

Е.Я. Шевела <sup>1</sup>, И.А. Васильев <sup>2</sup>, В.В. Ступак <sup>2</sup>, Е.В. Половников <sup>2</sup>, А.Г. Самохин <sup>2</sup>,  
Г.И. Окладников <sup>2</sup>, Д.В. Морозов <sup>3</sup>, В.А. Головнев <sup>4</sup>, Е.Р. Черных <sup>1</sup>

# МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ В КОРРЕКЦИИ НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В МОДЕЛИ ОЧАГОВЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА, ИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЕМ ВЕНОЗНОГО КРОВОТОКА

<sup>1</sup> НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

<sup>2</sup> НИИТО (Новосибирск)

<sup>3</sup> Городская клиническая больница № 1 (Новосибирск)

<sup>4</sup> Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

В работе представлены результаты исследования влияния мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга на выраженность неврологического дефицита и морфофункциональное состояние головного мозга в модели очаговых повреждений, индуцированных нарушением венозного кровотока. Повреждение головного мозга индуцировалось у крыс породы Вистар путем коагуляции верхнего сагиттального синуса с последующей коагуляцией корковых венозных сосудов в левой теменно-височной области. МСК вводили внутривенно на 1-е и 7-е сутки и оценивали динамику неврологических нарушений и морфологических изменений на 7-е, 14-е и 21-е сутки в сравнении с контрольной группой (МСК-). Введение МСК сопровождалось значительным уменьшением неврологического дефицита, наиболее выраженным при введении МСК на 1-е сутки. Морфологические исследования зоны повреждения показали, что введение МСК приводило к уменьшению площади зоны некроза, стимуляции ангиогенеза и улучшению структурно-клеточных показателей по сравнению с группой сравнения. В итоге к 21-му дню исследования зона некроза у животных с трансплантацией МСК замещалась глиомезодермальным рубцом, в то время как у животных контрольной группы формирование рубца было менее выраженным и у части животных сочеталось с развитием кистозной трансформации. Трансплантация МСК оказывает положительное влияние на неврологическое и морфо-функциональное восстановление головного мозга у экспериментальных животных в модели нарушения церебрального венозного кровообращения.

**Ключевые слова:** МСК, нарушение венозного кровотока, морфо-функциональные изменения, неврологический дефицит

## MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN CORRECTION OF NEUROLOGICAL DEFICIT AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE RAT MODEL OF FOCAL CEREBRAL LESIONS INDUCED BY VENOUS BLOOD FLOW DISORDER

Е.Я. Shevela <sup>1</sup>, I.A. Vasiljev <sup>2</sup>, V.V. Stupak <sup>2</sup>, E.V. Polovnikov <sup>2</sup>, A.G. Samokhin <sup>2</sup>,  
G.I. Okladnikov <sup>2</sup>, D.V. Morozov <sup>3</sup>, V.A. Golovnyov <sup>4</sup>, E.P. Chernukh <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Clinical Immunology, Novosibirsk

<sup>2</sup> Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics, Novosibirsk

<sup>3</sup> City Clinical Hospital N 1, Novosibirsk

<sup>4</sup> Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

The paper presents the results of assessing the effect of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) on the severity of neurological deficit and the brain morphology and function in a model of focal lesions induced by a venous blood flow disorder. Cerebral lesions were induced in Wistar rats by coagulation of the superior sagittal sinus followed by coagulation of cortical veins in the left parietotemporal region. MSCs were injected intravenously on days 1 and 7, and the dynamics of neurological disorders and morphological changes were assessed at 7, 14 and 21 days in comparison to controls. MSCs infusion was accompanied by a significant reduction in neurological deficit, the most pronounced with MSCs injections on day 1. Morphological investigation of the damaged region have shown that the administration of MSCs led to a decrease in the area of necrosis, stimulation of angiogenesis, and improvement of structural and cellular parameters as compared to the control group. As a result, by day 21 the area of necrosis in animals with MSC transplantation was replaced by glial-mesodermal scar, whereas the scar formation in control animals was less pronounced, and in some cases was accompanied by cystic transformation. Transplantation of MSCs has a positive effect on neurological and morphofunctional recovery of the brain in experimental animal models of cerebral venous circulation disorders.

