

Восстановление структурно-функциональных параметров у крыс с криогенной травмой головного мозга после трансплантации клеток стромы костного мозга, индуцированных в нейробласты

В.А. Пятикоп¹, Е.А. ШЕГЕЛЬСКАЯ², Ю.Е. МИКУЛИНСКИЙ², В.М. ШЕВЕРЕВА³, В.К.ДВОРЦЕВОЙ⁴

¹Харьковский государственный медицинский университет

²Лаборатория молекулярной диагностики и клеточных биотехнологий "Вирола", г. Харьков

³Институт биологии, ХНУ им. В.Н.Каразина, г.Харьков

⁴Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Известно, что при черепно-мозговой травме (ЧМТ) происходят структурно-функциональные изменения головного мозга, иммунологические нарушения, нарушение липидного и нейромедиаторного обмена, а также другие изменения в системе гомеостаза, требующие проведения определенной коррекции.

В проблеме социальной адаптации больных, перенесших тяжелую ЧМТ, одно из ведущих мест занимает восстановление двигательных расстройств. Морфологическим субстратом двигательных нарушений в виде геми- или монопареза, моторной афазии, парезов лицевого нерва и других является посттравматический глиальный рубец или посттравматическая церебральная киста, образовавшиеся на месте очага размозжения, возникшего в результате травмы. Одной из основных задач нейрохирурга в остром периоде тяжелой ЧМТ является удаление очага контузии-размозжения с целью предотвращения формирования посттравматической кисты и образования глиального мозгового рубца. Традиционно считалось, что наличие очага контузии-размозжения головного мозга, выявляемого магнитно-резонансным или рентгеновским компьютерным томографом, является показанием к нейрохирургической операции. Однако оперативное вмешательство не предотвращает развитие морфологических последствий очагового поражения мозга, а иногда влечет за собой дополнительную травматизацию окружающего мозгового вещества. В последнее время появился ряд научных работ, которые свидетельствуют об эффективности расширения показаний к консервативному лечению больных с ушибами головного мозга [2].

В комплексе лечебных мероприятий как в остром, так и в отдаленном периоде травматической болезни мозга, с целью коррекции двигательных нарушений у больных, перенесших ЧМТ, в последние годы некоторые авторы используют трансплантацию эмбриональных нервных клеток (ЭНК) [3]. Полученные резуль-

таты свидетельствуют о положительном влиянии трансплантации ЭНК на восстановление нарушенных двигательных функций, как при экспериментальной травме головного мозга, так и в клинической практике [1, 3]. Однако применение ЭНК связано с проблемами морально-этического характера, отсутствием достаточного количества жизнеспособных клеток для эффективной трансплантации и нестабильностью достигнутого положительного результата. В то же время, имеются данные о возможности применения аутоклеток стромы костного мозга, индуцированных в нейробласты, в лечении ряда нейродегенеративных заболеваний [6, 7, 8].

Цель исследования – изучение динамики двигательных реакций крыс и гисто-морфологических особенностей очага криогенной травмы головного мозга после трансплантации клеток стромы костного мозга (КСКМ), индуцированных в нейробласты.

Материалы и методы

Исследование проведено на 12 крысах-самцах линии Вистар, весом 220–270г. Моделирование криогенной травмы головного мозга у крыс проводили по описанной методике [9] в нашей модификации.

Крысу в условиях тиопенталового наркоза (0,375 натрия тиопентала + 0,0001 г атропина сульфата внутривенно) помещали в стереотаксический аппарат. С помощью бора диаметром 3 мм в левой теменной кости, на середине расстояния между коронарным и лямбдовидным швами, на 3 мм латеральнее сагиттальной линии, наносили фрезевое отверстие. Твердая мозговая оболочка оставалась интактной. Автономный нейрохирургический криозонд, с наружным диаметром 2 мм, устанавливали в стереотаксический аппарат и вводили его рабочую часть в сформированное в кости отверстие, а затем производили четырехкратную криодеструкцию моторной зоны коры головного мозга с временем экспозиции по 30 сек. Практически у всех животных вызывали полную гемиплегию. Нейротрансплантацию (НТ) проводили с использованием

Адрес для корреспонденции: В.А. Пятикоп, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 705-67-48, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

стереотаксического аппарата через 7 дней после криодеструкции. Затем животных разделили на две группы: I – с нейротрансплантацией КСКМ (n=7) и II – контрольную группу (n=5).

