

Экспериментальное обоснование применения стволовых эмбриональных клеток в лечении больных с экстрапирамидными гиперкинезами

В.И. Сипитый¹, И.А. Кутовой¹, Т.В. Ганулич¹, А.Ю. Петренко²

¹Харьковский государственный медицинский университет

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В последнее десятилетие, в связи с увеличением средней продолжительности жизни, неблагоприятными экологическими условиями во многих странах отмечено заметное увеличение заболеваемости сосудистыми заболеваниями, что, в свою очередь, приводит к росту встречаемости экстрапирамидных гиперкинезов (ЭГ). Консервативное лечение этих состояний, как правило, малоэффективно, требует постоянного и длительного применения медикаментов в больших дозах.

Наиболее эффективным методом лечения ЭГ считают стереотаксическое воздействие на глубинные подкорковые структуры головного мозга. Метод деструкции или электростимуляции подкорковых ганглиев позволяет, в большинстве случаев, эффективно устранить гиперкинетический синдром за счет разрыва сформированных патологических кольцевых связей в стриопал-лидарной системе [9]. С 1993 по март 2005 года в клинике нейрохирургии ХГМУ под руководством академика АН ВШ Украины, профессора В.И.Сипитого успешно применялся малоинвазивный неструктуривный способ лечения ЭГ, основанный на применении криоконсервированных эмбриональных нервных тканей (КЭНТ) в различные участки стриопаллидарной системы с последующей паллидостимуляцией через имплантированный платино-ирридиевый электрод [13, 14].

Оперативное лечение ЭГ осуществлялось в условиях специально оборудованной КТ-операционной под контролем пошагового компьютерного томографа СТ MAX General Electric и спирального томографа SOMATOM Siemens. Функциональный контроль осуществлялся на компьютерном электроэнцефалографическом комплексе DX-NT 32 при помощи электросубкортикографии методом визуальной оценки, а также спектрального анализа. Электростимуляция также применялась в качестве функционального контроля. Применение современных компьютерных систем с целью навигации и функционального контроля позволяют избежать многих осложнений связанных с применением контрастных веществ и погреш-

ностью при проведении традиционных стереотаксических расчетов.

С целью нейротрансплантации применяли препараты КЭНТ человека, приготовленные в НИИ проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (директор академик НАН Украины В.И. Грищенко). На метод лечения больных с ЭГ с помощью нейротрансплантации КЭНТ получен патент Украины [6].

Всего пролечено данным методом 40 больных с ЭГ (17 мужчин и 23 женщины), возраст больных варьировал от 21 до 75 лет, в среднем составил 44,2 года. Проведено 45 оперативных вмешательств. Из 45 проведенных операций произведено 4 (10%) стереотаксические криоталамотомии, 3 (6%) операции сочетали криоталамотомию с нейротрансплантацией КЭНТ. Недеструктивным малоинвазивным методом проведено 38 (84%) операций. Из них 29 (76%) изолированных нейротрансплантаций КЭНТ и 9 (24%) операций сочетали нейротрансплантацию КЭНТ с имплантацией краткосрочных электродов для гомолатеральной электростимуляции бледного шара. Анализ результатов применения КЭНТ в стереотаксических операциях в сочетании с паллидостимуляцией показал их высокую эффективность.

Дискутабельность использования в клинической практике эмбриональных клеток млекопитающих побудила нас изучить состояние трансплантатов криоконсервированных эмбриональных клеток центральной нервной системы человека пересаженных в зону повреждения головного мозга крыс [17, 18].

Материалы и методы

Работа проводилась на базе Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Эксперименты выполнены на 32 беспородных белых крысах-самцах, которые оставались живыми после моделирования экстрапирамидной патологии мозга. Средний вес крыс – 250 г. Крысы, которым было выполнено лишь моделирование правополушарного экстрапирамидного синдрома, составили группу контроля, а крысы, которым после такого же моделирования экстрапирамидного синдрома трансплантировали криоконсервированную эмбриональную нервную ткань человека,

Адрес для корреспонденции: Сипитый В.И., Харьковский государственный медицинский университет, пр. Ленина, 4, г. Харьков, Украина 61000; тел.:+38 (057) 705-67-27

составили основную группу подопытных животных. Для трансплантации использовали криоконсервированные эмбриональные нервные ткани человека (срок гестации 7–10 нед.).

