

УДК 616.83 -036.865.1-005.8-085.217.34+612.015.348

Zhang L.¹, Chopp M.², Meier D.H.³, Winter S.³, Wang L.¹, Szalad A.¹, Lu M.⁴, Wei M.¹, Cui Y.¹, Zhang Z.G.¹¹ Department of Neurology, Henry Ford Hospital, Detroit, MI² Department of Physics, Oakland University, Rochester, MI³ EVER Neuro Pharma GmbH, Oberburgau Unterach, Austria⁴ Department of Biostatistics and Research Epidemiology, Henry Ford Hospital, Detroit, MI

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ SONIC HEDGEHOG ОПРЕДЕЛЯЕТ ЦЕРЕБРОЛИЗИН-ИНДУЦИРОВАННОЕ УЛУЧШЕНИЕ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ПОСЛЕ ИНСУЛЬТА

Резюме. Предпосылки и цель исследования. Церебролизин — препарат, представляющий собой смесь нейротрофических пептидов, усиливает нейрогенез и улучшает неврологические исходы при экспериментальном моделировании нейродегенеративных заболеваний и инсульта. Сигнальный путь Sonic hedgehog (Shh) стимулирует нейрогенез после инсульта. Учитывая это, настоящее исследование было посвящено поиску ответа на вопрос, опосредует ли Shh-сигналинг церебролизин-индуцированный нейрогенез и улучшение неврологических исходов после инсульта. **Методы.** Крысам, у которых воспроизводили эмболический инсульт, вводили Церебролизин с циклопамином или без него. **Результаты.** Используя нервные клетки-предшественники, полученные из субвентрикулярной зоны бокового желудочка взрослых крыс, мы показали, что Церебролизин достоверно усиливает пролиферацию нервных клеток-предшественников и их дифференциацию в нейроны и миелинизирующие олигодендроциты, что было связано с увеличением количества Shh-белка и его рецепторов Patched и Smoothened. Блокада Shh-сигналинга при помощи фармакологического ингибитора Smoothened, циклопamina, нарушала церебролизин-индуцированный нейрогенез и олигодендрогенез *in vitro*. У крыс с инсультом введение Церебролизина спустя 24 ч после моделирования данной патологии приводило к достоверному увеличению пролиферации нервных клеток-предшественников в субвентрикулярной зоне и усиливало нейрогенез, олигодендрогенез и ремоделирование аксонов в перинфарктной зоне. В дополнение к этому у крыс, получавших Церебролизин, наблюдалось выраженное улучшение неврологических функций спустя 3–5 недель после развития инсульта по сравнению с крысами, получавшими лекарственную среду циклопamina (раствор, в котором растворялся циклопамин, в отсутствие его самого. — Прим. перев.). Однако ингибирование Shh-пути *in vivo* с помощью циклопamina полностью устраняло эффекты Церебролизина в отношении нейрорегенерации и функционального восстановления. **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что Shh-сигналинг опосредует церебролизин-индуцированный нейрогенез и ремоделирование белого вещества, а также функциональное восстановление у крыс после инсульта.

Ключевые слова: нейрогенез, восстановление, инсульт.

Инсульт приводит к быстрому повреждению головного мозга и длительному функциональному дефициту. Тромболитическая терапия, применяемая для лечения острого инсульта, имеет ограниченный успех — примерно у 5 % пациентов с ишемическим инсультом, начавших получать данный вид лечения в течение 4,5-часового «окна». В настоящее время ведется активное изучение фармакологического и клеточно-ориентированного терапевтического подхода, нацеленного на усиление ре-

моделирования мозга и последующее функциональное восстановление у всех пациентов с инсультом, начавших получать лечение спустя 24 ч или более после развития болезни [1]. Пептидный препарат Церебролизин, обладающий нейротрофоподобной активностью, был протестирован для лечения инсульта и других нейродегенеративных расстройств [2, 3]. При экспериментальном моделировании инсульта нам удалось установить, что Церебролизин усиливает нейрогенез и одновременно

усиливает функциональное неврологическое восстановление [3]. Важно также отметить, что потенциальные функциональные преимущества Церебролизина были продемонстрированы и в ряде рандомизированных клинических исследований у пациентов с инсультом и болезнью Альцгеймера [2, 4]. Однако механизмы, определяющие положительные эффекты Церебролизина в лечении инсульта, еще должны быть уточнены.

