

УДК 616.853-092.9-089.843:611.013.8

Сравнительная оценка результатов трансплантации криоконсервированных эмбриональных нервных клеток и клеток стромы костного мозга, индуцированных в нейробласты, в область экспериментального эпилептического очага

Цымбалюк В.И., Кочин О.В.

Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев, Украина

Проведена сравнительная оценка результатов хирургического лечения эпилепсии в эксперименте с применением криоконсервированных эмбриональных нервных клеток (КЭНК) и клеток стромы костного мозга (КСКМ), индуцированных в нейробласты. Установлено, что трансплантированные в область эпилептического очага КЭНК и КСКМ не только сохраняют жизнеспособность, но и способны к дифференцировке в нейроны. В группах животных, которым осуществлена трансплантация КЭНК и КСКМ, отмечена сходная позитивная динамика содержания биогенных аминов в стволе головного мозга.

Ключевые слова: эпилепсия, трансплантация, клетки стромы костного мозга, эмбриональные нервные клетки, биогенные амины, эксперимент.

Введение. В последние годы все больший интерес привлекает возможность применения стволовых нервных клеток в лечении различных заболеваний нервной системы, в том числе эпилепсии.

Морфологической основой эпилепсии, независимо от ее природы, являются дегенеративно-дистрофические изменения в центральной нервной системе. Еще в XIX в. Sommer описывал в качестве специфического морфологического признака эпилепсии запустение поля CA1 гиппокампа (т.н. зоммеровский склероз). Впоследствии сформировалось представление о специфических признаках эпилепсии на микроскопическом и ультрамикроскопическом уровне, включающих снижение плотности нейронов во всех полях гиппокампа, а также в хилусе и гранулярном слое зубчатой фасции, глиальный склероз гиппокампа, дизонтогенез коры больших полушарий (наличие эмбриональных клеток Кахаля в I слое, гетеротопия пирамид в белое вещество), краевой глиоз Шаслена (разрастание глии в I слое коры) [1, 15]. Указанные изменения являются причиной дефицита коллатерального торможения, обуславливающего избыточную возбудительную активность поврежденных зон головного мозга, а также избыточное накопление внеклеточного калия, стимулирующего пролиферацию глии. Усиление глиоза в зоне эпилептического очага еще более нарушает коллатеральное торможение, образуется порочный круг [4, 17]. Вероятно, введение мультипотентных стволовых нервных клеток, способных к дифференцировке в полноценные клеточные элементы в поврежденной области, может компенсировать дефицит коллатерального процесса и, в конечном итоге,

способствовать регрессу эпилептического процесса. Источниками стволовых нервных клеток, которые можно использовать в терапевтических целях, могут быть нервная система эмбриона [18], а также КСКМ [20].

Применение эмбриональных нервных клеток в клинических целях значительно упрощает их криоконсервирование.

В центральной нервной системе взрослых млекопитающих и человека содержится достаточно большая популяция стволовых нервных клеток, способных к нейрогенезу. Эта популяция локализована преимущественно в обонятельной луковице, субвентрикулярной зоне передних рогов боковых желудочков и субгранулярной зоне зубчатой извилины [8, 14]. По данным экспериментальных исследований, эпилептический процесс в головном мозге значительно активизирует нейрорегенераторные процессы в субвентрикулярной зоне. Однако генерированные под влиянием эпилептического процесса нейроны во время миграции в область хилуса сохраняют связи с нейронами поля CA3 гиппокампа, что обуславливает возникновение замкнутых путей циркуляции возбуждения и усугубляет имеющиеся нарушения электрической активности. В связи с этим такой нейрогенез рассматривают как патологический [11, 19]. Вероятно, введенные извне мультипотентные стволовые нервные клетки, которые первоначально лишены синаптических контактов, станут источником физиологического нейрогенеза и примут участие в восстановлении нормальной клеточной структуры в эпилептическом очаге.