Остановив свой выбор на крысах, как экспериментальном материале, мы использовали такие уже известные данные: моделирование разных нейropатологических синдромов у животных базируется на общих нейробиологических закономерностях и фундаментальных механизмах нервной деятельности человека и животных [4]. Большинство работ по нейротрансплантации проведено именно на крысах, которые имеют высокую репродуктивность при относительно коротком периоде беременности, большие компенсаторно-восстановительные возможности, а содержание их не требует значительных материальных затрат.

Экспериментально установлено, что трансплантация аллотопических эмбриональных тканей (печеночной, селезенки) вызывают только явления выраженной воспалительной реакции с наличием диффузной инфильтрации очага поражения и тканей перифокальной области мозга лейкоцитами и лимфоцитами или их очаговыми скоплениями. Необходимо подчеркнуть, что отличительной чертой морфологических изменений в случае использования этих тканей в качестве трансплантатов было наличие зон бесструктурных масс, которые свидетельствуют об отторжении трансплантатов. Эти данные позволили сделать вывод – все эмбриональные ткани кроме нервной несовместимы с тканями мозга и не могут быть использованы для в лечения церебральной патологии [4, 5]. Учитывая результаты предыдущих исследований мы не создавали дополнительных контрольных групп эксперимента.

Известно, что формированию экстрапирамидного синдрома способствует нарушение нормальной организации субкортикально-кортикальных взаимоотношений [19].

Функциональное значение базальных ганглиев прежде всего определяется обширной информацией, поступающей в стриатум от всех областей коры головного мозга, центрального таламуса и среднего мозга. Результаты большого числа экспериментальных исследований показывают, что взаимодействие различных нейротрансмиттерных систем происходит на уровне шиповидных нейронов стриатума, которые имеют многочисленные синаптические контакты как между собой, так и с разными популяциями вставочных нейронов. На уровне шиповидных нейронов конвергируют различные потоки импульсов, опосредуемые разными нейротрансмиттерами, и происходит сложная “компьютерная” переработка всей поступающей

информации. Результаты этой переработки определяют активность эфферентных путей стриатума, направляющихся к черной субстанции и бледному шару. Показано, в частности, что поток специфической информации может вызвать экстренное торможение генерации эфферентных импульсов в проекционных нейронах стриатума [1, 10, 11, 15, 16].

Известно большое количество способов моделирования патологии глубинных структур головного мозга деструктивными методами. Целью деструкции является формирование зоны некроза с последующим развитием функциональных расстройств базальных ганглиев в виде экстрапирамидного гиперкинетического синдрома [8].

Электролитический способ разрушения глубоких структур мозга имеет ряд преимуществ перед другими методиками. Перечислим некоторые существенные недостатки различных деструктивных методик. Диатермический метод разрушения требует сложного устройства электродов и специальной аппаратуры [7]. Коагулирующие жидкости вызывают образование обширных очагов разрушения, объем которых нельзя заранее предусмотреть. В еще большей степени этот недостаток присущ радиоактивным веществам, применяемым с целью разрушения. Механическое повреждение сопровождается значительным кровоизлиянием вследствие глубокого разрыва сосудов. Метод низкотемпературного замораживания, имеет ряд преимуществ. Однако существенный недостаток применения этого способа у крыс – это большой диаметр криозонда, одно введение его в мозг животного вызывает значительные механические повреждения. По этой причине разрушение глубинных структур мозга крысы этим методом нецелесообразно.

Моделирование правополушарного экстрапирамидного синдрома осуществлялось следующим образом. Животного обезболивали по принятой методике. Голову фиксировали в стереотаксическом аппарате на столе для препарирования в положении на животе. Все операции проведены методом электролитического разрушения анодом постоянного тока посредством константанового электрода. Индифферентным электродом служил свинцовый стержень, который вводился в анальное отверстие животного.

Скелетотопическими ориентирами на черепе крысы служили венечный и стреловидный швы, брегма (точка пересечения указанных швов), а также ламбда (точка пересечения сагиттального и сигмовидного швов).

