M, Schouenborg J, Johansson AJ. Spike-feature based estimation of electrode position in extracellular neural recordings. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2012;2012:3380–3.
 291. Thored P, Heldmann U, Gomes-Leal W, Gisler R, Darsalia V, Taneera J, et al. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia*. 2009;57:835–49.
 292. Toda H, Takahashi J, Mizoguchi A, Koyano K, Hashimoto N. Neurons generated from adult rat hippocampal stem cells form functional glutamatergic and GABAergic synapses in vitro. *Exp Neurol*. 2000;165(1):66–76.
 293. Tohill MP, Mann DJ, Mantovani CM, Wiberg M, Terenghi G. Green fluorescent protein is a stable morphological marker for schwann cell transplants in bioengineered nerve conduits. *Tissue Eng*. 2004;10(9-10):1359–67.
 294. Tonti GA, Mannello F, Cacci E, Biagioni S. Neural stem cells at the crossroads: MMPs may tell the way. *Int J Dev Biol*. 2009;53(1):1–17.
 295. Tornero D, Tsuprykov O, Granmo M, Rodriguez C, Grønning-Hansen M, Thelin J, et al. Synaptic inputs from stroke-injured brain to grafted human stem cell-derived neurons activated by sensory stimuli.

- Brain. 2017;140(3):692–706.
296. Tornero D, Wattananit S, Gronning Madsen M, Koch P, Wood J, Tatarishvili J, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons integrate in stroke injured cortex and improve functional recovery. *Brain*. 2013;136(Pt 12):3561–77.
 297. Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex*. 2003;13(6):580–7.
 298. Traystman R. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR Journal*. 2003;44(2):85–95.
 299. Tropepe V, Sibilia M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Developmental Biology*. 1999;208(1):166–88.
 300. Tsupyskov O, Kyryk V, Smozhanik E, Rybachuk O, Butenko G, Pivneva T, et al. Long-term fate of grafted hippocampal neural progenitor cells following ischemic injury. *J Neurosci Res*. 2014;92(8):964–74.
 301. Tsupyskov OM. A protocol for isolation of fetal neural progenitor cells from mouse hippocampus. *Cell Organ Transplant*. 2014;2(2):155–7.
 302. Tsupyskov OM, Kyryk VM, Ustymenko AM, Yatsenko KV, Butenko GM, et al. Effect of transplantation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia. *Cell Organ Transplant*. 2015;3(1):68–73.
 303. Tsupyskov OM, Lushnikova IV, Nikandrova YA, Yatsenko KV, Ustymenko AM, Kyryk VM, et al. A novel model of periventricular leukomalacia on mouse organotypic brain slice culture. *Cell Organ Transplant*. 2016;4(2):188–93.

304. Tsupykov OM, Lushnikova IV, Ustymenko AM, Kyryk VM, Nikandrova YA, Patseva MA, et al. Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model *in vitro*. Cell Organ Transplant. 2017;5(1):28–32.
305. Tsupykov O. Neural stem cell niches in the adult mammalian brain. Cell Organ Transplan. 2015;3(2):190–4.
306. Tsupykov O. Ultrastructural analysis of murine hippocampal neural progenitor cells in culture. Microsc Res Techn. 2015;78(2):128–33.
307. Tsupykov O, Kanemitsu M, Smozhanik E, Skibo G, Dayer A, Kiss JZ. Relationship of grafted FGF-2 overexpressing neural stem/progenitor cells with the vasculature in the cerebral cortex. Cell Transplan. 2016;25(7):1359–69.
308. Tsupykov O, Lushnikova I, Ustymenko A, Kyryk V, Nikandrova Y, Patseva M, et al. The effects of multipotent mesenchymal stromal cells on mouse brain slices at their co-culture in an *in vitro* model of periventricular leukomalacia. Fiz Zhur. 2017;63(5):3–12.
309. Tsupykov O, Ustymenko A, Kyryk V, Smozhanik E, Yatsenko K, Butenko G, et al. Ultrastructural study of mouse adipose-derived stromal cells induced towards osteogenic direction. Micros Res Techn. 2016;79(6):557–64.
310. Tsupykov OM, Pivneva TA, Poddubna AO, Kyryk VM, Kuchuk OV, Butenko GM, et al. Migration and differentiation of fetal neural progenitor cells in the brain of ischemic animals. Int J Physiol Pathophysiol. 2010;1(1):25–35.
311. Tsupykov OM, Poddubnaya AO, Smozhanyk KG, Kyryk VM, Kuchuk OV, Butenko GM, et al. Integration of grafted neural progenitor cells in host hippocampal circuitry after ischemic injury. Neurofiziologiiia. 2011;43(4):372–5.
312. Ueki T, Tanaka M, Yamashita K, Mikawa S, Qiu Z, Maragakis NJ.