Целью исследования стала сравнительная оценка морфологических изменений в головном мозгу крыс, у которых моделировали эпилеп-

сию, а также сравнение динамики содержания биогенных аминов в стволе головного мозга животных после трансплантации КСКМ, индуцированных в нейробласты, и КЭНК в область экспериментального эпилептического очага.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проведен на 150 самцах крыс линии Вистар в возрасте 6 мес массой тела 200–250 г. Отбирали животных с исходно низкой аудиогенной судорожной готовностью. Порог судорожной готовности определяли по методике, предусматривавшей звуковое раздражение громкостью 100 дБ, длительностью 2 мин, с 3–4-кратным прозваниванием [7]. В эксперименте использовали животных, у которых после 4-кратного звукового воздействия судорожный припадок не возникал.

Эпилепсию у животных воспроизводили по методике, описанной И.Б. Михайловым и соавторами [6], путем стереотаксического введения раствора натриевой соли бензилпенициллина в дозе 100 ЕД объемом 1 мкл в правый ростральный гиппокамп [6]. По данным некоторых исследователей, локальное введение пенициллина в головной мозг не только вызывает судороги, но и способствует формированию в области введения морфологических и электрофизиологических сдвигов, характерных для эпилепсии [13]. Координаты гиппокампа определяли по атласу Fífkova и Marsala (привед. по: Я. Буреш и соавт. [3]) на 3 мм каудальнее и на 2 мм латеральнее брегмы на глубине 3,4 мм. Операцию выполняли в условиях внутривентрикулярного наркоза тиопентал-натрием.

В качестве материала для трансплантации использовали суспензию КЭНК. Источником эмбриональных нервных клеток являлась нервная система эмбрионов крыс 9–11 сут гестации. Эмбрионов крыс получали путем вскрытия брюшной полости анестезированной беременной самки. Суспензию КЭНК получали путем мягкой дезагрегации фрагментов цельного эмбрионального головного мозга в 10-кратном объеме раствора Хэнкса с помощью специального вибрационного устройства. Полученную клеточную суспензию фильтровали, добавляли криопротектор диметилсульфоксид до конечной концентрации 10% и разливали в пробирки для криоконсервирования фирмы Costar (Канада). Замораживание производили по 3-этапной программе охлаждения: 1 этап — со скоростью 1°С/мин до –40°С, 2 этап — 10°С/мин до –80°С, 3 этап — погружение в жидкий азот. Размораживание суспензии КЭНК осуществляли на водяной бане при температуре 40°С. Концентрация клеточной суспензии составляла 16,7–20,5×10⁶ клеток в 1 мл, жизнеспособность — не менее 60%.

КСКМ крыс извлекали путем чрескожной пункции диафиза бедренной кости, промывали раствором Хэнкса. Полученную ткань ресуспендировали и отмывали в растворе Хэнкса дважды по 5 мин путем центрифугирования. Отмытые клетки ресуспендировали в культуральной среде MEM/F12 (1/1) с 10% фетальной бычьей сывороткой и рассеивали по 5 млн. клеток на культуральную посуду. Через 24 ч незакрепленные клетки удаляли, добавляли свежую среду и продолжали культивирование в течение 1 нед для получения первичной КСКМ. Для дифференцирования полученных клеток в нейробласты использовали среду DMEM/F12 с 2% 10⁻⁶ ретиноевой кислотой. Содержание нейробластов в вводимой суспензии составляло 10⁶ клеток в 1 мл.

Трансплантацию суспензий КЭНК и КСКМ в объеме 10 мкл осуществляли стереотаксическим методом на 18-е сутки после операции воспроизведения эпилепсии [10] в зону введения пенициллина (правый ростральный гиппокамп) в объеме 10 мкл.