В условиях эфирного наркоза голова животного фиксировалась в стереотаксической установке за

верхние резцы и наружные слуховые проходы так, чтобы брегма находилась на 1 мм выше ламбды, а сагиттальная плоскость проходила строго через верхние резцы и стреловидный шов.

Разрез кожи длиной до 1,5 см и обнажение костного операционного поля производили в области проекции сагиттального шва на 0,5 см кзади от линии, проведенной через верхние края орбит. Кость скелетировали для достаточной визуализации брегмы и стреловидного шва.

Основной стереотаксической мишенью являлась подкорковая структура Caudate-Putamen complex (CDP), которая является у животного основным звеном в нейрорегуляции экстра-пирамидных функций. Стереотаксические координаты CDP определяли по атласу Fikova and Marsala (1967) на 1 мм каудальнее от фронтальной нулевой плоскости, на 3,6 мм латеральнее сагиттальной нулевой плоскости и на глубине 6,3 мм от поверхности кости [2,3]. Фрезевое отверстие накладывалось на 1 мм кзади от брегмы и на 3,6 мм правее стреловидного шва. Константановый микроэлектрод диаметром 120 мкм покрытый бакелитовой изоляцией с рабочим кончиком 0,8 мм вводился в область CDP. Микроэлектроды изготавливались в отделе криофизиологии Института криобиологии и криомедицины НАН Украины. Проводилось электролитическое разрушение указанной области постоянным током силой 5 мА при экспозиции в 1 мин. Затем микроэлектрод извлекался. Трепанационное отверстие закрывалось стерильным расплавленным воском. Рана ушивалась узловыми швами и засыпалась стрептоцидом.

После пробуждения животное помещали в отдельную клетку для наблюдения, а на следующий день в общий виварий. Все оперированные животные выжили, однако у 4 крыс отмечалась осложнение в виде глубокого угнетения функции внешнего дыхания, вследствие длительности операции и наркоза. В этих случаях проводилась

ИВЛ аппаратом РО-2 до восстановления дыхательной функции.

Результаты и обсуждение

При электролитическом разрушении анодным током очаги некроза хорошо очерчены и четко отграничены от неповрежденной ткани. Эта картина наблюдается в первые дни после электролитического разрушения.

Через две недели после деструкции выявляется крупный дефект мозгового вещества (кора во всех слоях и прилежащее белое вещество) по краю в виде сосочков с утраченной колончатостью, умеренной гиперплазией глиальных элементов и десквамацией мягкой мозговой оболочки (рис. 1).

В прилежащих отделах мозговой ткани дистрофия клеточных элементов вплоть до трансформации в клетки-тени, выраженный периваскулярный и перичеселлюлярный отек (рис. 2).

Через две недели после пересадки трансплантат представляет собой нейроны на стадии нейробластов, находящихся в различных стадиях дифференцировки с вертикальной упорядоченностью, местами в средних отделах – разноориентированных, кое-где нагруженных гемосидерином (рис. 3).

Через четыре недели трансплантат был представлен нейробластами в различных стадиях дифференцировки, очаговой пролиферацией клеток с формированием розеток (см. рис. 4).

Трансплантат трехмесячной давности (12 недель) представлен нейроглиальными клетками с островковой их пролиферацией. Отмечается тенденция к формированию розеток с наличием мелких кальцификатов и склерозом артерий оболочек основания мозга (рис. 5).

Через пять с половиной месяцев (22 недели) после трансплантации трансплантат представлен хорошо дифференцированными нервными клетками, частью пирамидальной формы с четкой ориентацией дендритов, глиальными элементами

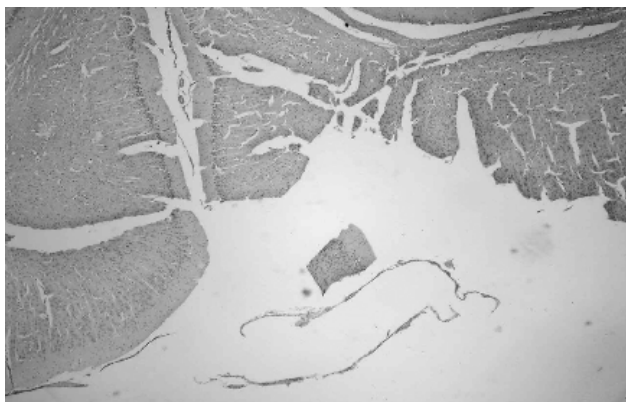


Рис. 1. Экспериментальная деструкция анодным током комплекса CDP. Две недели после деструкции. Полутолкий срез. Окраска гематоксилин-эозином. $\times 100$.