- et al. A novel secretory factor, Neurogenesisin-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci*. 2003;23:11732–40.
313. Urbán N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:396.
 314. Vaccarino FM, Schwartz ML, Raballo R, Rhee J, Lyn-Cook R. Fibroblast growth factor signaling regulates growth and morphogenesis at multiple steps during brain development. *Curr Top Dev Biol*. 1999;46:179–200.
 315. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 2002;415:1030–4.
 316. Velthoven CT, Kavelaars A, Bel F, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration. *Brain Behav Immun*. 2010;24(3):387–93.
 317. Velthoven CT, Kavelaars A, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatr Res*. 2012;71(4):474–81.
 318. Velthoven CT, Kavelaars A, Bel F, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cell transplantation changes the gene expression profile of the neonatal ischemic brain. *Brain Behav Immun*. 2011;25(7):1342–8.
 319. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006;1(2):848–58.
 320. Wagner AP, Schmoll H, Badan I, Platt D, Kessler C. Brain plasticity: to what extent do aged animals retain the capacity to coordinate gene activity in response to acute challenges. *Exp Gerontol*. 2000;35(9-10):1211–27.

321. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses *in vivo* and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*. 2009;29:3974–80.
322. Wang LW, Lin YC, Wang ST, Yeh TF, Huang CC. Hypoxic/ischemic and infectious events have cumulative effects on the risk of cerebral palsy in very-low-birth-weight preterm infants. *Neonatology*. 2014;106(3):209–15.
323. Wang X, Hu H, Hua R, Yang J, Zheng P, Niu X, et al. Effect of umbilical cord mesenchymal stromal cells on motor functions of identical twins with cerebral palsy: pilot study on the correlation of efficacy and hereditary factors. *Cytotherapy*. 2015;17(2):224–31.
324. Wang YZ, Xu TL. Acidosis, acid-sensing ion channels, and neuronal cell death. *Mol Neurobiol*. 2011;44(3):350–8.
325. Wei X, Zhao L, Zhong J, Gu H, Feng D, Johnstone BH, et al. Adipose stromal cells-secreted neuroprotective media against neuronal apoptosis. *Neurosci Lett*. 2009;462(1):76–9.
326. Wei L, Ying DJ, Cui L, Langsdorf J, Yu SP. Necrosis, apoptosis and hybrid death in the cortex and thalamus after barrel cortex ischemia in rats. *Brain Res*. 2004;1022:54–61.
327. Whitman MC, Greer CA. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol*. 2009; 89(2):162–75.
328. Winkelmann ER, Charcansky A, Faccioni-Heuser MC, Netto CA, Achaval M. An ultrastructural analysis of cellular death in the CA1 field in the rat hippocampus after transient forebrain ischemia followed by 2, 4 and 10 days of reperfusion. *Anat Embryol (Berl)*. 2006;211(5):423–34.
329. Xiao JJ, Yin M, Wang ZJ, Wang XP. Transplanted neural stem cells: playing a neuroprotective role by ceruloplasmin in the substantia nigra of PD Model Rats? *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:618631.