Микроморфологические изменения в зоне трансплантации изучали во фронтальных срезах головного мозга крыс, окрашенных по Нисслю, на 10, 30-е и 60-е сутки после трансплантации. Уровень адреналина, норадреналина, дофамина и серотонина в цельном головном мозгу и стволе головного мозга крыс определяли на 10, 30-е и 60-е сутки после трансплантации методом колонковой спектрографии [12].

Для статистической оценки полученных данных использован t-критерий Стьюдента [5].

Результаты и их обсуждение. Морфологическое исследование зоны трансплантации проведено в двух группах животных. Животным 1-й группы в область правого рострального гиппокампа трансплантировали КЭНК, животным 2-й группы — в ту же область трансплантировали КСКМ. При сравнительном изучении микропрепаратов головного мозга на 10-е сутки после трансплантации у животных как 1-й, так и 2-й группы в зоне трансплантации определяли скопление мелких округлых клеток с крупным интенсивно окрашенным ядром. Часть клеток слабо окрашена, что можно рассматривать как признак их дистрофии. Причем, количество дистрофически-измененных клеток после трансплантации КЭНК значительно больше (рис. 1, 2 цветной вкладки).

На 30-е сутки после трансплантации у животных обеих групп отмечено уменьшение количества описанных клеточных элементов в зоне трансплантации за счет практически полного исчезновения дистрофически-измененных клеток. По периферии зоны трансплантации обнаружены единичные клетки с призна-

ками формирования аксонов (рис. 3, 4 цветной вкладки).

На 60-е сутки после операции плотность скопления клеток в зоне трансплантации еще более уменьшилась у животных обеих групп. Отмечена миграция клеток в направлении зубчатой извилины и поля СА3 гиппокампа. Количество клеток грушевидной формы по периферии зоны трансплантации несколько увеличилось, обнаружены единичные клетки полигональной формы с формирующимися дендритными отростками и признаками вакуолизации цитоплазмы. Эти изменения отмечены у животных как 1-й, так и 2-й групп. Существенные различия в динамике морфологических изменений в зоне трансплантации после введения КЭНК и КСКМ не отмечены. Однако количество клеток с признаками нейрональной дифференцировки было несколько больше после трансплантации КСКМ (рис. 5, 6 цветной вкладки).

Содержание биогенных аминов в стволе головного мозга определяли у животных трех групп, у которых была воспроизведена эпилепсия. Животным I группы в область правого рострального гиппокампа трансплантировали КЭНК, животным II группы в ту же область трансплантировали КСКМ, III группа (контрольная) включала животных, которым не производили никакие дополнительные вмешательства.

Результаты изучения содержания биогенных аминов в стволе головного мозга у животных I и II групп после трансплантации свидетельствовали о наличии существенных изменений. Так, уровень серотонина у крыс I и II групп уже на 10-е сутки после трансплантации достоверно снизился по сравнению с таковым в контроле ($P < 0,05$) и, несмотря на тенденцию к некоторому повышению, не достиг нормы и на 60-е сутки. Содержание серотонина у животных I группы было достоверно меньше, чем во II группе ($P < 0,05$).

При изучении показателей дофамина отмечена тенденция к увеличению его содержания

в стволе головного мозга в группах I и II по сравнению с таковым в группе III. Достоверных различий показателя между группами в разные периоды наблюдения не было.

В группе животных, которым произведена трансплантация КЭНК, выявляли достоверное снижение уровня норадреналина в стволе головного мозга ($P < 0,05$) по сравнению с таковым в группе III. У животных, которым осуществлена трансплантация КСКМ, достоверного снижения уровня этого амина не наблюдали. Содержание норадреналина было достоверно меньше в группе I, чем в группе II, только на 60-е сутки после операции ($P < 0,05$). На 10-е и 30-е сутки достоверные различия его концентрации в стволе головного мозга животных групп I и II не установлены.