КСКМ крысы получали из костного мозга бедренной кости, размножали в культуре до образования клеточного монослоя (рис. 1) по методике [5] и индуцировали в нейробласты (рис. 2) под действием ретиноевой кислоты (10^{-6} М). КСКМ, индуцированные в нейробласты, перед трансплантацией метили суправитальным зеленым флюоресцентным красителем DDC, синтезированным в Институте “Монокристалл”, Харьков. DDC связывается с липидными компонентами клеточной мембраны, не повреждая клетку, и позволяет проследить судьбу меченых клеток после трансплантации, по крайней мере, в течение 2 недель.

Нейротрансплантацию осуществляли путем стереотаксического введения 5µl суспензии клеток (50×10^5 клеток) в область криотравмы моторной коры мозга через центр фрезевого отверстия на глубину 2 мм от твердой мозговой оболочки с помощью шприца Hamilton.

Гисто-морфологические исследования проводили на криосрезках мозга крыс на 8 и 14 сутки после моделирования криогенной травмы головного мозга.

Результаты и обсуждение

Двигательные расстройства в виде глубокого гемипареза, вплоть до гемиплегии, наступали у всех животных сразу после проведения криодеструкции моторной зоны коры головного мозга. Кроме двигательных нарушений у животных отмечали поведенческие нарушения в виде сонливости в течение первых 3-5 часов после операции, отказа

от приема пищи на протяжении первых суток, вялости, гиподинамии. Признаки восстановления двигательных нарушений у контрольной группы животных (5 крыс) начинались с 10-11 суток. Регресс гемиплегии у 3 животных наблюдался с верхней конечности, у 2 – с нижней. Полное восстановление движений произошло у 2 животных через 22 и 25 суток после моделирования криогенной травмы мозга. У остальных 3 животных явления гемиплегии уменьшились, однако полного восстановления движений в конечностях не наблюдалось даже через 60 суток.

Наблюдение за животными, которым была произведена нейротрансплантация КСКМ, индуцированных в нейробласты, показало, что процесс восстановления гемиплегии и гемипареза у них начинался на 9-11 сутки после травмы, т.е. через 2-4 дня после нейротрансплантации.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что НТ способствует ускоренному адекватному восстановлению зоны повреждения коры головного мозга, и, возможно, предотвращает формирование посттравматического соединительнотканного мозгового рубца, который и определяет необратимость травмы.

На вторые сутки после трансплантации меченые клетки обнаруживались в зоне травмы в виде компактной группы с интенсивной зеленой флюоресценцией (рис. 3). Через неделю после нейротрансплантации меченые клетки проникали в ткань мозга, граничащую с травмой, и равномерно распределялись среди клеток реципиента (рис. 4). Интенсивность флюоресценции клеток при этом была ниже.

Полученные результаты настоящего сообщения свидетельствуют о совпадении сроков восстановления двигательных нарушений и сроков

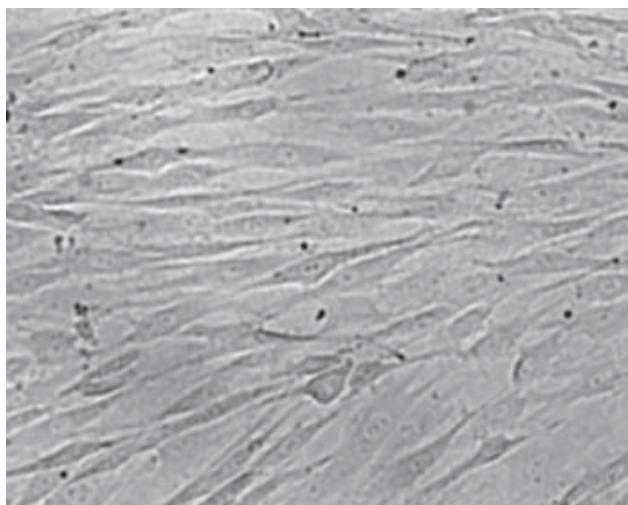


Рис. 1. Клетки стромы костного мозга крысы в культуре. Ув. 200.

