

Е.В. Половников ¹, В.В. Ступак ¹, А.Г. Самохин ¹, И.А. Васильев ¹, О.Б. Добрякова ¹,
Е.Я. Шевела ², Е.Р. Черных ²

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА В МОДЕЛИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У КРЫС

¹ Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии (Новосибирск)

² НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Настоящая работа посвящена оценке эффектов трансплантации МСК костного мозга (КМ-МСК) и жировой ткани (ЖТ-МСК) в модели очагового повреждения головного мозга у крыс. Исследования проводили на крысах линии Вистар (самцы и самки в равном соотношении; масса тела 250–270 г; n = 50). Травматическое повреждение головного мозга моделировали с использованием оригинального пружинного механизма, позволяющего дозировать силу удара. Неврологические нарушения оценивали с помощью шкалы по Чен, теста вертикальной сетки и водного лабиринта Морриса. При введении КМ-МСК и ЖТ-МСК в первые сутки отмечается статистически значимое снижение неврологического дефицита по сравнению с контрольной группой. ЖТ-МСК характеризовались несколько большей эффективностью по сравнению с КМ-МСК.

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

HUMAN BONE MARROW AND ADIPOSE TISSUE DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELL INFLUENCE ON NEUROLOGICAL DEFICIT RECOVERY IN A MODEL OF SEVERE TRAUMATIC BRAIN INJURY IN RATS

E.V. Polovnikov ¹, V.V. Stupak ¹, A.G. Samokhin ¹, I.A. Vasiliev ¹, O.B. Dobryakova ¹,
E.Ya. Shevela ², E.R. Chernykh ²

¹ Research Institute of Traumatology and Orthopedics (Новосибирск)

² Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

In the present study we characterized the effect of transplantation of bone marrow and adipose tissue MSCs in the model of brain injury in rats. This study was performed on Wistar rats (males and females in equal proportions, with body weight of 250–270 g; n = 50). Traumatic brain injury was produced by original spring-loaded mechanism to precise dosing of impact force. Neurological disorders were assessed by Chen scale, a vertical grid test and a Morris water maze. MSC injections on day 1 were accompanied by a significant reduction in neurological deficit in compare with the control group. Adipose tissue derived MSCs were found to have a more pronounced effectiveness than MSCs obtained from bone marrow.

Key words: controlled cortical injury model, neurological deficit, mesenchymal stem marrow, adipose cells

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из наиболее актуальных проблем неотложной нейрохирургии, что обусловлено сложностью диагностики и лечения, частотой инвалидизации пострадавших, а также преимущественным поражением наиболее активной части трудоспособного населения [1]. Поэтому поиск новых способов лечения травматических очаговых повреждений головного мозга, способствующих более быстрому восстановлению мозговых функций, остается весьма сложной и актуальной задачей.

Низкая эффективность лечения черепно-мозговой травмы (ЧМТ) в значительной степени обусловлена недостаточным пониманием патогенеза данной патологии и отсутствием адекватных экспериментальных моделей для оценки эффективности новых терапевтических стратегий [1]. Известно, что важная роль в патогенезе ЧМТ отводится системной воспалительной реакции, которая является причинным фактором развития и прогрессии вторичных повреждений. Поэтому

повышение эффективности лечения ЧМТ связывают с регуляцией воспалительной реакции, в частности, подавлением избыточного воспаления в раннем посттравматическом периоде. Кроме того, ключевыми факторами, обеспечивающими эффективную посттравматическую репарацию в нервной ткани, являются формирование новых сосудов и генерация нервных клеток. С этой точки зрения, трансплантация стволовых клеток, способных активировать ангио- и нейрогенез и модулировать иммунный ответ, представляется перспективным направлением в лечении ЧМТ [2, 4].

Действительно, многочисленные экспериментальные исследования в моделях повреждения ЦНС у животных показали эффективность трансплантируемых стволовых клеток в восстановлении неврологического дефицита [2, 6, 7, 8]. Среди различных типов клеток, значительный интерес в последнее время привлекают мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), обладающие выраженной иммуносупрессорной и

противовоспалительной активностью и способные продуцировать широкий набор факторов с проангиогенной и нейропротективной активностью [4, 5, 10]. Данный тип клеток легко генерируется из прилипающих ядросодержащих клеток костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ). Ранее было показано, что МСК, полученные из разных тканевых источников, могут различаться по своим биологическим свойствам [3]. Нами была разработана модель стандартизированного по силе удара повреждения головного мозга, характеризующейся развитием стойкого тяжелого неврологического дефицита. Целью настоящей работы стало сравнительное исследование влияния КМ-МСК и ЖТ-МСК человека на восстановление неврологического дефицита в разработанной модели ЧМТ у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на 50 животных (крысы линии Вистар с массой тела 250–270 г). Травматическое повреждение головного мозга моделировали с использованием оригинального