При исследовании уровня адреналина установлено его повышение в ранние сроки после трансплантации, после чего он достоверно снижался. На 60-е сутки после операции следы адреналина в стволе головного мозга не обнаруживали в группах животных I и II. Уровень адреналина на 10-е и 30-е сутки после трансплантации был достоверно выше в группе животных, которым произведена трансплантация КСКМ ($P < 0,05$), по сравнению с таковым у животных, которым трансплантировали КЭНК.

Результаты исследования содержания биогенных аминов в стволе головного мозга животных представлены в таблице.

Полученные данные свидетельствуют о том, что КСКМ, дифференцированные в нейрообласть, и КЭНК после трансплантации в область эпилептического очага не только сохраняют жизнеспособность, но и способны к миграции и нейрональной дифференцировке. Присутствие в зоне трансплантации КСКМ большого количества клеток с признаками дистрофии, очевидно, является следствием их криогенного повреждения. Кроме того, нельзя исключить возможность иммунного ответа на трансплантацию аллогенного клеточного материала.

Результаты изучения динамики содержания биогенных аминов в стволе головного мозга крыс после трансплантации КЭНК и КСКМ в область эпилептического очага

Показатель	Величина показателя ($M \pm m$) в сроки, сутки, в группах животных									С низкой судорожной готовностью
	10			30			60			
	I	II	контрольной	I	II	контрольной	I	II	контрольной	
Серотонин	2,98±0,29*	3,2±0,12*	13,57±0,26	3,35±0,21*	3,67±0,14*Δ	14,14±0,32	3,51±0,22*	4,11±0,14*Δ	14,22±0,12	9,25±0,85
Дофамин	2,32±0,28	2,31±0,08Δ	2,37±0,16	1,75±0,1	2,15±0,17	2,32±0,28	2,91±1,73	2,85±0,26	2,31±0,08	3,32±0,95
Норадреналин	7,65±0,25*	7,12±0,13Δ	6,72±0,27	7,1±0,16*	6,92±0,07Δ	6,73±0,13	7,17±0,18*	6,87±0,13	6,68±0,32	8,12±1,12
Адреналин	0,29±0,02*	0,37±0,07*Δ	0	0,06±0,01*	0,24±0,05*Δ	0	0	0	0	0

Примечание. Различия показателей достоверны по сравнению с таковыми: * — в контрольной группе; Δ — в I группе ($P < 0,05$).

К статье Цымбалюка В.И., Кочина О.В. "Сравнительная оценка результатов трансплантации криоконсервированных эмбриональных нервных клеток и клеток стромы костного мозга..."

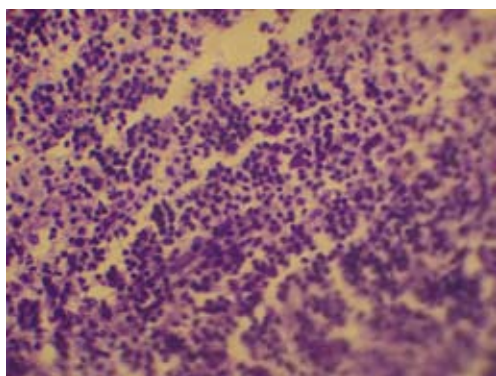


Рис. 1. Микрофото. 10-е сутки после трансплантации КЭНК. Окраска по Нисслю. Ув.×400.

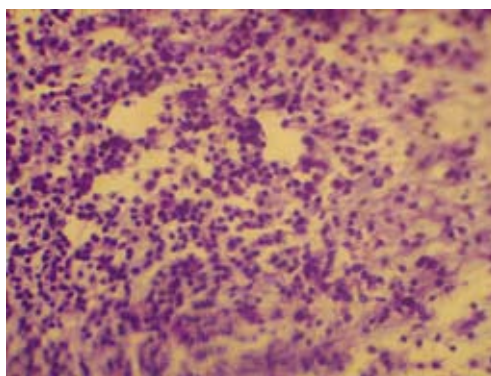


Рис. 2. Микрофото. 10-е сутки после трансплантации КСКМ. Окраска по Нисслю. Ув.×400.