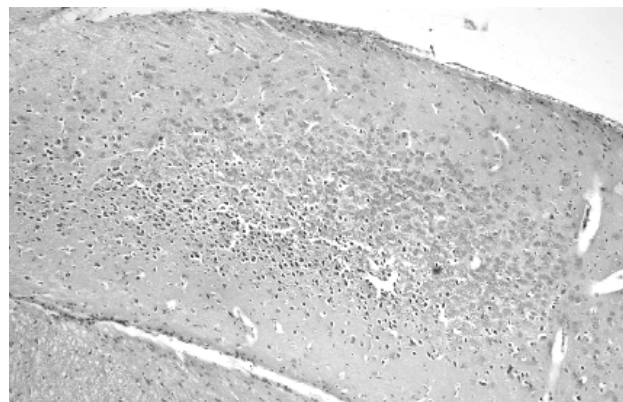


Рис. 2. Экспериментальная деструкция анодным током комплекса CDP. Две недели после деструкции. Полутолкий срез. Окраска гематоксилин-эозином. $\times 200$.

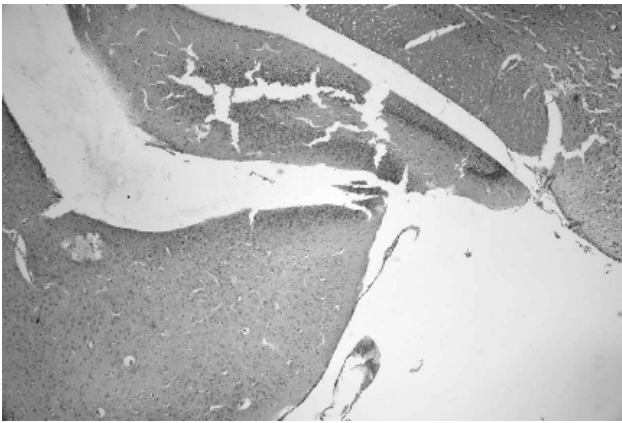


Рис. 3. Две недели после трансплантации в зону деструкции КЭНТ человека. Полутонкий срез. Окраска гематоксилин-эозином. $\times 100$.

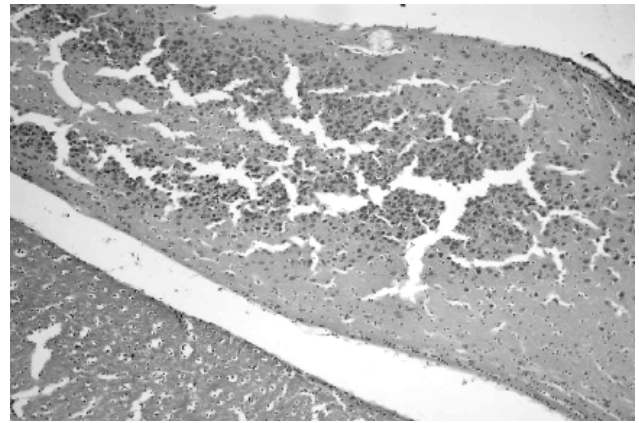


Рис. 4. Четыре недели после трансплантации в зону деструкции КЭНТ человека. Полутонкий срез. Окраска гематоксилин-эозином. $\times 160$.

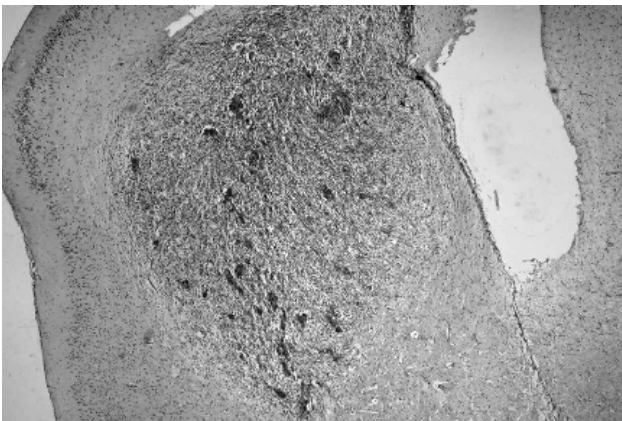


Рис. 5. Двенадцать недель после трансплантации в зону деструкции КЭНТ человека. Полутонкий срез. Окраска гематоксилин-эозином. $\times 160$.