Sonic hedgehog (Shh) является высококонсервативным путем сигналинга, который модулирует паттернирование (формирование в процессе эмбрионального развития различных подтипов нейронов из клеток-предшественников в правильном пространственном порядке в соответствии с их локализацией вдоль переднезадней и дорсовентральной осей. — *Прим. перев.*) центральной нервной системы [5]. При активации этого пути белок Shh связывается со своим трансмембранным рецептором, Patched (Ptch), что ведет к устранению ингибирования Smoothed (Smo). Активированный Smo усиливает транскрипцию Gli генов, которые необходимы для правильного паттернирования, дифференциации и пролиферации клеток во время эмбрионального развития [6]. Во взрослом мозге Shh-сигналинг отвечает за поддержание ниши для нервных стволовых клеток в нейрогенных областях [5, 7]. После повреждения центральной нервной системы Shh-сигналинг вовлекается в усиление ряда процессов ремоделирования мозга, таких как нейрогенез, олигодендрогенез и ремоделирование аксонов [8]. Учитывая многогранную роль Shh-сигналинга в регуляции ремоделирования мозга, мы предположили, что именно этот путь опосредует нейрорепаративные эффекты Церебролизина при инсульте.

Методы

Все эксперименты были выполнены в соответствии с National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Руководство Национального института здоровья по содержанию и использованию лабораторных животных) и одобрены Institutional Animal Care and Use Committee of Henry Ford Hospital (Комитет по контролю за содержанием и использованием животных при клинике им. Генри Форда). Все измерения были выполнены исследователями, «слепыми» к экспериментальным условиям.

Изолирование и культивирование нервных клеток-предшественников

Нервные клетки-предшественники (NPCs) были изолированы из субвентрикулярной зоны (SVZ) бокового желудочка взрослых крыс ($n = 4$) и культивировались в соответствии с опубликованными протоколами [9] (см. методы в приложении, доступном on-line).

Для того, чтобы исследовать, будет ли Церебролизин повышать содержание белка Shh и его рецепторов в NPCs, к этим клеткам в питательную среду добавляли различные концентрации Церебролизина (0, 5, 10 и

20 мкл/мл). После этого измеряли мРНК-уровни соответствующих генов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени [6, 10] (см. методы в приложении, доступном on-line).

Чтобы выяснить, вовлечен ли Shh-сигналинг в эффекты Церебролизина в отношении пролиферации и дифференциации NPCs, к этим клеткам добавляли Церебролизин (0 и 20 мкл/мл) с циклопамином или без него (50 мкмоль/л). После этого оценивали клеточную пролиферацию и фенотипы нейробластов и олигодендроцитов (см. методы в приложении, доступном on-line).

Моделирование у животных

Крыс-самцов линии Вистар весом 350–400 г подвергали эмболической окклюзии средней мозговой артерии (МСАо) в соответствии с техникой, описанной ранее [11] (см. методы в приложении, доступном on-line).

Экспериментальные протоколы

Спустя 24 ч после МСАо крыс случайно распределяли в следующие группы: 1) получавших только Церебролизин; Церебролизин (2,5 мл/кг) вводили интраперитонеально ежедневно в течение 28 дней; 2) получавших только физиологический раствор; схема введения такая же, как у Церебролизина; 3) получавших Церебролизин + циклопамин; Церебролизин вводили, как описано выше, циклопамин в дозе 0,11 мкг/ч вводили внутривентрикулярно с помощью осмотического насоса в течение 28 дней; 4) получавших Церебролизин + лекарственная среда циклопамина (раствор, в котором растворялся циклопамин, в отсутствие его самого. — *Прим. перев.*); Церебролизин вводили, как описано выше, среду для лекарства (45% 2-гидроксипропил-циклодекстрин в стерильном натрий-фосфатном буфере) вводили внутривентрикулярно в течение 28 дней; 5) получавших только циклопамин; циклопамин вводили внутривентрикулярно в течение 28 дней; 6) получавших только лекарственную среду циклопамина; лекарственную среду вводили внутривентрикулярно в течение 28 дней (см. методы в приложении, доступном on-line).

Для того, чтобы пометить пролиферирующие клетки, BrdU в дозе 100 мг/кг вводили интраперитонеально ежедневно в течение 7 дней подряд, начиная спустя 24 ч после развития инсульта. Всех крыс подвергали эвтаназии спустя 35 дней после МСАо.

Поведенческие тесты

Набор поведенческих тестов, включая тест на удаление клейкой ленты (adhesive removal test; крысы на лапу наклеивают клейкую ленту и оценивают время, за которое она ее снимет с помощью рта. — *Прим. перев.*), модифицированную шкалу оценки тяжести неврологического дефицита и тест на проскальзывание ноги (foot-fault test; при перемещении животного по горизонтальной лестнице подсчитывают, сколько раз лапа окажется между ступенек. — *Прим. перев.*), выполняли еженедельно, на-

чиная спустя 1 день после развития МСАо [3] (см. методы в приложении, доступном on-line).

Оценка объема повреждения

Объем инфаркта оценивали спустя 35 дней после МСАо в соответствии с ранее описанной методикой [11] (см. методы в приложении, доступном on-line).