пружинного механизма, позволяющего дозировать силу удара. Все животные были разделены на 5 групп и наблюдались в течение 21 дня. Группу 1 составили 17 контрольных животных, которым наносили повреждение головного мозга и вводили физиологический раствор в хвостовую вену на 1-е и 7-е сутки в отсутствие клеточной терапии. Группу 2 ($n = 11$) составили животные, которым на 1-е сутки после повреждения вводили 1 млн КМ-МСК в хвостовую вену. Группу 3 ($n = 3$) составили животные, которым КМ-МСК (1 млн клеток на животное) вводили на 7-е сутки. Группу 4 ($n = 17$) и 5 ($n = 4$) составили животные, которым после нанесения повреждения вводили ЖТ-МСК (1 млн клеток на животное в/в, соответственно, на 1-е и 7-е сутки). Во всех группах животным на 1-е сутки проводили противоотечную терапию дексаметазоном в дозе 0,05 мг, в/м однократно. Зону повреждения интраоперационно орошали антибиотиком (Sol. Enghili 5% – 0,05 мг). Кормление животных до момента восстановления способности к самостоятельному приму пищи осуществлялось детским питанием

Таблица 1

Сравнительная характеристика экспериментальных групп (1)

	Введение физраствора (контроль) $n = 17$	ММСК 1-е сутки $n = 11$	ММСК 7-е сутки $n = 3$	ЖТ 1-е сутки $n = 17$	ЖТ 7-е сутки $n = 4$
Chen 1-е сутки	15,1 ± 0,26	14,1 ± 0,37	14,7 ± 0,33	14,8 ± 0,23	15,0 ± 0,71
Chen 7-е сутки	9,3 ± 0,39	7,9 ± 0,48 *	8,7 ± 0,33	7,5 ± 0,34 **	8,8 ± 1,03
Chen 14-е сутки	6,1 ± 0,34	4,3 ± 0,45 **	4,3 ± 0,33	3,3 ± 0,27**, #	3,8 ± 0,48
Chen 21-е сутки	3,2 ± 0,29	1,8 ± 0,33 **	2 ± 0	1,1 ± 0,19 **	1,5 ± 0,29

Примечание: *, ** – $p < 0,05$ и $< 0,01$; достоверность различий по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ достоверность различий между КМ-МСК и ЖТ-МСК; (Ри-критерий Вилкоксона-Манна – Уитни).

Таблица 2

Сравнительная характеристика экспериментальных групп (2)

	Введение физраствора (контроль) $n = 17$	ММСК 1-е сутки $n = 11$	ММСК 7-е сутки $n = 3$	ЖТ 1-е сутки $n = 17$	ЖТ 7-е сутки $n = 4$
Morris 1-е сутки	–	–	–	–	–
Morris 7-е сутки	53,3 ± 1,8	48 ± 2,2	48 ± 4,2	55 ± 2,1	53 ± 5,1
Morris 14-е сутки	35,5 ± 2,6	33 ± 1,8	35 ± 4,4	36 ± 1,6	37 ± 5,8
Morris 21-е сутки	24,8 ± 2,2	22 ± 1,3	22 ± 3,8	24 ± 1,0	26 ± 3,8

Примечание: *, ** – $p < 0,05$ и $< 0,01$; достоверность различий по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ достоверность различий между КМ-МСК и ЖТ-МСК; (Ри-критерий Вилкоксона – Манна – Уитни).

Таблица 3

Сравнительная характеристика экспериментальных групп (3)

	Введение физраствора (контроль) $n = 17$	ММСК 1-е сутки $n = 11$	ММСК 7-е сутки $n = 3$	ЖТ 1-е сутки $n = 17$	ЖТ 7-е сутки $n = 4$
Сетка 1-е сутки	–	–	–	–	–
Сетка 7-е сутки	169 ± 9,9	193 ± 8,4	201 ± 15	170 ± 11	185 ± 28
Сетка 14-е сутки	217 ± 8,1	236 ± 7,9	239 ± 20	225 ± 7	228 ± 20
Сетка 21-е сутки	251 ± 4,0	266 ± 5,7	257 ± 8	225 ± 5	248 ± 18

Примечание: *, ** – $p < 0,05$ и $< 0,01$; достоверность различий по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ достоверность различий между КМ-МСК и ЖТ-МСК; (Ри-критерий Вилкоксона – Манна – Уитни).