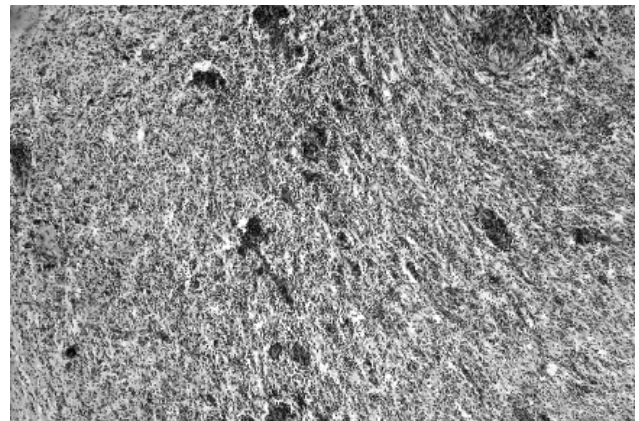


Рис. 6. Двадцать две недели после трансплантации в зону деструкции КЭНТ человека. Полутонкий срез. Окраска гематоксилин-эозином. $\times 240$.

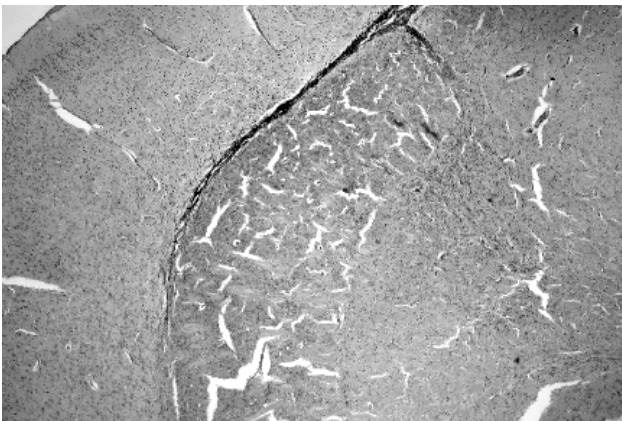


Рис. 7. Двадцать две недели после трансплантации в зону деструкции КЭНТ человека. Полутонкий срез. Окраска гематоксилин-эозином. $\times 200$.

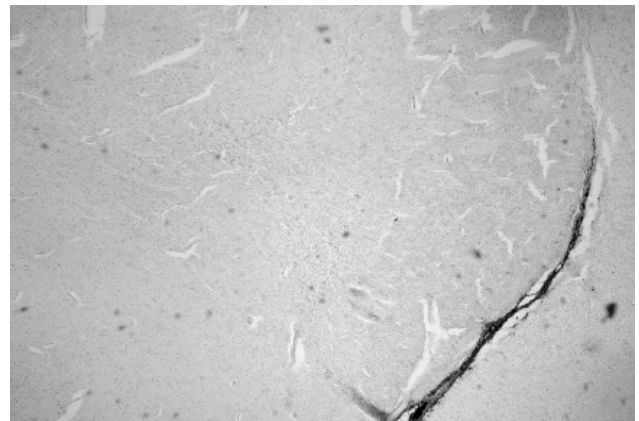


Рис. 8. Двадцать две недели после трансплантации в зону деструкции КЭНТ человека. Полутонкий срез. Реакция Перлса. $\times 200$.

и хорошей васкуляризацией. В области подкорковых узлов выявлена крупноочаговая густоклеточная пролиферация гиперхромных нейроглиальных клеток (рис. 6).

Оболочки мозга с очаговым гемосидерозом и их сосуды склерозированы (рис. 7, 8).

Мы неслучайно выбрали для трансплантации экспериментальным животным именно челове-

ческие нейроклетки. Мы поставили целью протестировать пролиферативную способность материала, который применяется для введения людям. Необходимо было оценить патентность криоконсервированного материала в разные сроки после трансплантации.