Иммуногистохимия

Иммуногистохимический анализ был выполнен спустя 35 дней после МСАо у крыс, получавших внутривентрикулярное введение циклопана или его среды с сочетанным введением Церебролизина или без него (см. методы в приложении, доступном on-line). Были использованы следующие первичные антитела: мышинный анти-BrdU (Dako), козлий антидаблкортин (DCX, Santa Cruz), мышинный анти-тул-1 (Tuj1, Covance), куриный антинейрофиламент (против тяжелых цепей) (NFH, Affinity Bioreagents), мышинный анти-2',3'-циклический нуклеотид 3'-фосфодиэстераза (CNPase, Millipore) и кроличий анти-NG2 (Millipore).

Статистический анализ

Полученные данные оценивали на нормальность и выполняли их трансформацию, если они не были нормально распределены. Как следствие, для анализа были использованы ранжированные данные, поскольку поведенческие данные не были нормально распределены. Для оценки межгрупповых различий по функциональному восстановлению был использован обобщенный тест, в котором в генерализующее оценивающее уравнение были включены все три вышеперечисленных поведенческих шкалы [12]. Обобщенный тест, включающий множество исходов, более эффективен, чем оценка каждого из исходов в отдельности, если групповые эффекты сравнимы по всем этим исходам [12]. Для оценки лечебного эффекта на гистологические данные был использован однофакторный дисперсионный анализ. Взаимодействие между Церебролизином и циклопанином тестировали при критическом уровне 0,05. Если взаимодействие (мультипликативный эффект) было достоверным при уровне 0,05, лечебный эффект тестировали далее на субаддитивность (комбинированный эффект Церебролизина и циклопана хуже, чем комбинированный эффект каждого из препаратов в отдельности) и супрааддитивность (наоборот). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка.

Результаты

Shh-сигналинг опосредует индуцированный Церебролизином нейрогенез и олигодендрогенез *in vitro*

При выполнении ПЦР с обратной транскрипцией было обнаружено, что инкубация NPCс с Церебролизином в концентрации 20 мкл/мл достоверно увеличивает содержание мРНК Shh и его рецепторов Ptch и Smo, в

то время как Церебролизин в концентрации 5 мкл/мл достоверно увеличивал содержание мРНК Gli1 (рис. 1А). Церебролизин достоверно увеличивал число пролиферирующих клеток, о чем свидетельствовало увеличение количества BrdU-позитивных клеток (рис. 1Б). Более того, Церебролизин значительно увеличивал количество Tuj1-позитивных и CNPase-позитивных клеток (маркеры соответственно нейробластов и олигодендроцитов) (рис. 1Б). Вместе с тем ингибирование Shh-рецепторов циклопанином, специфическим ингибитором Smo, полностью подавляло церебролизин-индуцированное увеличение Tuj1-, CNPase- и BrdU-позитивных клеток (рис. 1). В совокупности полученные данные свидетельствуют о том, что Церебролизин усиливает нейрогенез и олигодендрогенез *in vitro* посредством Shh-сигналинга.

Shh-сигналинг определяет терапевтический эффект Церебролизина в ишемизированном мозге

Анализ поведенческих тестов (тест на удаление клейкой ленты, тест на проскальзывание ноги и модифицированная шкала оценки тяжести неврологического дефицита) показал, что у всех крыс наблюдался тяжелый неврологический дефицит спустя 24 ч после развития инсульта, без достоверных различий между группами (рис. 2). У крыс с инсультом, получавших Церебролизин, наблюдалось достоверное функциональное улучшение начиная с 14-го дня после воспроизведения патологии по сравнению с крысами, получавшими физиологический раствор. Причем преимущество в первой упомянутой группе по сравнению со второй продолжало наблюдаться до 35-го дня (рис. 2). Таким образом, полученные результаты подтверждают данные, полученные нами в предыдущем исследовании [3]. При введении циклопана вместе с Церебролизином данный препарат препятствовал церебролизин-индуцированному улучшению неврологических функций, хотя введение лекарственной среды и Церебролизина не влияло на положительные эффекты Церебролизина (рис. 2). Влияние циклопана на церебролизин-индуцированное функциональное улучшение выглядит специфическим, поскольку введение крысам с инсультом только циклопана не влияло на выполнение поведенческих тестов по сравнению с крысами, получавшими лекарственную среду или физиологический раствор (рис. 2). В ходе дополнительного статистического анализа было выявлено субаддитивное взаимодействие (антагонизм) циклопана и Церебролизина в отношении влияния на неврологические функциональные исходы начиная с 14-го и вплоть до 35-го дня после инсульта. В совокупности полученные данные убедительно говорят о том, что блокада Shh-сигналинга циклопанином препятствует развитию церебролизин-индуцированного функционального улучшения.