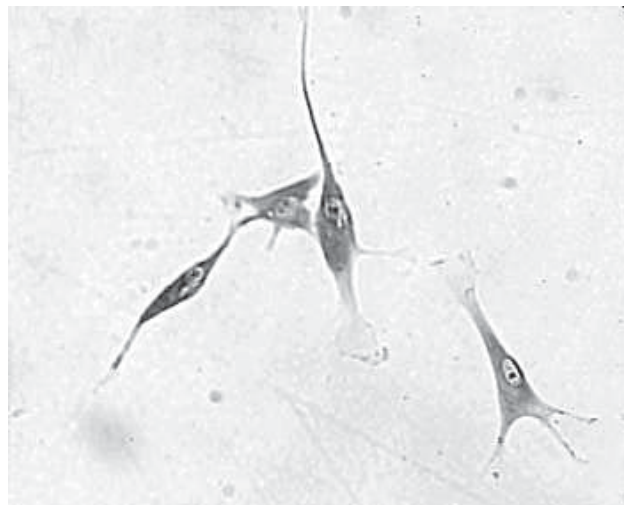


Рис. 2. Клетки стромы костного мозга крысы, индуцированные в нейробласты под действием ретиноевой кислоты. Окраска метиленовым синим. Ув. 300.

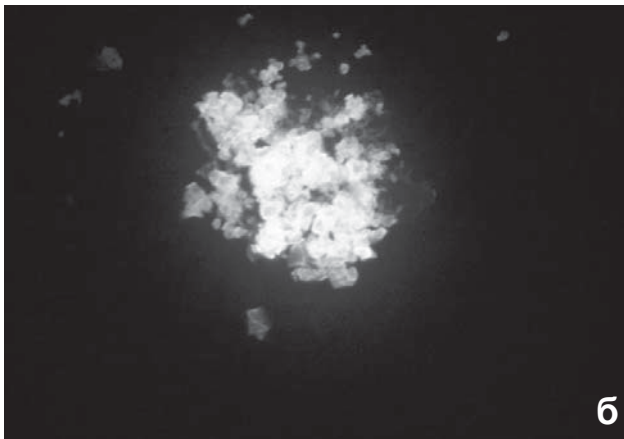
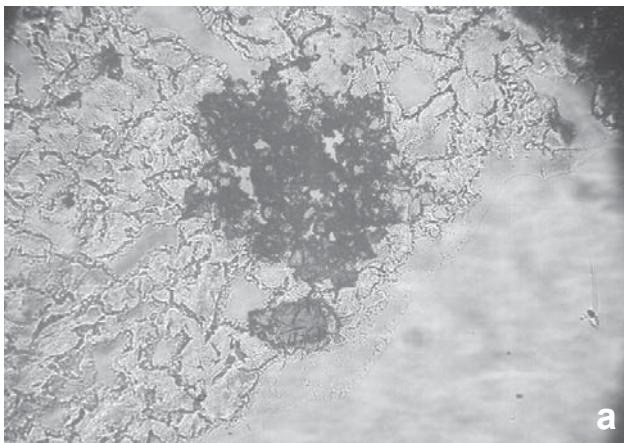


Рис. 3. Компактное скопление меченых КСКМ, индуцированных в нейробласты, в зоне криотравмы на 2 сутки после нейротрансплантации. Ув.100. Световая (а) и люминесцентная микроскопия (б).