Трансплантация проводилась через 15 дней после электролитической деструкции анодным

током. Сроки для трансплантации были выбраны в соответствии с общеизвестными критериями оценки воспалительных изменений после деструктивного воздействия.

Выводы

Таким образом, проведенное морфологическое исследование свидетельствует о приживлении и

длительном переживании ткани трансплантата эмбриональных нервных клеток человеческих эмбрионов в головном мозге крыс с дифференцировкой нервных и глиальных клеток, активной васкуляризацией их и очаговой пролиферацией, что согласуется с данными многих авторов (Сенаторов В.В., Обухова Т.П., 1986; Гилерович Е.Г. с соавт., 1990).

Литература

1. Бархатова В.П. Нейротрансмиттеры и экстрапирамидная патология.– М.: Медицина, 1988.– 175 с.
2. Буреш Я., Петрань М., Захар И. Электрофизиологические методы исследования.– Москва: Изд-во иностр. литературы, 1962.– 456 с.
3. Буреш Я., Бурешова О. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения.– Москва: "Высшая школа", 1991.– 399 с.
4. Пичкур Л.Д. Компенсаторно-восстановительные возможности трансплантации эмбриональной нервной ткани при экспериментальном ушибе головного мозга: Дис. ... канд. мед. наук.– Киев, 1993.
5. Полежаев Л.В., Александрова М.А. Трансплантация ткани мозга в норме и патологии.– М., 1986.– 250 с.
6. Патент №40336 А, Україна, МПК 61В17/00. Спосіб хірургічного лікування екстрапірамідних гіперкінезів у хворих із церебросудинною патологією / В.І. Сіпітий, В.О. П'ятикоп, І.О. Кутовий, І.А. Григорова.- Оубл. Бюл. Промислова власність.– 2001.- №6.– С. 1.25.
7. Тишанькин В.Ф. Изменения высшей нервной деятельности при разрушении подкорковых образований / В кн.: Проблемы высшей нервной деятельности.– М., 1949.– С. 200-220.
8. Черкес В.А. Олешко Н.Н. Физиология головного мозга.– Киев, 1976.– 103 с.
9. Экстрапирамидные расстройства: Руководство по диагностике и лечению / Под ред. В.Н. Штока, И.А. Ивановой-Смоленской, О.С. Левина.– М.: Медпресс.– 2002.– 600 с.
10. Yoshida M. The GABA-ergic systems and the role of basal ganglia in motor control // Adv. Biochem. Psychopharmacol.– 1981.– Vol. 30.– P. 37-52.
11. Alexander G.E., Crutcher M.D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing // Trends Neurosci.– 1990.– Vol. 13.– P. 266-271.
12. Gerfen C.R. Dopamine receptor function in the basal ganglia // Clin. Neuropharmacol.– 1995.– Vol. 18.– P. 162-177.
13. Gross R.E. Deep brain stimulation in the treatment of neurological and psychiatric disease // Exp. Rev. Neurother.– 2004.– Vol.4.– P. 465-478.
14. Krauss J.K., Yianni J., Lohr T.J. et al. Deep brain stimulation for dystonia // J. Clin. Neurophysiol.– 2004.– Vol. 21.– P. 18-30.
15. Marsden C.D., Obeso J.A. The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease // Brain.– 1994.– Vol. 117.– P. 877-897.
16. Parent A., Hairati L.N. Functional anatomy of the basal ganglia. 1. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop // Brain Res. Rev.– 1995.– Vol. 20.– P. 91-127.
17. Palfi S., Leventhal L., Chu Y. et al. Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration // J. Neurosci.– 2002.– Vol. 22.– P. 4942-4954.
18. Starr H.F., Witchman T., van Horne C., Bakay R.A. Intranigral transplantation of fetal substantia nigra allograft in the hemiparkinsonian rhesus monkey // Cell Transplant.– 1999.– Vol. 8, N1.– P. 37-45.
19. Wichmann T., DeLong M.R. Functional and pathophysiological models of the basal ganglia // Cur. Opin. Neurobiol.– 1996.– Vol. 6.– P. 751-758.