**Key words:** MSCs, venous blood flow disorder, morphologic and functional changes, neurological deficit

Долгое время считалось, что центральная нервная система (ЦНС) не способна к репарации. Однако экспериментальные исследования последних лет показали, что процессы репарации могут наблюдаться в поврежденной ткани ЦНС, и во многом обусловлены образованием новых сосудов и генерацией новых нервных клеток. Кроме

того, было показано, что трансплантация стволовых клеток может существенно активировать репаративные процессы. Среди различных типов клеток наибольшее внимание в последнее время привлекают мезенхимальные стромальные клетки (МСК), способные стимулировать ангиогенез в ишемизированном участке, активировать тканевые

стволовые клетки, оказывать нейротрофическую, нейрорегуляторную поддержку [1, 4]. Эффекты МСК в наибольшей степени изучены в моделях повреждения головного мозга, индуцированного нарушением артериального кровотока. Настоящая работа была посвящена исследованию влияния МСК на неврологическое и морфо-функциональное восстановление повреждений головного мозга, индуцированных нарушением венозного оттока.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на крысах линии Вистар со средней массой 220 г. Содержание животных в пред- и послеоперационном периоде осуществлялось в условиях вивария ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», согласно приказу Минздрава РФ № 755 от 12 августа 1977 г. Все исследования выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Формирование очагового повреждения достигалось путем последовательного пересечения верхнего сагиттального синуса в средней его трети с последующей прецизионной коагуляцией сосудов в левой теменно-височной области (на площади до 0,8 – 1,0 см) (заявка на изобретение 2009143265, приоритет от 23.11.2009 г.) [2].

При выполнении операций использовали микрохирургический инструментарий и операционную оптику с увеличением 5,0 (бинокулярная лупа, Carl Zeiss, Germany). Операцию проводили при анестезиологической поддержке с использованием раствора кетамина (125 мг/кг) интраперитонеально. Первоначально выполняли линейный разрез мягких тканей в левой теменно-височной области с последующим скелетированием костей свода черепа. Следующим этапом проводили резекционную трепанацию в левой теменно-височной области (с заходом за среднюю линию) с обнажением верхнего сагиттального синуса в средней его трети.

В исследование были отобраны 20 животных с грубым, стойким неврологическим дефицитом, которые были разделены на 3 группы. Первая (контрольная) группа включала 8 животных, которым была выполнено хирургическое вмешательство без последующего введения клеток. Группы 2 и 3 включали по 6 животных, которым вводили МСК ( $2 \times 10^6$  клеток/животное) после проведенного хирургического пособия через хвостовую вену на 1-е (группа 2) и 7-е (группа 3) сутки, соответственно. Все животные в течение первой недели послеоперационного периода получали антибактериальную терапию в виде *Sol. Enroxili* 5% — 0,05 мг 1 раз в сутки внутримышечно. Кормление животных осуществлялось сбалансированной смесью «Нутрикомп» через пипетку и/или парентерально.

Выраженность неврологического дефицита оценивали с помощью шкалы оценки тяжести неврологических нарушений (ОТНН) (Chen et al., 2001) в нашей модификации [3]. Оценку невроло-

гического дефицита в группах проводили на 1, 7, 14 и 21-е сутки.

МСК получали из суспензии клеток костного мозга, аспирированных из бедренных костей животных. Клетки вымывали из канала костей, после чего получали клеточную суспензию с помощью ресуспендирования через иглы диаметром 24 G. Для получения МСК КМ мозга инкубировали в пластиковых флаконах (Nunc) в среде DMEM (Sigma), содержащей 15 % эмбриональной телячьей сыворотки (ICN) при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Через 24 часа неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а прилипающую фракцию клеток промывали средой Хэнкса и инкубировали в культуральной среде до получения конфлюентного слоя. Для пересева культуры МСК использовали раствор трипсина и ЭДТА. После 1 – 2 пассажей МСК использовали для введения животным.