В ходе исследования не было зафиксировано достоверных различий по объему инфаркта среди крыс, полу-

(рис. 3В). Таким образом, было отмечено субаддитивное взаимодействие циклопамина и Церебролизина в отношении влияния на плотность DCX⁺-клеток в постинфарктном стриатуме и процент DCX⁺/BrdU⁺-клеток в SVZ, что указывает на то, что циклопамин блокирует церебролизин-индуцированный нейрогенез у крыс после моделирования инсульта.

Чтобы оценить влияние Церебролизина и циклопамина на олигодендроциты в мозге после инсульта, мы оценили количество клеток-предшественников олигодендроцитов (OPCs) и зрелых олигодендроцитов, идентифицированных по маркерам фенотипа NG2 и CNPase соответственно, в SVZ и белом веществе. Перипиты также экспрессируют NG2. Чтобы исключить подсчет NG2⁺-перипитов, учитывали только те NG2⁺-клетки, которые имели типичную многоотростчатую морфологию. Введение Церебролизина достоверно увеличивало плотность NG2⁺-клеток в SVZ и перипитов в стриатуме по сравнению с крысами, получавшими в качестве контроля лекарственную среду (рис. 4А). Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что Церебролизин значительно увеличивал процент NG2⁺/BrdU⁺-клеток (рис. 4Б) и CNPase⁺/BrdU⁺-клеток (рис. 5А) в перипитовом мозолистом теле и стриатуме по сравнению с группой, получавшей в качестве контроля лекарственную среду (рис. 4 и 5). Полученные данные свидетельствуют о том, что Церебролизин усиливает олигодендрогенез в мозге с инсультом. Однако совместное введение циклопамина полностью блокирует влияние Церебролизина на олигодендроциты (рис. 4 и 5). Более того, введение только циклопамина существенно снижало процент CNPase⁺/BrdU⁺-клеток в перипитовом мозолистом теле и стриатуме, хотя не было отмечено достоверных изменений в плотности NG2⁺-клеток и проценте NG2⁺/BrdU⁺-клеток (рис. 4Г). Это указывает на то, что циклопамин может тормозить дифференцировку OPCs в зрелые олигодендроциты. В совокупности полученные данные указывают на то, что циклопамин нарушает влияние Церебролизина на олигодендрогенез в мозге после инсульта.

Зрелые олигодендроциты важны для миелинизации аксонов [13]. Чтобы изучить, будут ли вышеперечисленные изменения в олигодендрогенезе влиять на ремоделирование аксонов, мы выполнили двойное иммунофлуоресцентное окрашивание, направленное на идентификацию NFH⁺ аксонов и CNPase⁺ отростков олигодендроцитов. Было выяснено, что Церебролизин достоверно увеличивал плотность NFH⁺ и CNPase⁺ отростков в перипитовом мозолистом теле и стриатуме по сравнению с контролем в виде физиологического раствора. Однако введение циклопамина полностью подавляло церебролизин-индуцированное увеличение NFH⁺ и CNPase⁺ плотности (рис. 5В и 5Г). Эти данные свидетельствуют о том, что Церебролизин усиливает миелинизацию аксонов

и что Shh-сигналинг, по всей видимости, опосредует этот процесс.

Обсуждение

В модели фокальной церебральной ишемии, воспроизведенной на животных, нам удалось обнаружить, что Церебролизин усиливает нейрогенез и олигодендрогенез и улучшает неврологические исходы. Церебролизин модулирует Shh-путь сигнализации в NPCс, что вносит вклад в церебролизин-индуцированный нейрогенез и олигодендрогенез. Более того, полученные *in vitro* и *in vivo* данные свидетельствуют о том, что инактивация Shh-сигналинга фармакологическим блокатором Smo, циклопамином, нарушает наблюдаемые положительные эффекты Церебролизина. Это указывает на то, что Shh-сигналинг играет важную роль в церебролизин-опосредованных нейровосстановительных процессах постинсультного мозга.