330. Xu Q, Wang S, Jiang X, Zhao Y, Gao M, Zhang Y, et al. Hypoxia-induced astrocytes promote the migration of neural progenitor cells via vascular endothelial factor, stem cell factor, stromal-derived factor-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1 upregulation in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(7):624–31.
331. Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa K, Miyata T, Okano H, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke*. 2001;32:1890–6.
332. Yamashima T, Tonchev AB, Borlongan CV. Differential response to ischemia in adjacent hippocampal sectors: neuronal death in CA1 versus neurogenesis in dentate gyrus. *Biotechnol J*. 2007;2(5):596–607.
333. Yamashita T, Ninomiya M, Hernández Acosta P, García-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci*. 2006;26(24):6627–36.
334. Yokota M, Saido TC, Kamitani H, Tabuchi S, Satokata I, Watanabe T. Calpain induces proteolysis of neuronal cytoskeleton in ischemic gerbil forebrain. *Brain Res*. 2003;984:122–32.
335. Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(12):931–44.
336. Yu AC, Wong HK, Yung HW, Lau LT. Ischemia-induced apoptosis in primary cultures of astrocytes. *Glia*. 2001;35:121–30.
337. Yuan T, Liao W, Feng NH, Lou YL, Niu X, Zhang AJ, et al. Human induced pluripotent stem cell- derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurological function in a rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):73–82.
338. Yuh WT, Alexander MD, Ueda T, Maeda M, Taoka T, Yamada K, et al. Revisiting current golden rules in managing acute ischemic stroke:

- evaluation of new strategies to further improve treatment selection and outcome. *AJR Am J Roentgenol*. 2017;208(1):32–41.
339. Zakiewicz IM, Bjaalie JG, Leergaard TB. Brain-wide map of efferent projections from rat barrel cortex. *Front Neuroinform*. 2014;8:5.
 340. Zhan RZ, Nadler JV, Schwartz-Bloom RD. Depressed responses to applied and synaptically-released GABA in CA1 pyramidal cells, but not in CA1 interneurons, after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26:112–24.
 341. Zhang F, Liu CL, Hu BR. Irreversible aggregation of protein synthesis machinery after focal brain ischemia. *J Neurochem*. 2006;98:102–12.
 342. Zhang LL, Zhang HT, Cai YQ, Han YJ, Yao F, Yuan ZH, et al. Anti-inflammatory effect of mesenchymal stromal cell transplantation and quercetin treatment in a rat model of experimental cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36(7):1023–34.
 343. Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacol*. 2008;55(3):345–52.
 344. Zhao LX, Zhang J, Cao F, Meng L, Wang DM, Li YH, et al. Modification of the brain-derived neurotrophic factor gene: a portal to transform mesenchymal stem cells into advantageous engineering cells for neuroregeneration and neuroprotection. *Exp Neurol*. 2004;4:396–406.
 345. Zhu DY, Liu SH, Sun HS, Lu YM. Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus. *J Neurosci*. 2003;23:223–9.
 346. 346.Zhu T, Yu D, Feng J, Wu X, Xiang L, Gao H, et al. GDNF and NT-3 induce progenitor bone mesenchymal stem cell differentiation into neurons in fetal gut culture medium. *Cell Mol Neurobiol*. 2015;35(2):255–64.

347. Zuckerman T, Beyar-Katz O, Rowe JM. Should autotransplantation in acute myeloid leukemia in first complete remission be revisited? *Curr Opin Hematol*. 2016;23(2):88–94.
348. Александрова МА, Сабурина ИН, Корочкин ЛИ, Ревущин АВ, Репин ВС, Ржанинова АА, и др. Поведение и дифференцировка нейрональных стволовых клеток *in vivo*. Изв РАН Серия биол. 2001;6:656–65.
349. Кучук ОВ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ. Культивирование и направленная остеогенная дифференцировка мультипотентных стромальных клеток костного мозга в культуре микромассы. *Пробл остеол*. 2010;13(4):36–41.
350. Мельник ПС, Слабкий ГО, Дзюба ОМ, Чепелевська ЛА, Кудренко МВ. Щорічна доповідь про стан здоров'я населення, санітарно-епідемічну ситуацію та результати діяльності системи охорони здоров'я України. 2016 рік. МОЗ України, ДУ. «УІСД МОЗ України». Київ; 2017.
351. Поддубна АО, Цупиков ОМ, Петренко ОЮ, Оченашко ОВ, Півнева ТА, Скибо ГГ. Реакція гліальних клітин гіпокампа на нейротрансплантацію при експериментальній ішемії мозку. *Здоб клін експер мед*. 2007;2:121–4.
352. Скворцов ИА, Ермоленко НА. Развитие нервной системы у детей в норме и патологии. М.: Медпресс-информ; 2003.
353. Скибо ГГ, Коваленко ТМ, Осадченко ІО, Цупиков ОМ, Півнева ТА. Структурні зміни в гіпокампі при експериментальній ішемії мозку. *Укр неврол жур*. 2006;1:86–92.
354. Цупиков О, Кирик В, Бутенко Г, Скибо Г. Стимуляция эндогенного нейrogenеза в гиппокампе после ишемического повреждения мозга с помощью экзогенных нейральных прогениторов. *Неврол Нейрохирург Вост Евр*. 2017;7(3):457–63.