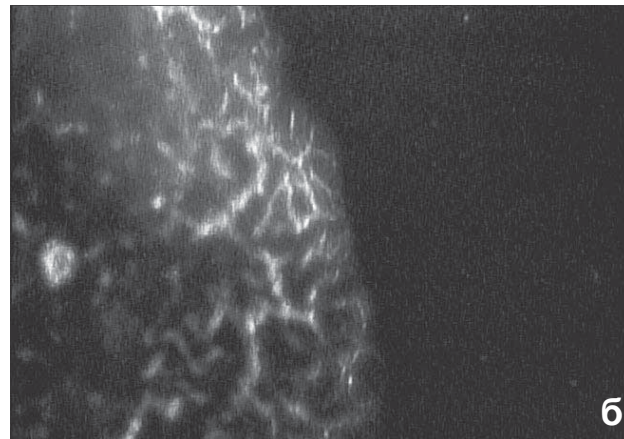
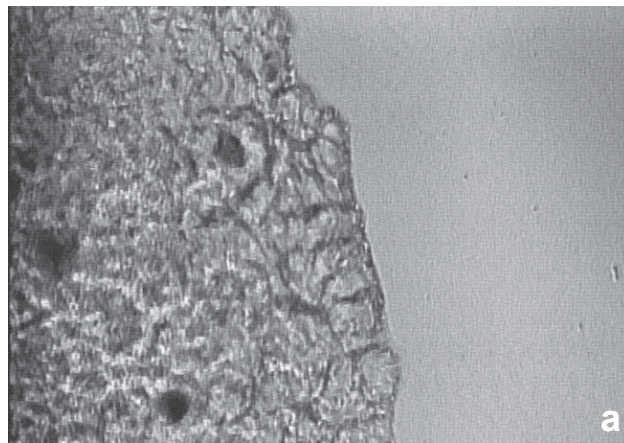


Рис. 4. Распределение меченых КСКМ, индуцированных в нейробласты, в области травмы через 7 суток после нейротрансплантации. Ув.100. Световая (а) и люминесцентная микроскопия (б).

миграции КСКМ в очаг криогенной травмы мозга, т.е. на 2-7 сутки после НТ.

Выводы

1. Трансплантация КСКМ, индуцированных в нейробласты, через неделю после криогенной травмы головного мозга способствует восстановлению морфологической структуры поврежденного мозга и двигательной активности крыс.

2. Меченые флюоресцентным красителем КСКМ, индуцированные в нейробласты, при локальном введении в зону криодеструкции мигрируют в область травмы и распределяются в ткани мозга.

3. Сроки регресса двигательных и поведенческих нарушений совпадают со сроками восстановления поврежденного участка коры головного мозга.

Литература

1. *Современные представления о патогенезе закрытой черепно-мозговой травмы* / Под ред. Е.Г. Педаченко.– Киев, 1996.– 282 с.
2. *Потапов А.А., Лихтерман Л.Б., Зельман В.Л. и др.* Доказательная нейротравматология.– М., 2003.– 517 с.

3. *Цымбалюк В.И., Щерба И.Н., Гордиенко О.В.* Влияние трансплантации эмбриональной нервной ткани на динамику отека головного мозга при экспериментальной черепно-мозговой травме // *Нейрофизиология.*– 1998.– Т. 30, №3.– С. 206-211.
4. *Цымбалюк В.И., Васильева И.Г., Чопик Н.Г. и др.* Влияние экстракта из эмбриональной нервной ткани на содержание дофамина и норадреналина в эксплантах среднего и продолговатого мозга новорожденных крыс // *Нейрофизиология.*– 1998.– №2.– С. 98-103.
5. *Щегельская Е.А., Микулинский Ю.Е., Ревущин А.В. и др.* Индуцированная дифференцировка клеток стромы костного мозга мыши в нервные клетки // *Цитология.*– 2002.– Т. 44, №7.– С. 637-641.
6. *Щегельская Е.А., Пятикоп В.А., Микулинский Ю.Е., Денисенко Т.В.* Индукция стромальных клеток костного мозга в нейробласты и их использование в лечении пациентов с болезнью Паркинсона // *Трансплантология.*– 2004.– Т. 7, №3.– С. 381-384.
7. *Mahmood A., Lu D., Li Y. et al.* Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells // *J. Neurosurg.*– 2001.– Vol.49, N5.– P. 1196-1203.
8. *Mahmood A., Lu D., Li Y. et al.* Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats // *J. Neurosurg.*– 2001.– Vol. 94, N4.– P. 683-685.
9. *Laska Z., Horvath E., Busija D.W.* Neural stem cells transplantation in cold lesion: a novel approach for the investigation of brain trauma and repair // *Brain Res. Protoc.*– 2003.– Vol.11, N3.– P. 145-154.