Ранее нам удалось выяснить, что введение церебролизина спустя 24 ч после развития инсульта усиливает нейрогенез и функциональное восстановление у крыс с данной патологией [3]. В настоящей работе мы дополнили наши предыдущие данные, продемонстрировав тот факт, что введение Церебролизина спустя 24 ч после развития инсульта не только усиливает нейрогенез, но и в значительной мере — олигодендрогенез. В головном мозге взрослых грызунов OPCs, образующиеся в SVZ, мигрируют в серое и белое вещество и некоторые из них дифференцируются во взрослые олигодендроциты [14]. Церебролизин усиливает образование OPCs в SVZ и зрелых олигодендроцитов в белом веществе перипитового мозга, о чем свидетельствует процент BrdU/NG2- и BrdU/CNPase-позитивных клеток соответственно. В настоящем исследовании пролиферирующие клетки помечали с помощью BrdU в течение 7 дней, начиная с 1-го дня после развития инсульта; затем этих животных подвергали эвтаназии спустя 35 дней. Зрелые олигодендроциты не пролиферируют [15]. Учитывая вышеизложенное, мы полагаем, что BrdU/CNPase-позитивные олигодендроциты, наблюдаемые в настоящем исследовании, образуются, по-видимому, из пролиферирующих OPCs. Мы не можем определить, образуются ли олигодендроциты *in situ* в белом веществе или мигрируют из SVZ. В то же время наши данные *in vitro* свидетельствуют о том, что Церебролизин усиливает дифференцировку NPCс SVZ в OPCs. Повреждения мозга, включая инсульт, стимулируют миграцию NPCс SVZ к пораженному белому веществу, где они дифференцируются в зрелые олигодендроциты [16]. Следовательно, NPCс SVZ также могут вносить вклад в церебролизин-индуцированный олигодендрогенез. Однако влияние Церебролизина на миграцию, выживание и судьбу вновь образованных клеток после воспроизведения инсульта требует дальнейшего изучения.

Олигодендроциты являются единственными миелинизирующими клетками в центральной нервной системе,

в то время как для эффективной передачи нервных импульсов необходима хорошая миелинизация аксонов [17]. В мозге, пораженном инсультом, миелинизирующие олигодендроциты принимают участие в процессах ремоделирования белого вещества [18]. Наши данные свидетельствуют о том, что Церебролизин усиливает миелинизацию аксонов, оцененную по NFH/CNPase иммунореактивной плотности в перинфарктном белом веществе. Это позволяет думать, что олигодендроциты, образующиеся под влиянием Церебролизина, могут облегчать ремоделирование аксонов в мозге после инсульта. Наши данные согласуются с результатами предыдущего исследования, которые свидетельствуют о том, что Церебролизин не только защищает нейронную сеть от дегенерации, но также усиливает рост аксонов у культивируемых нейронов [19]. В ходе восстановления после инсульта рост аксонов тесно связан с миелинизирующей функцией олигодендроцитов в перинфарктных областях, и успех ремоделирования аксонов коррелирует с восстановлением неврологических функций [3, 20]. Таким образом, весьма вероятно, что усиление ремоделирования аксонов и олигодендрогенеза при введении Церебролизина может приводить к улучшению функционального восстановления после инсульта.

Важным результатом настоящего исследования является тот факт, что Shh-сигналинг опосредует положительные эффекты Церебролизина при инсульте. Блокада Shh-сигналинга *in vitro* с помощью циклопamina полностью подавляла церебролизин-индуцированный нейрогенез, олигодендрогенез и ремоделирование белого вещества, равно как и церебролизин-индуцированное улучшение функциональных исходов. По-видимому, циклопамин специфически подавляет эффекты Церебролизина, поскольку сам по себе этот препарат не ухудшает выраженность ишемического повреждения и неврологический функциональный дефицит у крыс с инсультом. Специфический характер действия циклопamina был подтвержден также нашим статистическим анализом, в ходе которого был выяснен субаддитивный эффект циклопamina и Церебролизина: комбинированный эффект совместного введения обоих препаратов был хуже, чем комбинированный эффект каждого из них в отдельности. Молекулярные механизмы, лежащие в основе взаимодействия Церебролизина и Shh-пути сигнализации, не известны. Shh-сигналинг взаимодействует с нейротрофическими факторами, такими как эпидермальный фактор роста, в ходе координации нейрогенеза [5]. Наши данные *in vitro* свидетельствуют о том, что Церебролизин увеличивает содержание белка Shh и его рецепторов, Ptch и Smo, а также фактора транскрипции, Gli1, в NPCс и что блокада Shh-сигналинга с помощью циклопamina нарушает церебролизин-индуцированную пролиферацию и дифференциацию NPCс. Все это говорит о прямом влиянии Церебролизина на активацию Shh-сигналинга. Кроме того, было сделано предположение, что Shh регулирует

паттернирование вентральной нервной трубки посредством Smo-независимого неканонического пути [21]. Таким образом, имеющиеся данные указывают на то, что Церебролизин, представляющий собой смесь нейротрофических пептидов, воздействует на Shh-сигналинг. Ранее, однако, мы показали, что Церебролизин усиливает нейрогенез посредством PI3K/Akt пути [3], что говорит о том, что церебролизин-индуцированный нейрогенез может быть независим от Shh-сигналинга. В одном из ранее выполненных исследований было выяснено, что фосфатидилинозитид-3-киназа/Akt путь синергично взаимодействует с Shh-сигналингом в процессе регуляции пролиферации и паттернирования нервных клеток-предшественников [22]. Следовательно, влияние циклопamina на Shh-путь регуляции должно быть интерпретировано с осторожностью. Необходимо проводить дополнительные исследования *in vivo*, посвященные изучению взаимодействия между Церебролизинем и Shh-путем сигнализации.