355. Цупиков О, Кирик В, Яценко К, Бутенко Г, Скибо Г. Вплив трансплантованих нейральних прогеніторів на проліферацію клітин гіпокампа після ішемічного ушкодження мозку. *ScienceRise. Medical Science*. 2017;14(6):32–6.
356. Цупиков О, Кирик В, Яценко К, Бутенко Г, Скибо Г. Ефективність використання зеленого флюоресцентного білка як маркера для ідентифікації трансплантованих нейральних прогеніторних клітин у нервовій тканині мишей. *Укр неврол жур*. 2017;44(3):51–7.
357. Цымбалюк ВИ, Пичкур ЛД, Руденко ВА и др. Иммунологические аспекты трансплантации эмбриональной нервной ткани. *Журн Вопр Нейрохирургии*. 2001;3:28–31.

Додаток 1

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні наукові результати дисертації:

1. Поддубна АО, Цупиков ОМ, Петренко ОЮ, Оченашко ОВ, Півнева ТА, Скібо ГГ. Реакція гліальних клітин гіпокампа на нейротрансплантацію при експериментальній ішемії мозку. Здоб клін експ мед. 2007; 2:121–4. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів).*
2. Jenny B, Kanemitsu M, Tsupikov O, Potter G, Salmon P, Zraggen E, Gascon E, Skibo G, Dayer A, Kiss J. FGF-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential. Stem cells. 2009;27(6):1309–17. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
3. Tsupikov OM, Pivneva TA, Poddubna AO, Kyryk VM, Kuchuk OV, Butenko GM, Skibo GG. Migration and differentiation of fetal neural progenitor cells in the brain of ischemic animals. Int J Phys Pathophysiol. 2010;1(1):25–35. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
4. Кучук ОВ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ. Культивирование и направленная остеогенная дифференцировка мультипотентных стромальных клеток костного мозга в культуре микромассы. Пробл остеолог. 2010;13(4):36–41. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*

5. Garashchuk OV, Tsupykov OM, Tsymbaliuk VI. Impact of late transplantation of fetal neural tissue on hippocampal cytoarchitectonics in remote period after transient global cerebral ischemia in rats. *Int J Phys Pathophysiol.* 2012;3(1):39–52. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*
6. Tsupykov OM, Poddubnaya AO, Smozhanyk KG, Kyryk VM, Kuchuk OV, Butenko GM, Semenova EA, Pivneva TA, Skibo GG. Integration of grafted neural progenitor cells in host hippocampal circuitry after ischemic injury. *Neirofiziolohiia.* 2011;43(4):372–5. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
7. Tsupykov O, Kyryk V, Smozhanik E, Rybachuk O, Butenko G, Pivneva T, Skibo G. Long-term fate of grafted hippocampal neural progenitor cells following ischemic injury. *J Neurosci Res.* 2014;92(8):964–74. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
8. Tsupykov OM. A protocol for isolation of fetal neural progenitor cells from mouse hippocampus. *Cell Organ Transplant.* 2014;2(2):155–7. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
9. Tsupykov OM, Kyryk VM, Ustymenko AM, Yatsenko KV, Butenko GM, Skibo GG. Effect of transplantation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia. *Cell Organ Transplant.* 2015;3(1):68–73. *(Особисто дисертантом проведені*

експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

10. Tsupykov O. Neural stem cell niches in the adult mammalian brain. Cell Organ Transplant. 2015;3(2):190–4. *(Особисто дисертантом проведені дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
11. Tsupykov O. Ultrastructural analysis of murine hippocampal neural progenitor cells in culture. Microsc Res Tech. 2015;78(2):128–133. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
12. Tsupykov O, Kanemitsu M, Smozhanik E, Skibo G, Dayer A, Kiss JZ. Relationship of grafted FGF-2 overexpressing neural stem/progenitor cells with the vasculature in the cerebral cortex. Cell Transplant. 2016;25(7):1359–69. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
13. Tsupykov O, Ustylenko A, Kyryk V, Smozhanik E, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. Ultrastructural study of mouse adipose-derived stromal cells induced towards osteogenic direction. Microsc Res Tech. 2016;79(6):557–64. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
14. Tsupykov OM, Lushnikova IV, Nikandrova YA, Yatsenko KV, Ustylenko AM, Kyryk VM, Butenko GM, Skibo GG. A novel model of periventricular leukomalacia on mouse organotypic brain slice culture. Cell Organ Transplant. 2016;4(2):188–193. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*

15. Tornero D, Tsupikov O, Granmo M, Rodriguez C, Grønning-Hansen M, Thelin J, Smozhanik E, Laterza C, Wattananit S, Ge R, Tatarishvili J, Grealish S, Brüstle O, Skibo G, Parmar M, Schouenborg J, Lindvall O, Kokaia Z. Synaptic inputs from stroke-injured brain to grafted human stem cell-derived neurons activated by sensory stimuli. *Brain*. 2017;140(3):692–706. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*
16. Tsupikov OM, Lushnikova IV, Ustymenko AM, Kyryk VM, Nikandrova YA, Patseva MA, Yatsenko KV, Butenko GM, Skibo GG. Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model in vitro. *Cell Organ Transplant*. 2017;5(1):28–32. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
17. Цупиков О, Кирик В, Яценко К, Бутенко Г, Скибо Г. Вплив трансплантованих нейральних прогеніторів на проліферацію клітин гіпокампа після ішемічного ушкодження мозку. *ScienceRise. Medical Science*. 2017;14(6):32–6. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
18. Kanemitsu M, Tsupikov O, Potter G, Boitard M, Salmon P, Zraggen E, Gascon E, Skibo G, Dayer AG, Kiss JZ. EMMPRIN overexpression in SVZ neural progenitor cells increases their migration towards ischemic cortex. *Exp Neurol*. 2017;297:14–24. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
19. Цупиков О, Кирик В, Бутенко Г, Скибо Г. Стимуляція ендогенного нейрогенеза в гіпокампе после ишемического повреждения мозга с

помощью экзогенных нейральных прогениторов. Неврол Нейрохирург Вост Европа. 2017;7(3):457–63. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*

20.Цупиков О, Кирик В, Яценко К, Бутенко Г, Скибо Г. Ефективність використання зеленого флюоресцентного білка як маркера для ідентифікації трансплантованих нейральных прогеніторних клітин у нервовій тканині мишей. Укр неврол жур. 2017;44(3):51–7. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*

21.Tsupykov O, Lushnikova I, Ustymenko A, Kyryk V, Nikandrova Y, Patseva M, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. The effects of multipotent mesenchymal stromal cells on mouse brain slices at their co-culture in an in vitro model of periventricular leukomalacia. Фізіол журн. 2017;63(5):3–12. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*

Апробація матеріалів дисертації:

1. Poddubnaya A, Tsupykov O, Pivneva T. Neurotransplantation ameliorates hippocampal cells structure after ischemic injury. The 44th International Conference of the Slovak Anatomical Society «Morphology 2007», Bratislava. Acta histochem. 2009;111:456. *Публікація тез.*
2. Цупиков ОМ, Поддубна АО, Півнева ТА, Скибо ГГ. Вплив нейротрансплантації на стан гліальних клітин гіпокампа після ішемії-реперфузії мозку. Наук конф з міжн участю «Високогірна