«Нутрикомп» или «Фрезубим» через пипетку. Животные, неспособные к приему пищи через пипетку, получали инъекции физиологического раствора внутримышечно в дозе 3–4 мл/сутки.

КМ- и ЖТ-МСК были получены от условно здоровых доноров при проведении стерильной пункции и процедуры липосакции. Для получения КМ-МСК моноклеарные клетки костного мозга инкубировали в пластиковых флаконах для культур тканей («Nunclon», Дания) в питательной среде MEM («БиолоТ», Санкт-Петербург), дополненной 100 мкг/мл гентамицина и 20 % FCS, при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Через 48 ч неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а прилипающую фракцию клеток культивировали до получения конфлюентного слоя. Отделение МСК от поверхности флакона при пассировании осуществляли с использованием 0,25% раствора трипсина/0,02% раствора ЭДТА. Жировую ткань подвергали ферментативной диссоциации с использованием 0,1% раствора коллагеназы I типа (Sigma-Aldrich, США) в течение 30–40 мин при 37 °C. После инактивации фермента средой αMEM/2 % FCS, клетки пропускали через фильтр (размер пор 100 мкм) для удаления клеточного дебриса. В завершении определяли количество и жизнеспособность ядродержащих клеток. Дальнейшее культивирование и пассирование проводили аналогично костномозговому клеткам.

Неврологический статус оценивали на 1, 7, 14 и 21-е сутки с помощью шкалы тяжести неврологических нарушений (ОТНН, Chen et al., 2001) [6, 7]. 13–18 баллов соответствовало выраженному, 7–12 – умеренному и 0–7 – легкому неврологическому дефициту. Помимо шкалы Chen et al., физические и когнитивные функции оценивались с помощью «вертикальной сетки» и водного лабиринта Морриса [1]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0, используя непараметрические критерии для зависимых ($P_{\text{кз}}$, критерий знаков) и независимых ($P_{\text{вм}}$, критерий Вилкоксона – Манна – Уитни) выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование очагового повреждения головного мозга сопровождалось развитием грубых неврологических нарушений в первые сутки послеоперационного периода. Сумма баллов по шкале ОТНН в контрольной группе составила $13,9 \pm 0,36$, что свидетельствовало о развитии выраженных повреждений головного мозга. К 7-м суткам у животных данной группы регистрировалось спонтанное снижение неврологических расстройств до $8,4 \pm 0,22$ и к 14-м суткам – до $5,3 \pm 3,2$ балла. Тем не менее, даже через 3 недели полного купирования неврологических расстройств не наблюдалось ($3,2 \pm 0,29$ балла).

Тяжесть неврологических нарушений на 1-е сутки послеоперационного периода во всех опытных группах животных была сходной с показателями в контрольной группе, однако восстановление

неврологического статуса в этих группах было достоверно более выраженным по сравнению с животными, которым не проводилась клеточная терапия. Это проявлялось в виде достоверных различий в группах с введением КМ-МСК и ЖТ-МСК на 1-е сутки и тенденции в группах животных, которым МСК вводили на 7-е сутки. Так, в группе 2 неврологический дефицит к 7-м суткам уменьшался до $7,9 \pm 0,48$ (против $8,4 \pm 0,22$ в контрольной группе), а к 14-м суткам – до $4,3 \pm 0,45$ (против $5,3 \pm 3,2$ в контроле). Причем к исходу 3-й недели степень неврологических нарушений уменьшалась до $1,8 \pm 0,33$ (в контрольной группе – $3,2 \pm 0,29$). Животные, которым вводили клетки, были активнее и уже через сутки могли самостоятельно принимать пищу. В контрольной группе животные начинали самостоятельно питаться с 3–4-х суток.

При сравнении двух типов МСК отмечается лучшая динамика восстановления неврологического статуса при введении ЖТ-МСК в первые сутки после травмы. Так, эффективность неврологического восстановления на 14-е сутки у животных 4-й группы была достоверно выше, чем у животных 2-й группы.

В то же время трансплантация МСК, независимо от их типа и сроков введения клеток, не сопровождалась более эффективным восстановлением статической активности и когнитивных функций.

