

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ МОДЕЛИРОВАННОГО ТЯЖЕЛОГО ОЧАГОВОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА ФОНЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Половников Е.В.¹, Ларионов П.М.¹, Ступак В.В.¹, Цветовский С.Б.¹, Шевела Е.Я.², Черных Е.Р.²

¹ФГБУ «Новосибирский НИИ травматологи и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск, e-mail: pev37@mail.ru;

²НИИ Фундаментальной и клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, e-mail: ct_lab@mail.ru

Настоящая работа посвящена оценке влияния трансплантации мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга (МСК-КМ) и липоаспирата (МСК-ЛА) на морфофункциональное восстановление в модели тяжелого очагового повреждения головного мозга у крыс. Исследования проводили на крысах линии Вистар (самцы и самки в равном соотношении; масса тела 250-270 г; n=166). Травматическое повреждение головного мозга моделировали с использованием оригинального пружинного механизма, позволяющего дозировать силу удара. Неврологические нарушения оценивали с помощью шкалы по Chen, теста вертикальной сетки и водного лабиринта Морриса. Оценка функциональной активности клеток показала, что они обладают схожей морфологией, фенотипом, иммуносупрессорной и цитокин-секреторной активностью. При этом МСК липоаспирата превосходят костномозговые МСК по количеству клоногенных прекурсоров и пролиферативной активности, а также по продукции некоторых цитокинов. При введении МСК-КМ и МСК-ЛА в первые сутки отмечается статистически значимое снижение неврологического дефицита, улучшение показателей сомато-сенсорных вызванных потенциалов в виде нарастания амплитуды и уменьшения латентности и ускорение репаративных процессов в головном мозге при гистологическом исследовании по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: модель контролируемого коркового повреждения, неврологический дефицит, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, жировая ткань.

MORPHO-FUNCTIONAL RESTORATION OF SIMULATED SEVERE FOCAL BRAIN DAMAGE IN THE BACKGROUND OF TRANSPLANTATION OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN LABORATORY ANIMALS

Polovnikov E.V.¹, Larionov P.M.¹, Stupak V.V.¹, Tsvetovsky S.B.¹, Shevela E. Ya.², Chernykh E.R.²

¹Novosibirsk Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, e-mail: pev37@mail.ru;

²Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, e-mail: ct_lab@mail.ru

In the present study is devoted to the evaluation of the effects of transplantation of bone marrow and adipose tissue MSCs on morpho-functional restoration in the model of brain severe injury in rats. This study was performed on Wistar rats (males and females in equal proportions, with body weight of 250-270 g; n = 166). Traumatic brain injury was produced by original spring-loaded mechanism to precise dosing of impact force. Neurological disorders was assessed by Chen scale, a vertical grid test and a Morris water maze. Evaluation of the functional activity of cells showed that they have similar morphology, phenotype, immunosuppressive and cytokine-secretory activity. In this case, MSC adipose tissue is superior to bone marrow MSC in terms of the number of clonogenic precursors and proliferative activity, as well as in the production of certain cytokines MSC injections on day 1 were accompanied by a significant reduction in neurological deficit Improvement of somato-sensory induced potentials in the form of amplitude increase and decrease of latency and acceleration of reparative processes in the brain during histological examination in compare with the control group.

Keywords: controlled cortical injury model, neurological deficit, mesenchymal stem marrow, adipose cells.

Работа посвящена актуальной проблеме – чрезвычайно распространенной, опасной для жизни и нередко имеющей неблагоприятный функциональный исход тяжелой черепно-мозговой травме (ЧМТ). ЧМТ в настоящее время остается актуальной проблемой здравоохранения и нейрохирургии в целом [1-4]. Неудовлетворительные результаты лечения

ЧМТ связаны с недостаточными знаниями в области патогенеза нейротравмы. Отсутствие разработанных современных, адекватных экспериментальных моделей ЧМТ затрудняют оценку и внедрение новых методов лечения. Разработки последних лет заставляют нас задуматься о регенерации поврежденных нервных клеток. В науке продолжается поиск методов воздействия на регенеративные процессы в поврежденном мозге с применением мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Несмотря на возможные перспективы, остаются нерешенными вопросы относительно оптимальных источников для генерации МСК, не определены оптимальные сроки трансплантации и пути введения клеток. Недостаточно результатов экспериментальных исследований МСК на оптимальных моделях тяжелой ЧМТ у животных. Практически все экспериментальные модели ЧМТ имеют неврологический дефицит средней степени тяжести. Наибольший интерес вызывает тяжелая ЧМТ, не ассоциированная со спонтанным восстановлением [5]. Именно быстрое спонтанное восстановление характерно для многих лабораторных животных, что затрудняет адекватную оценку неврологического восстановления и тем более тестирование некоторых методов лечения [6-8].