Морфологические исследования зоны повреждения головного мозга проводили с помощью фиксации материала в 10% растворе нейтрального формалина в течение двух суток. Затем исследуемые образцы обезживали в серии спиртов с возрастающей концентрацией и заключали в смесь парафина и воска. С помощью микротомы готовили срезы толщиной 5 – 7 мкм. Срезы головного мозга изготавливали во фронтальной и сагиттальных плоскостях. Для изучения морфоцитотектоники срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином, по Ван-Гизону и заключали их в канадский бальзам. Обозначение и размерность стереологических параметров, использованных в работе, приведены согласно рекомендациям Международного стереологического общества [5]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Неврологические расстройства в модели нарушения венозного оттока проявлялись развитием тетрапареза в конечностях, значительно более выраженным на контралатеральной стороне с повышением тонуса мышц в паретических конечностях и хвосте. Эта симптоматика сочеталась с развитием гипестезии и грубым нарушением координации движений. Наряду с очаговой, у животных отмечалась выраженная общемозговая симптоматика: крысы характеризовались выраженным угнетением двигательной активности, сонливостью, были не способны самостоятельно принимать пищу. Суммарный балл неврологических нарушений по шкале ОТНН в контрольной группе на 1-е сутки составлял  $22,2 \pm 0,13$  балла, что свидетельствовало о наличии неврологического дефицита тяжелой степени. Общее тяжелое состояние животных данной группы сохранялось на протяжении всей первой недели послеоперационного периода, что требовало проведения принудительного кормления. Дальнейшее наблюдение за животными и оценка неврологической симптоматики не выявило значимой положительной динамики. Выраженный неврологический дефицит, регистрируемый через

неделю с момента проведения операции ( $21,0 \pm 0,1$  балла), сохранялся на уровне  $19,0 \pm 0,1$  балла на 14-е сутки и  $15,7 \pm 0,29$  балла на 21-е сутки.

В группах с трансплантацией МСК выраженность неврологического дефицита на 1-е сутки послеоперационного периода не отличалась от показателей контрольной группы. Введение МСК на 1-е сутки сопровождалось регрессом неврологической симптоматики к исходу первой недели до  $18,3 \pm 0,48$  балла, а к 21-му дню — до  $5,5 \pm 1,08$  балла. В группе с введением МСК на 7-е сутки заметное снижение неврологического дефицита наблюдалось на 14-е сутки ( $13,3 \pm 1,19$  балла) и 21-й день ( $9,07 \pm 0,87$  балла). Тем не менее, уменьшение неврологического дефицита к концу третьей недели послеоперационного периода в группе 3 было менее выраженным, чем в группе 2 (рис. 1). Отметим, что у животных группы 2 достаточно быстро (в течение недели) восстанавливалась способность к самостоятельному приему пищи.

Морфологические исследования показали, что в зоне повреждения головного мозга в используемой модели выявлялись признаки геморрагических нарушений, в частности, кровоизлияния, венозное полнокровие и стазы, степень выраженности которых позволила дифференцировать белые (73 %), красные (9 %) и смешанные (18 %) формы инфаркта, среди которых доминировали белые инфаркты. В периоде формирования инфаркта (1-е сутки послеоперационного периода) мозговая ткань характеризовалась дряблой консистенцией в очаге некроза; вещество мозга было набухшим, бледным, границы инфаркта визуализировались нечетко и плохо контурировались. При микроскопическом исследовании выявлялись признаки некроза с массивным перифокальным отеком, отграничивающим зону повреждения от ткани

мозга, в которой выявлялись изменения нейронов: острое набухание, клетки-тени, клетки с ишемическими изменениями. Данная зона неполного некроза, характеризовалась отеком, разрыхлением, плохо прокрашивалась гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону. Характерным проявлением морфологических изменений в используемой модели было наличие расширенных мелких вен и венул с явлениями стаза. При этом вокруг некоторых венозных сосудов выявлялись диапедезные кровоизлияния, которые в ряде случаев были обширными и сливались (рис. 2а). Кровоизлияния нередко были связаны не только с диапедезом эритроцитов, но и с переполнением, перерастяжением вен и разрывом их стенок.

К седьмым и четырнадцатым суткам выраженность морфологических изменений нарастает. Некротизированная ткань подвергается разжижению и резорбции с началом организации инфаркта. Отек, выявляемый в острый период, уменьшается, что способствует большей активности реактивных и репаративных процессов. В некротизированную ткань проникает плазма из сосудов, в которых кровоток еще сохранился, происходит диапедез лейкоцитов и эритроцитов. Инфаркт при этом приобретает желтоватый или красноватый оттенок. В пограничной с очагом зоне визуализируются макрофаги, волокнистые астроциты и новообразованные сосуды, отмечается вращение глиальных, аргирофильных волокон в зону очага (смешанный глиомезодермальный тип организации).

К двадцать первому дню репаративные процессы в области инфаркта заканчивались с исходом в глиомезодермальный рубец и/или формирование кисты, стенки которой состояли из соединительнотканых и глиальных волокон.