В литературе накоплено достаточное количество убедительных фактов, что введение МСК в модели ЧМТ у крыс или мышей приводит к регрессу неврологических расстройств. Полученные нами данные продемонстрировали способность КМ-МСК и ЖТ-МСК человека позитивно влиять на функциональное восстановление у крыс с грубым неврологическим дефицитом в модели очагового повреждения головного мозга. Сравнение эффектов КМ-МСК и ЖТ-МСК показали, что введение ЖТ-МСК в 1-е сутки после травмы оказывает большее влияние на восстановление неврологического дефицита. Анализ эффективности клеточной терапии в зависимости от сроков введения КМ-МСК и ЖТ-МСК не выявил существенных различий в уровне двигательной активности. Тем не менее, животные с введением клеток на 1-е сутки отличались более быстрым восстановлением способности к самостоятельному приему пищи.

Позитивное влияние МСК при их внутримышечном введении позволяет предполагать, что в указанные сроки МСК способны эффективно мигрировать в зону повреждения, и для реализации их эффекта не требуется локальной имплантации клеток. С другой стороны, эффективность внутримышечного введения МСК свидетельствует в пользу гипотезы, что эффект МСК может опосредоваться через паракринную регуляцию воспалительного и иммунного ответа при взаимодействии МСК с клетками иммунной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белошицкий В.В. Современные принципы моделирования черепно-мозговой травмы в

эксперименте // Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. — 2005. — Т. 1, № 1. — С. 18–20.

2. Григорян А.С. Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на развитие посттравматических процессов в головном мозге крыс: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — 21 с.

3. Останин А.А., Петровский Я.Л., Шевела Е.Я., Черных Е.Р. Мультиплексный анализ цитокинов, хемокинов, ростовых факторов, MMP-9 и TIMP-1, продуцируемых мезенхимальными стромальными клетками костного мозга, жировой ткани и плаценты человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2011. — № 1. — С. 29–38.

4. Южаков В.В., Коноплиников А.Г., Цыб А.Ф., Рошаль Л.М. и др. Действие аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на репаративные процессы в нервной ткани при диффузной травме головного мозга крыс // Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении: тез. докл. Всерос. междунар. науч. конф., 30–31 мая 2007 г. — М., 2007. — С. 18.

5. Borlongan C.V, Hadman M., Sanberg C.D., Sanberg P.R. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required

for neuroprotection in stroke // Stroke. — 2004. — Vol. 35. — P. 2385–2389.

6. Chen J., Li Y., Wang L, Zhang Z. et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats // Stroke. — 2001. — Vol. 32. — P. 1005–1011.

7. Chen J., Sanberg P.R., Li Y., Wang L. et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats // Stroke. — 2001. — Vol. 32. — P. 2682–2688.

8. Corti S., Locatelli F., Strazzer S., Guglieri M. et al. Neuronal Generation from Somatic Stem Cells: Current Knowledge and Perspectives on the Treatment of Acquired and Degenerative Central Nervous System Disorders // Current Gene Therapy. — 2003. — Vol. 3. — P. 247–272.

9. Nakada A., Fukuda S, Ichihara S., Sato T. et al. Regeneration of Central Nervous Tissue Using a Collagen Scaffold and Adipose-Derived Stromal Cells // Cells tissues organs. — 2009. — Vol. 190, N 6. — P. 256–258.

10. Parr A.M., Tator C.H., Keating A. Bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury // Bone marrow transplantation. — 2007. — Vol. 40. — P. 609–619.

Сведения об авторах

Половников Евгений Владимирович — врач-нейрохирург, аспирант ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России (630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17; тел. раб.: 224-47-13; e-mail: IVasilev@niito.ru)

Ступак Вячеслав Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением, нейрохирург, врач высшей категории ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России (тел. раб.: 224-47-13; e-mail: IVasilev@niito.ru)

Самохин Александр Геннадьевич — старший научный сотрудник, руководитель функциональной группы экспериментальной хирургии ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России (тел. раб.: 224-45-58; email: asamohin@niito.ru)

Васильев Игорь Анатольевич — врач-нейрохирург, аспирант ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России (тел. раб.: 224-47-13, сот. тел.: 8-960-792-15-78; e-mail: IVasilev@niito.ru)

Добрякова Ольга Борисовна — пластический хирург, доктор медицинских наук, директор Сибирского института красоты (тел. 228-21-01; e-mail: ct_lab@mail.ru)

Шевела Екатерина Яковлевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ Клинической иммунологии СО РАМН (тел. раб.: 236-03-29; e-mail: shevelak@mail.ru)

Черных Елена Рэмовна — доктор медицинских наук, профессор, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии, заместитель директора НИИКИ СО РАМН по науке НИИ Клинической иммунологии СО РАМН (тел. раб.: 236-03-29; e-mail: ct_lab@mail.ru)