В настоящее время большие перспективы в лечении очаговых повреждений головного мозга связывают с использованием МСК. Данный тип клеток способен купировать неврологический дефицит за счет продукции большого спектра ростовых и трофических факторов, которые в свою очередь способны активировать нейральные предшественники и ангиогенез, стимулировать процессы нейропластичности, а также подавлять воспаление и обеспечивать нейропротекцию [9-11]. Отсутствие моделей тяжелого очагового повреждения головного мозга, нерешенные вопросы по поводу тканевых источников для генерации МСК, сроков и путей их введения осложняют внедрение результатов исследований в клиническую практику. Учитывая принятый в России Федеральный закон «О биомедицинских клеточных продуктах» (№ 180-ФЗ от 23 июня 2016 г.), непременным условием для перехода к клинической апробации является доклиническое тестирование безопасности и эффективности клеток человека (как потенциальных клеточных продуктов) в моделях на животных.

Цель исследования

Разработать модель тяжелого очагового повреждения головного мозга и изучить влияние мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и жировой ткани на эффективность неврологического восстановления экспериментальных животных, используя клинические, электрофизиологические и морфологические методы.

Материал и методы

В эксперименте участвовало 166 белых крыс линии Wistar с массой тела от 250 до 270 граммов. Животных распределили по группам, исходя из целей и задач исследования. Для

моделирования тяжелой очаговой ЧМТ со стойкими неврологическими выпадениями был разработан оригинальный пружинный ударник (устройство запатентовано), позволяющий управлять силой ударного воздействия. Таким образом, были сформированы три группы экспериментальных животных в зависимости от применения различной силы ударного механизма. Животным первой группы (n=5) наносился удар силой менее 0,06 Дж; животным второй группы (n=38) – от 0,06 до 0,09 Дж; животным третьей группы (n=8) – более 0,10 Дж [12].

Эффект МСК оценивался в группе из 67 животных. Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (МСК-КМ) и мезенхимальные стромальные клетки липоаспирата (МСК-ЛА) были получены при проведении стерильной пункции и процедуры липосакции. Жировую ткань подвергали ферментативной диссоциации и удаляли клеточный дебрис. Также определяли количество и жизнеспособность ядродержащих клеток. Оценка МСК включала определение числа клоногенных предшественников МСК по числу фибробластных колониеобразующих единиц (КОЕ-Ф), фенотипический анализ проводился методом проточной цитофлуориметрии, оценивали иммуносупрессивную активность и продукцию цитокинов. Все животные были разделены на 5 групп. Группу контроля 1 составили 17 животных, которым наносили экспериментальное повреждение мозга и вводили физиологический раствор в поверхностную хвостовую вену на 1-е и 7-е сутки, клеточная терапия не проводилась. Группу исследования 2 (n=11) составили крысы, которым на 1-е сутки после экспериментального повреждения вводили 1 млн МСК-КМ в поверхностную хвостовую вену. Группу 3 (n=10) составили животные, которым также вводили 1 млн МСК-КМ в поверхностную хвостовую вену на 7-е сутки. В группу исследования 4 (n=17) и 5 (n=10) вошли животные, которым после нанесения повреждения также вводили в поверхностную хвостовую вену 1 млн МСК-ЛА на 1-е и 7-е сутки с момента травмы. Неврологические функции оценивали на 1, 7, 14 и 21-е сутки после экспериментальной ЧМТ с помощью шкалы тяжести неврологических нарушений (ОТНН, Chen et al., 2001). Статическую выносливость оценивали с помощью метода «вертикальной сетки». Когнитивные нарушения оценивали с помощью водного лабиринта Морриса [12]. Для оценки электрофизиологической активности головного мозга проводилась регистрация соматосенсорных вызванных потенциалов с передних конечностей со срединных нервов с помощью электромиографа «Нейропак-2» (NIHON KONDEN Corp., Япония). Оценивались такие основные нейрофизиологические показатели, как амплитуда (в мкВ) и латентность (в мс). Исследования проводились на 41 крысе. В ходе исследования были сформированы 6 групп животных: 1-я контрольная группа – животные с трепанацией без нанесения травмы, 2-я группа – «хирургического контроля» (с травмой, но без введения клеток), 3-я группа