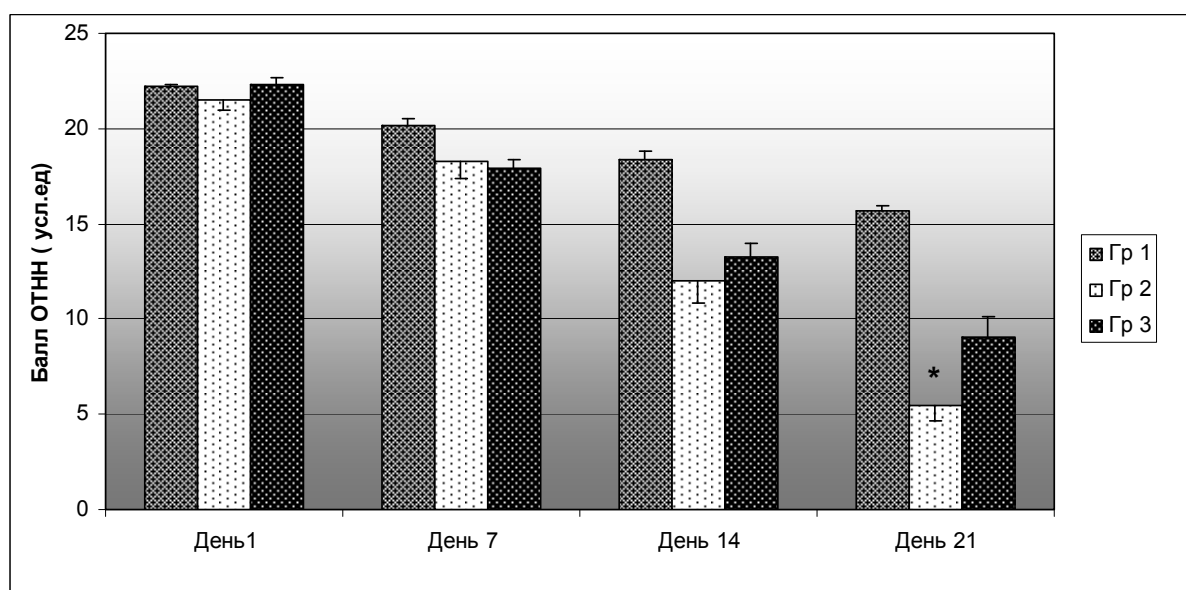
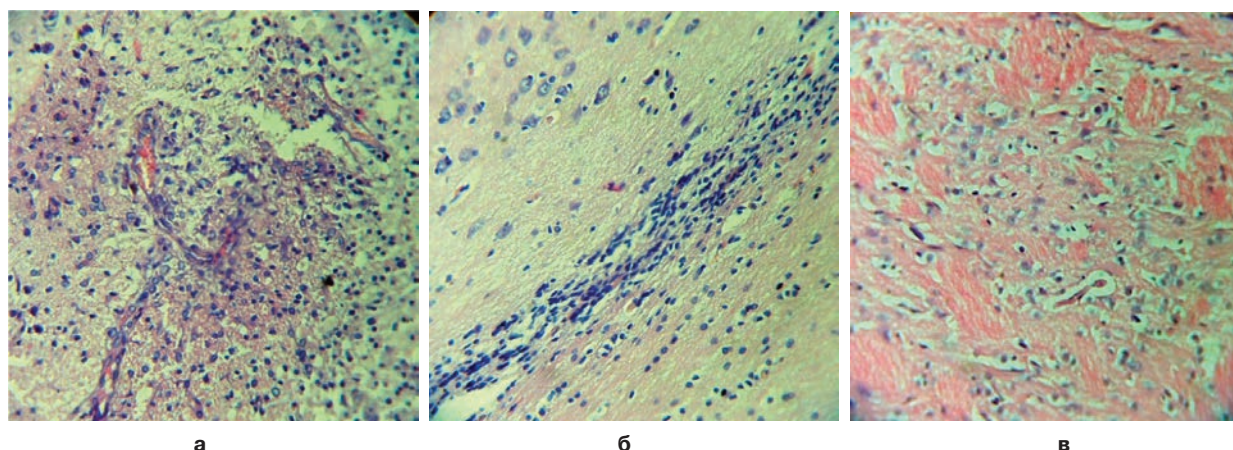


Рис. 1. Влияние внутривенного введения МСК на выраженность неврологических нарушений в модели очагового повреждения головного мозга, вызванного нарушением венозного оттока. \* —  $p < 0,05$  — достоверность различий между группами 2 и 3.