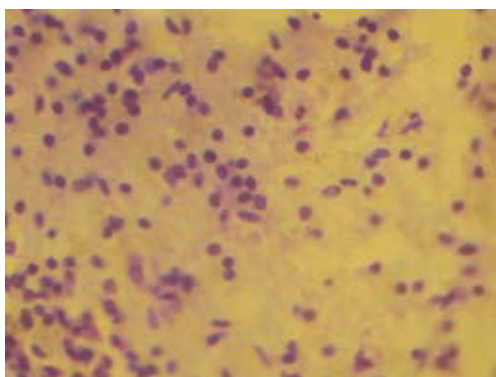


Рис. 3. Микрофото. 30-е сутки после трансплантации КЭНК. Окраска по Нисслю. Ув.×400.

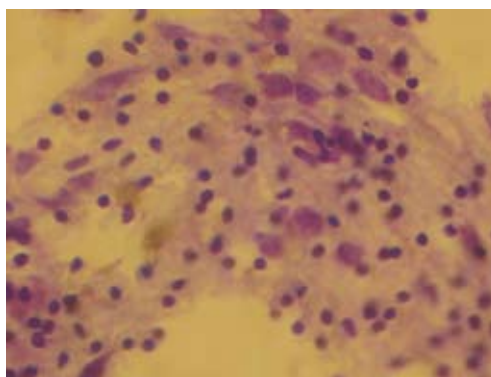


Рис. 4. Микрофото. 30-е сутки после трансплантации КСКМ. Окраска по Нисслю. Ув.×400.

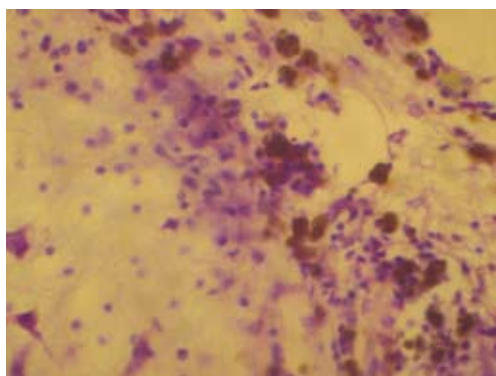


Рис. 5. Микрофото. 60-е сутки после трансплантации КЭНК. Окраска по Нисслю. Ув.×400.

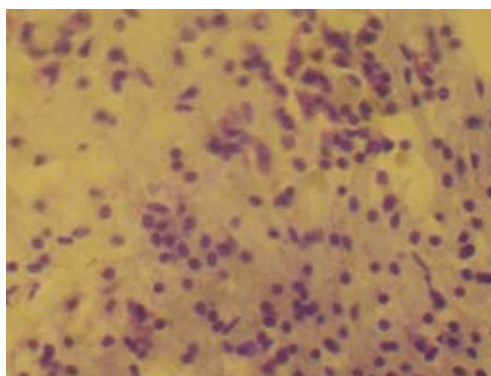


Рис. 6. Микрофото. 60-е сутки после трансплантации КСКМ. Окраска по Нисслю. Ув.×400.

Соответственно, в зоне трансплантации КСКМ наблюдали значительно меньшее количество клеток с признаками дистрофии, так как эти клетки не подвергались воздействию низкой температуры и не могли стать мишенью иммунного ответа, будучи производными собственных клеток стромы животных, у которых выполняли трансплантацию.

Повышение уровня серотонина в стволе головного мозга животных после введения пенициллина в гиппокамп можно рассматривать как реакцию исходно нормально функционирующих медиаторных систем на повышение судорожной готовности. Серотонинэргическая система выполняет тормозную и противоэпилептическую функцию, которая реализуется путем повышения активности ГАМК-эргических нейронов. После трансплантации КЭНК и КСКМ отмечено стойкое и значительное снижение уровня серотонина, что можно рассматривать как признак снижения судорожной активности головного мозга [2, 5].