исследования – формирование очагового повреждения головного мозга + введение МСК-КМ на 1-е сутки, 4-я группа исследования - формирование очагового повреждения + введение МСК-КМ на 7-е сутки, 5-я группа исследования – формирование очагового повреждения + введение МСК-ЛА на 1-е сутки, и 6-я группа исследования – формирование очагового повреждения + введение МСК-ЛА на 7-е сутки [12]. Гистологические препараты готовились по стандартной методике с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином. Выполнялась обзорная микроскопия, составлялась общая гистологическая картина тканевых изменений. Статистическую обработку данных проводили методами описательной, параметрической и непараметрической статистики с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Настоящее исследование соответствует этическим стандартам, выполнялось на основании норм, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Содержание лабораторных животных и экспериментальные работы проводились в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. Работа получила одобрение локального этического комитета Федерального государственного бюджетного учреждения «Новосибирский научно-исследовательский институт им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Результаты и обсуждение

Разработанная модель сопровождалась развитием тяжелого гемипареза в 1-е сутки после эксперимента. Количество баллов по шкале ОТНН составила $13,9 \pm 0,36$. К 21-м суткам у животных регистрировалось спонтанное снижение неврологических расстройств до $3,2 \pm 0,29$ балла. Тяжелый гемипарез в 1-е сутки после эксперимента присутствовал у всех животных опытных групп наравне с контрольной группой, однако неврологические улучшения в этих группах были достоверно выше по сравнению с контролем на фоне проводимой клеточной терапии, и к 21-м суткам дефицит составил $1,8 \pm 0,33$ (в контрольной группе – $3,2 \pm 0,29$). МСК-ЛА оказывают больший позитивный эффект по сравнению с МСК-КМ. Трансплантация МСК не влияет на восстановление статической выносливости и когнитивных функций. При оценке функциональных свойств клеток выявлено что МСК, выделенные из липоасpirата обладают схожей морфологией, фенотипом, иммуносупрессорной и цитокин-секреторной активностью. При этом МСК липоасpirата превосходят костномозговые МСК по количеству клоногенных прекурсоров и пролиферативной активности, а также по продукции некоторых цитокинов (IL-2, IL-13, GM-CSF, эритропоэтин).

При нанесении тяжелого очагового повреждения показатели ССВП, а именно

амплитуды на стороне повреждения в 1-е сутки после травмы были 5-кратно снижены. Восстановление амплитуды потенциалов в динамике было не достаточным, и к 21-м суткам амплитуда выросла на треть от исходного уровня. Кроме того, отмечалось возрастание латентности ССВП на всех наблюдаемых сутках. Указанные изменения регистрировались только на стороне повреждения и не выявлялись в интактном полушарии. Введение обоих типов клеток в 1-е сутки сопровождалось достоверным различием увеличения амплитуды и уменьшением латентности ССВП на 7, 14 и 21-е сутки после нанесения травмы. Несмотря на более эффективное восстановление параметров ССВП в группах с введением МСК в первые сутки (по сравнению с группой 2, в которой клеточная терапия не проводилась), полного восстановления электрофизиологической активности головного мозга не происходило. При введении МСК-КМ и МСК-ЛА на седьмые сутки отмечалось достоверное снижение латентности потенциалов на 21-е сутки и отчетливая тенденция к возрастанию их амплитуды на 14-е сутки ($p=0,07$).

При гистологическом исследовании повреждения головного мозга в изучаемой модели характеризовались очагово-диффузным характером повреждения. Зональные (кортикальные) некрозы с перивазальными кровоизлияниями диапедезного характера во всех отделах головного мозга наблюдаются уже на 1-е сутки (рис. 1).