Shh-сигналинг регулирует нейрогенез [5, 7, 8]. Системное введение циклопamina в дозе 10 мг/кг/день уменьшало пролиферацию NPCс SVZ у взрослых мышей [5]. При моделировании экспериментального инсульта внутрижелудочковое введение циклопamina в низкой дозе (60 пмоль/день) уменьшало пролиферацию NPCс в гиппокампе взрослых мышей [23], а внутрижелудочковая инъекция циклопamina в дозе 1,8 мг/кг сразу после МСАо приводила к уменьшению содержания Gli1, уровня Ptch1, и усугубляло повреждение мозга и поведенческий дефицит спустя 24 ч после развития инсульта [24]. Эти данные свидетельствуют о том, что циклопамин дозозависимо и тканеспецифически может регулировать нейрогенез у взрослых и влиять на исходы инсульта. Наши данные указывают на то, что внутрижелудочковая инфузия циклопamina в дозе 2,5 мкг/день в течение 28 дней приводила к существенному снижению пролиферации NPC SVZ, но не ухудшала ишемического повреждения клеток. Более того, по сравнению с крысами, получавшими лекарственную среду, введение циклопamina не уменьшало количество DCX-позитивных нейробластов и CNPase-позитивных олигодендроцитов, что может объяснить тот факт, почему мы не выявили ухудшения неврологического исхода у этих крыс. Полученные нами данные подтверждают роль Shh-сигналинга в регуляции пролиферации NPCс SVZ. Среди прочих факторов выбранная доза циклопamina могла определять отсутствие эффекта этого препарата на выраженность ишемического повреждения, о чем сообщалось в работе Ji и соавт. [24]. Доза циклопamina, использовавшаяся для внутрижелудочковой инфузии в настоящем исследовании, составила ≈ 50 мкмоль/л в цереброспинальной жидкости, что было рассчитано исходя из объема цереброспинальной жидкости у взрослых крыс на уровне $\pm 90-120$ мкл [25]. Соответственно, эта доза имитировала концентрацию циклопamina, использовавшуюся в нашем исследовании *in vitro*.

Таким образом, данные, полученные в нашем исследовании, свидетельствуют о том, что введение Церебролизина усиливает нейрогенез, олигодендрогенез и ремоделирование аксонов в ишемизированном мозге и что Shh-сигналинг опосредует эти процессы. Данные, накопленные к сегодняшнему дню, указывают на наличие тесного взаимодействия между множеством нейрорегенераторных процессов, таких как нейрогенез, олигодендрогенез и ремоделирование аксонов, которые в своей совокупности усиливают ремоделирование мозга и неврологическое функциональное восстановление после инсульта. Следовательно, весьма вероятно, что наблюдаемые церебролизин-индуцированные процессы мозговой репарации вносят вклад в улучшение неврологических функций, наблюдаемое при введении данного препарата.