Тенденцию к повышению уровня дофамина, наблюдаемую после трансплантации как КЭНК, так и КСКМ, по данным литературы, также можно рассматривать как маркер снижения судорожной готовности [2, 9].

Повышение уровня адреналина в стволе головного мозга в ранние сроки после трансплантации, возможно, является реакцией на операционную травму. Подобное увеличение концентрации этого биогенного амина мы наблюдали и в ранние сроки после операции моделирования эпилепсии.

Различия уровня биогенных аминов у животных групп I и II, возможно, могут быть обусловлены тем, что суспензии КСКМ и КЭНК, использованные в эксперименте, имели различную плотность клеток, которая была ниже в суспензии КСКМ. С другой стороны, жизнеспособность клеток в суспензии КЭНК была более низкой вследствие криоконсервирования. Кроме того, КЭНК, будучи чужеродным материалом, могут стать мишенью иммунного ответа организма-реципиента.

Выводы. 1. КСКМ, дифференцированные в нейробласты, и КЭНК после трансплантации в область эпилептического очага не только сохраняют жизнеспособность, но и, видимо, способны к нейрональной дифференцировке.

2. КСКМ, дифференцированные в нейробласты, несколько более активны в отношении нейрональной дифференцировки.

3. После трансплантации как КЭНК, так и КСКМ отмечено стойкое и значительное уменьшение содержания серотонина в стволе головного мозга, что можно расценивать как признак снижения судорожной активности.

4. Тенденцию к повышению уровня дофамина, наблюдаемую после трансплантации КЭНК и КСКМ, можно рассматривать как маркер снижения судорожной готовности.

5. Повышение уровня адреналина в стволе головного мозга в ранние сроки после трансплантации, возможно, является реакцией на операционную травму.

6. КЭНК и КСКМ, введенные в зону эпилептического очага, оказывают сходное влияние на динамику морфологических изменений в зоне трансплантации и уровня биогенных аминов в стволе головного мозга.

Список литературы

1. Архипов В.И., Сочивко Д.Г., Годухин О.В. Механизмы нарушения процессов памяти в экспериментальных моделях эпилепсии // *Успехи современной физиологии.* — 2001. — Т.121, №2. — С.211–222.
2. Бехтерева Н.П., Камбарова Д.К., Поздеев В.К. Устойчивое патологическое состояние при болезни мозга. — Л.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1978. — 239 с.
3. Буреш Я., Петрань М., Захар И. Электрофизиологические методы исследования. — М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1962. — 456 с.
4. Зенков Л.Р. Вальпроаты в современном лечении эпилепсии // *Рус. мед. журн.* — 2000. — Т.8, №15–16. — С.647–652.
5. Минцер О.П., Угаров Б.Н., Власов В.В. Методы обработки медицинской информации. — К.: Вища шк., 1982. — 160 с.
6. Михайлов И.Б., Гузева В.И., Мельникова Н.В. Ксантуреновая кислота тормозит активность экспериментального эпилептического очага в гиппокампе крыс // *Эксперим. и клин. фармакология.* — 1997. — Т.60, №2. — С.7–9.
7. Попова Э.Н., Яхин Ф.А. Изменение структуры нейронов, глиальных клеток и капилляров при аудиогенной эпилепсии // *Казан. мед. журн.* — 1997. — Т.78, №3. — С.182–184.
8. Семенова В.М., Медведев В.В. Обонятельная луковица как источник накопления и дифференцировки нейрональных стволовых клеток в постнатальном мозге человека (обзор литературы) // *Укр. нейрохірург. журн.* — 2004. — №2. — С.4–9.
9. Сергиенко Н.Г., Грищенко В.И., Логинова Г.А. Биогенные амины и возбудимость головного мозга. — К.: Наук. думка, 1992. — 145 с.
10. Сипитый В.И., Кочин О.В. Динамика морфологических и биохимических изменений в головном мозге крыс при моделировании эпилепсии // *Медицина сегодня и завтра.* — 2004. — №2. — С.19–22.
11. Цимбалюк В.И., Медведев В.В. Роль нейрональных стовбурих прогеніторів в процесах виникнення і прогресування деяких пухлин головного мозку, а також епілептогенезу (огляд літератури) // *Укр. нейрохірург. журн.* — 2004. — №1. — С.9–14.
12. Atack C., Magnusson T. A Procedure for the isolation of noradrenaline (together with adrenaline),