- гіпоксія і геном», Терскол. Фізіол жур. 2008;54(4):93. *Публікація тез.*
3. Tsuprykov O, Poddubna A, Kyryk V, Kuchuk O, Butenko G, Skibo G, Pivneva T. The fate of neural progenitor cells after transplantation into ischemic brain. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease Glia, Paris. Glia. 2009;57(S13):74. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
 4. Tsuprykov O, Poddubna A, Ochenashko O, Petrenko A, Kyryk V, Kuchuk O, Butenko G, Skibo G, Pivneva T. Grafting of fetal neural progenitor cells into the adult ischemic brain. 7th FENS Forum, Amsterdam. FENS Abstr book. 2010;5:016.31. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
 5. Лабунець ІФ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ, Кучук ОВ, Півнева ТА, Скибо ГГ, Бутенко ГМ. Вплив нейротрансплантації на функціональну активність епіфіза та тимуса при ішемічному пошкодженні головного мозку. Наук практ конф з міжн участю «Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи», Київ. Журн Акад мед наук України. 2010;16:100–1. *Публікація тез.*
 6. Васильєв РГ, Кучук ОВ, Цупиков ОМ, Кирик ВМ. Перспективи застосування в регенеративній медицині тривимірних трансплантатів, заселених мультипотентними стромальними клітинами кісткового мозку. Матеріали конференції «Актуальні питання геронтології та геріатрії», Київ. 2011:8–9. *Публікація тез.*
 7. Tsuprykov O, Pivneva T, Poddubna A, Kyryk V, Kuchuk O, Skibo G. Hippocampal-derived neural progenitor cells establish synaptic junctions after grafting into the adult ischemic brain. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence. 2011: D141. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
 8. Скибо ГГ, Никоненко ІР, Коваленко ТН, Осадченко ІА, Лушникова ІВ, Півнева ТА, Цупиков ОМ, Пацева МА, Сможаник

- ЕГ, Никоненко АГ. Синаптическая пластичность мезга. Научные труды III съезда физиологов СНГ, Ялта. 2011:50–1. *Публікація тез.*
9. Tsupykov O, Poddubna A, Smozhanyk E, Kyryk V, Kuchuk O, Pivneva T, Skibo G, Butenko G. The grafted fetal neural progenitor cells can integrate in the adult hippocampal tissue after ischemic injury. Abstracts of the World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig. 2011:163. *Публікація тез.*
 10. Tsupykov O, Kanemitsu M, Pivneva T, Skibo G, Dayer AG, Kiss JZ. Ectopic niche formation by grafted FGF-2 overexpressing neural stem/progenitors in the cerebral cortex. Abstracts of the SFN, Washington. 2011;129.05/A18:20. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
 11. Tsupykov O, Smozhanik E, Rybachuk O, Kyryk V, Kuchuk O, Patseva M, Butenko G, Skibo G, Pivneva T. Synapse formation between the grafted neural progenitor cells and host hippocampal neurons after ischemic injury. 8 th FENS meeting, Barselona. FENS Forum Programme Book. 2012:300. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
 12. Цупиков О.М. Экспериментальные подходы к изучению терапевтического потенциала стволовых клеток при перинатальной патологии ЦНС. Збірник тез наук практ конф з міжнар участю «Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неонатології та дитячій неврології», Київ. 2013:29. *Публікація тез, доповідь.*
 13. Цупиков ОМ, Кирик ВМ, Мамчур АА, Устименко АМ, Яценко КВ, Бутенко ГМ, Скибо ГГ. Трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини при перинатальній патології ЦНС. Збірник тез наук практ конф з міжнар участю «Трансплантація – сьогодні, минуле та майбутнє», Київ. 2014:37. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

14. Tsupykov O, Kyryk V, Pivneva T, Butenko G, Skibo G. Neural stem cells transplantation promote the spatial learning recovery after ischemic brain injury. 1st International Symposium on Mechanisms Underlying Memory Storage and Pathological Learning, Montpellier. Abstract book. 2015:29.
Публікація тез.