Список литературы

1. Chopp M., Li Y., Zhang Z.G. *Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies* // *Stroke*. — 2009. — 40 (suppl. 3). — S143–S145.
2. Heiss W.D., Brainin M., Bornstein N.M., Tuomilehto J., Hong Z. *Cerebrolysin Acute Stroke Treatment in Asia (CASTA) Investigators. Cerebrolysin in patients with acute ischemic stroke in Asia: results of a double-blind, placebo-controlled randomized trial* // *Stroke*. — 2012. — 43. — 630–636.
3. Zhang C., Chopp M., Cui Y., Wang L., Zhang R., Zhang L. *et al. Cerebrolysin enhances neurogenesis in the ischemic brain and improves functional outcome after stroke* // *J. Neurosci. Res.* — 2010. — 88. — 3275–3281.
4. Alvarez X.A., Cacabelos R., Sampedro C., Aleixandre M., Linares C., Granizo E. *et al. Efficacy and safety of cerebrolysin in moderate to moderately severe Alzheimer's disease: results of a randomized, doubleblind, controlled trial investigating three dosages of cerebrolysin* // *Eur. J. Neurol.* — 2011. — 18. — 59–68.
5. Palma V., Lim D.A., Dahmane N., Sanchez P., Brionne T.C., Herzberg C.D. *et al. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain* // *Development*. — 2005. — 132. — 335–344.
6. Wechsler-Reya R.J., Scott M.P. *Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog* // *Neuron*. — 1999. — 22. — 103–114.
7. Machold R., Hayashi S., Rutlin M., Muzumdar M.D., Nery S., Corbin J.G. *et al. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches* // *Neuron*. — 2003. — 39. — 937–950.
8. Wang L., Zhang Z.G., Gregg S.R., Zhang R.L., Jiao Z., Le-Tourneau Y. *et al. The Sonic hedgehog pathway mediates carbamylated erythropoietin-enhanced proliferation and differentiation of adult neural progenitor cells* // *J. Biol. Chem.* — 2007. — 282. — 32462–32470.
9. Zhang R., Zhang Z., Wang L., Wang Y., Gousev A., Zhang L. *et al. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats* // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2004. — 24. — 441–448.
10. Livak K.J., Schmittgen T.D. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method* // *Methods*. — 2001. — 25. — 402–408.
11. Zhang R.L., Chopp M., Zhang Z.G., Jiang Q., Ewing J.R. *A rat model of focal embolic cerebral ischemia* // *Brain. Res.* — 1997. — 766. — 83–92.
12. Lu M., Chen J., Lu D., Yi L., Mahmood A., Chopp M. *Global test statistics for treatment effect of stroke and traumatic brain injury in rats with administration of bone marrow stromal cells* // *J. Neurosci. Methods*. — 2003. — 128. — 183–190.
13. Lappe-Siefke C., Goebbels S., Gravel M., Nicksch E., Lee J., Braun P.E. *et al. Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination* // *Nat. Genet.* — 2003. — 33. — 366–374.
14. Menn B., Garcia-Verdugo J.M., Yaschine C., Gonzalez-Perez O., Rowitch D., Alvarez-Buylla A. *Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain* // *J. Neurosci.* — 2006. — 26. — 7907–7918.
15. Amat J.A., Farooq M., Ishiguro H., Norton W.T. *Cells of the oligodendrocyte lineage proliferate following cortical stab wounds: an in vitro analysis* // *Glia*. — 1998. — 22. — 64–71.
16. Gonzalez-Perez O., Romero-Rodriguez R., Soriano-Navarro M., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. *Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes* // *Stem. Cells*. — 2009. — 27. — 2032–2043.
17. Griffiths I., Klugmann M., Anderson T., Yool D., Thomson C., Schwab M.H. *et al. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin* // *Science*. — 1998. — 280. — 1610–1613.
18. Zhang L., Chopp M., Zhang R.L., Wang L., Zhang J., Wang Y. *et al. Erythropoietin amplifies stroke-induced oligodendrogenesis in the rat* // *PLoS One*. — 2010. — 5. — e11016.
19. Hartbauer M., Hutter-Paie B., Windisch M. *Effects of Cerebrolysin on the outgrowth and protection of processes of cultured brain neurons* // *J. Neural. Transm.* — 2001. — 108. — 581–592.
20. Ueno Y., Chopp M., Zhang L., Buller B., Liu Z., Lehman N.L. *et al. Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical perinfarct area after experimental stroke* // *Stroke*. — 2012. — 43. — 2221–2228.
21. Testaz S., Jarov A., Williams K.P., Ling L.E., Koteliensky V.E., Fournier-Thibault C. *et al. Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the Patched-Smoothened-Gli signaling pathway* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2001. — 98. — 12521–12526.
22. Peltier J., O'Neill A., Schaffer D.V. *PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation* // *Dev. Neurobiol.* — 2007. — 67. — 1348–1361.
23. Sims J.R., Lee S.W., Topalkara K., Qiu J., Xu J., Zhou Z. *et al. Sonic hedgehog regulates ischemia/hypoxia-induced neural progenitor proliferation* // *Stroke*. — 2009. — 40. — 3618–3626.
24. Ji H., Miao J., Zhang X., Du Y., Liu H., Li S. *et al. Inhibition of sonic hedgehog signaling aggravates brain damage associated with the downregulation of Gli1, Ptch1 and SOD1 expression in acute ischemic stroke* // *Neurosci. Lett.* — 2012. — 506. — 1–6.
25. Consiglio A.R., Lucion A.B. *Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats* // *Brain Res. Protoc.* — 2000. — 5. — 109–114.

Перевод с англ. А.В. Савустьяненко

Оригинал статьи опубликован в журнале *Stroke*,
July, 2013

Разрешение на публикацию получено

Получено 28.08.13 □

Zhang L.¹, Chopp M.², Meier D.H.³, Winter S.³, Wang L.¹, Szalad A.¹, Lu M.⁴, Wei M.¹, Cui Y.¹, Zhang Z.G.¹

¹ Department of Neurology, Henry Ford Hospital, Detroit, MI

² Department of Physics, Oakland University, Rochester, MI

³ EVER Neuro Pharma GmbH, Oberburgau Unterach, Austria

⁴ Department of Biostatistics and Research Epidemiology, Henry Ford Hospital, Detroit, MI

СИГНАЛЬНИЙ ШЛЯХ SONIC HEDGEHOG ВИЗНАЧАЄ ЦЕРЕБРОЛІЗИН-ІНДУКОВАНЕ ПОЛІПШЕННЯ НЕВРОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ ПІСЛЯ ІНСУЛЬТУ