- dopamine, 5-hydroxytryptamine and histamine from the lame tissue sample using a single column of strongly acidic cation exchange resin // *Acta Pharmacol. Toxicol.* — 1978. — V.42. — P.35–37.
13. Avanzini G., Franceschetti S. Cellular biology of epileptogenesis // *Lancet Neurol.* — 2003. — V.2, N1. — P.33–42.
 14. Gould E., Beylin A., Tanapat P. et al. Learning enhances adult neurogenesis in hippocampal formation // *Nat. Neurosci.* — 1999. — V.2. — P.260–265.
 15. Houser C.R., Miyashiro J.E., Swartz B.E. et al. Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy // *J. Neurosci.* — 1990. — V.10. — P.267–282.
 16. Jouvet M. Insomnia following selective decrease of cerebral serotonin // *Science.* — 1969. — V.163, N862. — P.32–41.
 17. Ko T.S., Chae S.A., Kim K.J., Hwang Y.S. Ketogenic diet: effects in hippocampal c-fos expression and neuronal death after kainic acid induced seizures in immature rats // *Epilepsia.* — 1999. — V.40, suppl.7. — P.79–80.
 18. McDonald J.W., Liu X.Z., Qu Y. et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord // *Nat. Med.* — 1999. — V.5. — P.1410–1412.
 19. Parent J.M., Lowenstein D.H. Seizure-induced neurogenesis 6 are more new neurons good for an adult brain? // *Prog. Brain. Res.* — 2002. — V.35. — P.121–131.
 20. Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro // *Exp. Neurol.* — 2000. — V.164. — P.247–256.

**Порівняльна оцінка результатів
трансплантації кріоконсервованих
ембріональних нервових клітин та клітин
строми кісткового мозку, індукованих у
нейробласти, у ділянку експериментального
епілептичного вогнища**
Цимбалюк В.І., Кочін О.В.

Проведено порівняльну оцінку результатів хірургічного лікування епілепсії в експерименті з застосуванням кріоконсервованих ембріональних нервових клітин та клітин стромки кісткового мозку, індукованих у нейробласти. Встановлено, що трансплантовані в ділянку епілептичного вогнища ембріональні нервові клітини та клітини стромки кісткового мозку не тільки зберігають життєздатність, а й здатні диференціюватися у нейрони. У тварин, яким здійснено трансплантацію ембріональних клітин та клітин стромки кісткового мозку, відзначено подібну позитивну динаміку вмісту біогенних амінів у стовбурі головного мозку.

**The comparative estimation of cryopreserved
embryonic nervous cells and bone marrow
stromal cells transplantation results in area of
experimental epileptic center**
Tsybalyuk V.I., Kochin O.V.

The comparative estimation of experimental epilepsy surgical treatment results in experiment with application of cryopreserved embryonic nervous cells and bone marrow stromal cells, induced in neuroblasts, was carried out. It is established, that the cryopreserved embryonic nervous cells and bone marrow stromal cells, induced in neuroblasts, transplanted in area of epileptic center not only keep their viability, but also were capable to differentiate in neurons. The similar positive dynamic of biogenic amines maintenance in a brain stem was marked in the groups of animals, in which the transplantation of cryopreserved embryonic nervous cells and bone marrow stromal cells, induced in neuroblasts, have been executed.