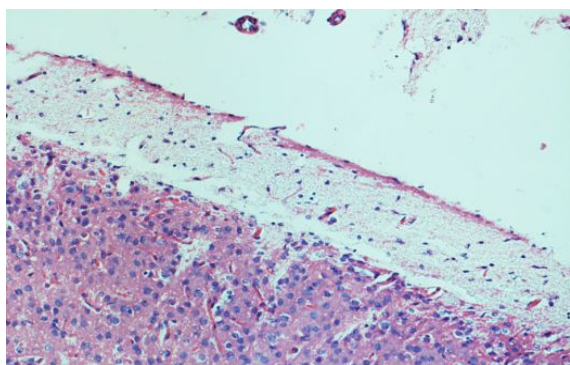


Рис. 1. 1-е сутки после ЧМТ. Зональный (кортикальный) некроз коры головного мозга

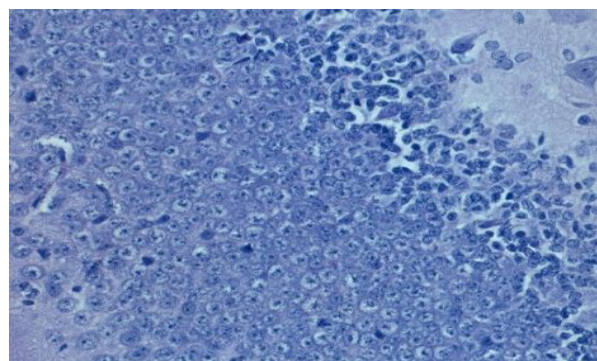


Рис. 2. 7-е сутки после ЧМТ. Плотный глиально-макрофагальный «вал»

К 7-м суткам (рис. 2) идет формирование глиально-макрофагального «вала», отграничивающего и внедряющегося в очаги ишемических некрозов с единичными глиалиновыми шарами, визуализируются проявления ангио-васкулогенеза, а также отмечается выраженная дистрофия значительного числа крупных нейрональных клеточных форм перифокального «вала» макрофагов и в его составе. На 14-е сутки идет формирование ранних склеротических изменений, присоединение умеренных диффузных воспалительных реакций, уменьшение очагов некрозов, наряду с уменьшением размеров клеточного отграничительного вала. К 21-м суткам имеют место кортикальные некрозы, продолжается

умеренно выраженный капиллярогенез и формирование глиоза. При введении МСК на первые сутки после ЧМТ имеет место массивный глиоз с акцентированной лимфоцитарной инфильтрацией тканей мозга. Стирается картина «ушиба» на седьмые сутки в сравнении с контрольной группой. Ускоряется созревание глиально-макрофагального «вала». К 14-м суткам после трансплантации МСК, по сравнению с контролем, появляются поля нейрональных клеток, что может быть связано с явлениями нейрогенеза (рис. 3).

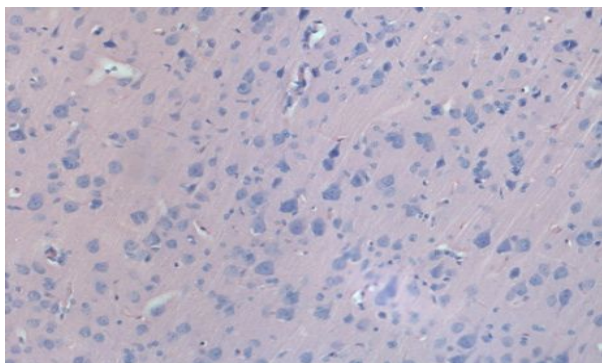


Рис. 3. 14-е сутки после ЧМТ (введение МСК). Обширные поля нейрональных клеток

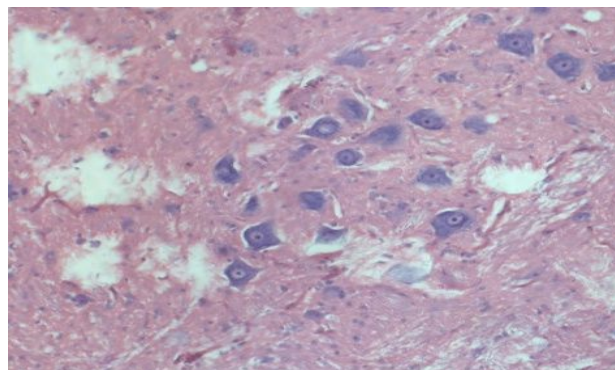


Рис. 4. 21-е сутки после ЧМТ (введение МСК). Диффузно-очаговый нейрогенез на фоне глиоза

К 21-м суткам сохраняются явления кортикальных некрозов, продолжается формирование рубца, идет диффузно-очаговый нейрогенез (рис. 4). Морфологические изменения при трансплантации МСК-КМ и МСК-ЛА в разные сроки трансплантации аналогичны и свидетельствуют об ускорении процессов репарации в исследуемой модели.