**Рис. 2.** Морфологические изменения головного мозга на 1-е и 21-е сутки. **а** – 1-е сутки после операции, **б** – 21-е сутки без введения МСК, **в** – 21-е сутки с внутривенным введением МСК в первый день. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$ .

Введение МСК сопровождалось ускорением репаративных процессов, что было особенно заметным у животных с внутривенным введением МСК в первые сутки (вторая группа). Это проявлялось более ранним формированием глиомезодермального рубца (рис. 2в) по сравнению с животными контрольной группы (рис. 2б).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно данным литературы, купирование неврологического дефицита в моделях церебральной артериальной ишемии на фоне введения МСК продемонстрировано многими авторами [1, 5, 7]. В настоящем исследовании впервые изучено влияние МСК в модели повреждения головного мозга, индуцированного нарушением венозного оттока. Полученные результаты продемонстрировали, что внутривенное введение МСК послеоперационного периода приводило к достоверному уменьшению выраженности неврологического дефицита по сравнению с контрольной группой. Так, если в контрольной группе неврологический дефицит снижался в среднем на 14–17 %, то в группе с трансплантацией МСК – на 54–75 %. В итоге к 21-му дню неврологические изменения у животных опытной группы соответствовало статусу легких неврологических расстройств. Анализ эффективности клеточной терапии в зависимости от сроков введения МСК показал, что эффект клеток, вводимых на первые сутки послеоперационного периода, был статистически значимо выше, чем при введении клеток на 7-е сутки. При этом анализ морфологических изменений позволил предположить, что введение МСК сопровождается активацией репаративных процессов, в частности, более быстрым формированием глиомезодермального рубца и профилактирует развитие кистозной дегенерации. Можно также полагать, что эффект МСК обусловлен способностью клеток стимулировать ангиогенез и оказывать выраженный противоотечный и противовоспалительный эффект [6].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Соколова И.Б., Зинькова Н.Н., Билибина А.А., Кругляков П.В. и др. Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 11, № 4. – С. 54–62.
2. Ступак В.В., Васильев И.А., Самохин А.Г. Способ моделирования ишемического повреждения головного мозга: пат. 2432619 Рос. Федерация: G09B 23/28, A61N 1/32/ заявитель и патентообладатель ФГУ Новосибирский науч.-ислед. ин-т травматологии и ортопедии Минздравсоцразвития России. – № 2009143265/14; заявл. 23.11.2009; опубл. 27.10.2011, Бюл. 30 – 4 с.
3. Черных Е.Р., Ступак В.В., Васильев И.А., Шевела Е.Я. и др. Мезенхимальные клетки в коррекции неврологического дефицита, индуцированного нарушением венозного кровотока головного мозга у крыс // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 2. – С. 77–83.
4. 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.
5. Li Y., Chen J., Wang L., Lu M. et al. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells // Neurology. – 2001. – Vol. 56. – P. 1666–1672.
6. Newman R.E., Yoo D., LeRoux M.A., Danilovitch-Miagkova D. Treatment of Inflammatory Diseases with Mesenchymal Stem Cells // Inflammation & Allergy – Drug Targets. – 2009. – Vol. 8. – P. 110–123.
7. 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.
8. Weibel E.R. Stereological methods. – London: Academic Press, 1979. – 415 p.

**Сведения об авторах**

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

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

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

**Половников Евгений Владимирович** – врач-нейрохирург, аспирант ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России (г. Новосибирск; 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 (г. Новосибирск; тел. раб.: 224-45-58; e-mail: asamohin@niito.ru)

**Окладников Геннадий Иванович** – нейрохирург, отделение нейрохирургии ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России, доктор медицинских наук, профессор (г. Новосибирск; тел. раб.: 224-47-13; e-mail: IVasilev@niito.ru)

**Морозов Дмитрий Владимирович** – врач морфолог МБУЗ Городская клиническая больница № 1, кандидат медицинских наук (e-mail: mdvil07@mail.ru)

**Головнев Владимир Андреевич** – врач-патоморфолог, доктор медицинских наук, профессор НГМУ (e-mail: IVasilev@niito.ru)

**Черных Елена Рэмовна** – заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии НИИ Клинической иммунологии СО РАМН, зам. директора НИИКИ СО РАМН по науке, член-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор (г. Новосибирск; тел. раб. 236-03-29; e-mail: ct\_lab@mail.ru)