Резюме. Передумови й мета дослідження. Церебралізін — препарат, що являє собою суміш нейротрофічних пептидів, підсилює нейрогенез і поліпшує неврологічні результати при експериментальному моделюванні нейродегенеративних захворювань і інсульту. Сигнальний шлях Sonic hedgehog (Shh) стимулює нейрогенез після інсульту. З огляду на це наше дослідження було присвячено пошуку відповіді на питання, чи опосередковує Shh-сигналінг церебралізін-індукований нейрогенез і поліпшення неврологічних результатів після інсульту. **Методи.** Шурам, у яких відтворювали емболічний інсульт, вводили Церебралізін із циклопаміном або без нього. **Результати.** Використовуючи нервові клітини-попередники, отримані із субвентрикулярної зони бічного шлуночка дорослих шурів, ми показали, що Церебралізін вірогідно підсилює проліферацію нервових клітин-попередників і їхню диференціацію в нейрони та мієлінізуючі олігодендроцити, що було пов'язане зі збільшенням кількості Shh-білка і його рецепторів Patched і Smoothened. Блокада Shh-сигналінгу за допомогою фармакологічного інгібітору Smoothened, циклопаміну, порушувала церебралізін-індукований нейрогенез і олігодендрогенез *in vitro*. У шурів з інсультом введення Церебралізіну через 24 год після моделювання даної патології призводило до вірогідного збільшення проліферації нервових клітин-попередників у субвентрикулярній зоні й підсилювало нейрогенез, олігодендрогенез і ремоделювання аксонів у періінфарктній зоні. На додаток до цього у шурів, що одержували Церебралізін, спостерігалось виражене поліпшення неврологічних функцій через 3–5 тижнів після розвитку інсульту порівняно зі шурами, що одержували лікарський середник циклопаміну (розчин, у якому розчинявся циклопамін, під час відсутності його самого. — Прим. перекл.). Однак інгібування Shh-шляху *in vivo* за допомогою циклопаміну повністю усувало ефекти Церебралізіну стосовно нейрорегенерації й функціонального відновлення. **Висновки.** Отримані результати свідчать про те, що Shh-сигналінг опосередковує церебралізін-індукований нейрогенез і ремоделювання білої речовини, а також функціональне відновлення у шурів після інсульту.

Ключові слова: нейрогенез, відновлення, інсульт.

Zhang L.¹, Chopp M.², Meier D.H.³, Winter S.³, Wang L.¹, Szalad A.¹, Lu M.⁴, Wei M.¹, Cui Y.¹, Zhang Z.G.¹

¹ Department of Neurology, Henry Ford Hospital, Detroit, MI

² Department of Physics, Oakland University, Rochester, MI

³ EVER Neuro Pharma GmbH, Oberburgau Unterach, Austria

⁴ Department of Biostatistics and Research Epidemiology, Henry Ford Hospital, Detroit, MI

SONIC HEDGEHOG SIGNALING PATHWAY MEDIATES CEREBROLYSIN-IMPROVED NEUROLOGICAL FUNCTION AFTER STROKE

Summary. Background and Purpose. Cerebrolysin, a mixture of neurotrophic peptides, enhances neurogenesis and improves neurological outcome in experimental neurodegenerative diseases and stroke. The Sonic hedgehog (Shh) signalling pathway stimulates neurogenesis after stroke. The present study tests whether the Shh pathway mediates cerebrolysin-induced neurogenesis and improves neurological outcome after stroke. **Methods.** Rats subjected to embolic stroke were treated with cerebrolysin with or without cyclopamine. **Results.** Using neural progenitor cells derived from the subventricular zone of the lateral ventricle of adult rats, we found that cerebrolysin significantly increased neural progenitor cells proliferation and their differentiation into neurons and myelinating oligodendrocytes, which were associated with upregulation of Shh and its receptors patched and smoothened. Blockage of the Shh signaling pathway with a pharmacological smoothened inhibitor, cyclopamine, abolished cerebrolysin-induced *in vitro* neurogenesis and oligodendrogenesis. In the ischemic rats, treatment with cerebrolysin starting 24 hours after stroke significantly increased neural progenitor cell proliferation in the subventricular zone and enhanced neurogenesis, oligodendrogenesis, and axonal remodeling in the peri-infarct area. Moreover, profound neurological function improvements were observed in rats treated with cerebrolysin from week 3 to week 5 after stroke onset compared with vehicle-treated rats. However, *in vivo* inhibition of the Shh pathway with cyclopamine completely reversed the effects of cerebrolysin on neurorestoration and functional recovery. **Conclusions.** These results demonstrate that the Shh pathway mediates cerebrolysin-enhanced neurogenesis and whitematter remodeling and improves functional recovery in rats after stroke.

Key words: neurogenesis, recovery, stroke.