Заключение

Работ по экспериментальной медицине с использованием различных типов клеток в разных моделях ЧМТ достаточно много. Механизм действия на восстановление моторного дефицита у лабораторного животного остается дискуссионным. В нашем исследовании мы сравнили действие двух типов клеток (клеток костного мозга и жировой ткани) в одном эксперименте, ранее таких работ проведено не было. Также была доказана способность мезенхимальных клеток влиять на морфофункциональное восстановление у крыс с грубым неврологическим дефицитом в модели тяжелого очагового повреждения головного мозга, купируя его. Данные проведенного исследования показали, что клетки, введенные на 1-е сутки после травмы, приводят к улучшению неврологического дефицита быстрее, чем клетки, введенные в более поздние сроки. В то же время каких-либо преимуществ одних клеток перед другими не было выявлено. Тем не менее при введении МСК на 1-е сутки после травмы у животных отмечалось более быстрое восстановление способности к самостоятельному приему пищи. Таким образом, был сделан вывод, что действие МСК,

направленное на улучшение неврологического дефицита, зависит от паракринной регуляции воспалительного и иммунного ответа. Следовательно, локальное введение клеток теряет смысл. Полученные данные позволяют планировать дальнейшие исследования, с использованием ультраструктурных методов, которые помогут получить прямые доказательства сделанных выводов.

Список литературы

1. Лихтерман Л.Б. Черепно-мозговая травма. Диагностика и лечение. – М.: Гэотар-Медиа, 2014. – 488 с.
2. Peeters W. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe / W. Peeters, van den R. Brande, S. Polinder [et al.] // *Acta Neurochirurgica*. – 2015. – Vol. 157, № 10. – P. 1683–1696.
3. Пурас Ю.В. Факторы риска развития неблагоприятного исхода в хирургическом лечении острой черепно-мозговой травмы: лекция / Ю.В. Пурас, А.Э. Талыпов // *Нейрохирургия*. – 2013. – № 2. – С. 8–16.
4. Потапов А.А. Клинические рекомендации «Лечение пострадавших с тяжелой черепно-мозговой травмой» / А.А. Потапов, В.В. Крылов, Л.Б. Лихтерман [и др.]; Ассоц. нейрохирургов России. – М., 2014. – 21 с.
5. Бер М. Топический диагноз в неврологии по Петеру Дуусу: анатомия, физиология, клиника / М. Бер, М. Фротшер // *Практическая медицина*. – М., 2009. – С. 444–449.
6. Григорян А.С. Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на развитие посттравматических процессов в головном мозге крыс: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – СПб., 2010. – 23 с.
7. Южаков В.В. Действие аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на репаративные процессы в нервной ткани при диффузной травме головного мозга крыс / В.В. Южаков, А.Г. Конопляников, А.Ф. Цыб, [и др.] // Тезисы докладов Всероссийской и международной научной конференции «Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении» (Москва, 30–31 мая 2007 г.). – М., 2007. – С. 1–12.
8. Baraniak P.R. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration / P.R. Baraniak, T.C. McDevitt // *Regenerative Medicine*. – 2010. – Vol. 5, № 1. – P. 121–143. doi: 10.2217/rme.09.74
9. Brody D.L. Electromagnetic controlled cortical impact device for precise, graded experimental traumatic brain injury / D.L. Brody, C. MacDonald, C.C. Kessens [et al.] // *Neurotrauma*. – 2007. – Vol. 24, № 4. – P. 657–673.
10. Chen Z. Human amnion-derived multipotent progenitor cell treatment alleviates traumatic brain injury-induced axonal degeneration / Z. Chen, F.C. Tortella, J.R. Dave [et al.] // *Journal of*

Neurotrauma. – 2009. – Vol. 26. – P. 1987–1997.

11. Curtis M.A. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension / M.A. Curtis, M. Kam, U. Nannmark [et al.] // Science. – 2007. – Vol. 315. – P. 1243–1249.

12. Половников Е.В. Влияние мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и жировой ткани человека на эффективность восстановления неврологического дефицита в модели черепно-мозговой травмы у крыс / Е.В. Половников, В.В. Ступак, А.Г. Самохин и др. // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2012. – № 3, ч. 2. – С. 301–304.