

Оригінальна стаття

УДК 616.858-089.843:611.013.395:611.018.26]-092.9

Пятикоп В.А.¹, Мсаллам М.А.¹, Щегельская Е.А.¹, Кутовой И.А.¹, Губина-Вакулик Г.И.², Горбач Т.В.³

¹ Кафедра нейрохирургии, Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

² Кафедра патологической анатомии, Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

³ Кафедра медицинской и биоорганической химии, Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

Сравнительная эффективность внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крысам, у которых моделировали паркинсоноподобный синдром

Цель: изучение сравнительной эффективности внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСККМ) человека и крысы при моделировании паркинсоноподобного синдрома (ПС) путем химической деструкции черного вещества (ЧВ) на основе анализа поведенческих, морфофункциональных и биохимических показателей.

Материалы и методы. Животные распределены на 5 групп: I — интактные (n=7); II — модель ПС, двустороннее введение 6-ОНДА в ЧВ (n=15); III — модель ПС, внутривенное введение МСККМ человека (в дозе $0,5 \times 10^6$ кл на 1 крысу) (n=9); IV — модель ПС, внутривенное введение МСККМ крыс (в дозе 1×10^6) (n=9); V — модель ПС, внутривенное введение МСККМ крыс (в дозе 2×10^6) (n=9). Клетки вводили на 14-е сутки после создания модели ПС. Эффективность внутривенного введения МСККМ оценивали по степени восстановления двигательных функций, изменению уровня дофамина (ДА) в крови и лобной доле мозга крыс, морфологическим изменениям ЧВ.

Результаты. Введение МСККМ человека при ПС способствовало восстановлению движений на 14–15-е сутки, нормализации уровня ДА в крови и ткани лобной доли на 10-е сутки, увеличению количества нейронов в поврежденной зоне ЧВ. Внутривенное введение МСККМ крыс в дозе 1×10^6 при ПС малоэффективно, частичное восстановление движений и нормализацию уровня ДА в крови и ткани лобной доли наблюдали лишь на 20–21-е сутки. Внутривенное введение МСККМ крыс в дозе 2×10^6 при ПС способствовало восстановлению движений на 9–10-е сутки, нормализации уровня ДА в крови и ткани лобной доли мозга на 10-е сутки, появлению активных нейронов в области ЧВ.

Выводы. Внутривенное введение МСККМ крыс и человека эффективно при лечении симптомов ПС у крыс и зависит от количества введенных клеток.

Ключевые слова: паркинсоноподобный синдром, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, поведение крыс, морфологические изменения, уровень дофамина, эксперимент.

Український нейрохірургічний журнал. — 2014. — №2. — С. 55-61.

Поступила в редакцию 11.03.14. Принята к публикации 25.04.14.

Адрес для переписки: Кутовой Игорь Александрович, Кафедра нейрохирургии, Харьковский национальный медицинский университет, пр. Ленина, 4, Харьков, Украина, 61022, e-mail: kutovoy@ua.fm

Вступление. Увеличение в последние десятилетия продолжительности жизни обусловило увеличение частоты выявления нейродегенеративных заболеваний. Нейродегенеративный процесс формируется как следствие генетической патологии, осложнение инфекционных заболеваний, травмы либо воздействия токсичных факторов. Однако важнейшее значение имеет широкое распространение возрастных идиопатических нейродегенеративных заболеваний [1, 2]. Наиболее распространенными нейродегенеративными заболеваниями в мире считают болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП) и болезнь диффузных телец Леви (БДТЛ). Важно отметить, что, если для БА и БДТЛ характерно распространение нейродегенеративного процесса (с поражением нейронов коры большого мозга в целом), то при БП нейродегенеративный процесс преимущественно локализован. Как хроническое, неуклонно прогрес-

сирующее заболевание центральной нервной системы БП характеризуется дегенерацией нигростриарных нейронов, уменьшением выработки ДА и нарушением функции базальных ганглиев, что проявляется моторными и когнитивными расстройствами [3]. Впервые симптомы БП как самостоятельного заболевания описаны Д. Паркинсоном в 1817 г. Название «болезнь Паркинсона» предложил в 80-х годах XIX столетия французский невролог П.М. Шарко [4].

Заболеваемость и распространенность БП неуклонно увеличиваются с возрастом: от 1% — у пациентов в возрасте старше 60 лет до 2% — старше 70 лет [5]. Продолжительная (5–10 лет) фармакотерапия БП обуславливает возникновение значимых побочных реакций, в основном в виде дискинезии, и снижение ее эффективности. Таким образом, широкое распространение БП в популяции и неэффективность стандартных методов терапии в определенных клини-

Статья содержит рисунки, которые отображаются в печатной версии — в оттенках серого, в электронной — в цвете.

ческих ситуациях свидетельствуют об актуальности проблемы. В последние 18–20 лет осуществляются попытки создания принципиально новых методов лечения БП, в частности, нейростимуляция глубинных структур головного мозга, заместительная клеточная терапия с применением фетальных дофаминергических нейронов [6, 7]. Однако применение фетальных клеток связано с морально-этическими проблемами, отсутствием достаточного количества жизнеспособных клеток для эффективной трансплантации, нестабильностью достигнутого результата. Одним из альтернативных методов использованию фетальных клеток и перспективных направлений в настоящее время считают возможность применения стволовых клеток (СК) пациента. СК разных типов являются ценным источником нейроноподобных клеток как субстрата клеточной терапии нейродегенеративных и других заболеваний [8–11].

В экспериментальных исследованиях у грызунов при ПС отмечена успешная коррекция двигательных расстройств путем трансплантации мезенхимальных клеток, обладающих полипотентными свойствами [12–14]. Перспективными являются научные изыскания, направленные на разработку дофаминпродуцирующей функции мезенхимальных клеток [15]. Используемая нами модель ПС основана на введении в ЧВ грызунов нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-OHDA), блокирующего синтез ДА в эндогенных дофаминергических нейронах, что обуславливает возникновение характерных для БП симптомов. Модель проста и доступна в использовании, что позволило ей занять важнейшее место в экспериментальной неврологии и нейрохирургии [16].

В опытах на крысах как с моделированной черепно-мозговой травмой, так и с моделью ПС показано, что СК, введенные внутриартериально, выживают и мигрируют в поврежденные участки мозга [16–18].

Также доказана эффективность трансплантации СК, содержащих нейротрофические факторы, в структуры мозга крыс [19–21]. Показано, что СК выживают, пролиферируют и мигрируют в зону повреждения, при этом они экспрессируют нейроно- и астроцитоспецифические факторы [22–24].

Целью работы явилось изучение сравнительной эффективности внутривенного введения МСККМ человека и крысы при ПС на основе анализа поведенческих, морфофункциональных и биохимических показателей.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проведены на 49 крысах-самцах линии Вистар-Альбино Глаксо массой тела от 200 до 250 г, в возрасте от 3 до 4 мес. Животных содержали в стандартных условиях вивария (12-часовой световой день, свободный доступ к воде и пище, температура воздуха 23–25°C).

Животные распределены на 5 групп: I группа — интактные (n=7); II группа — модель ПС, двустороннее введение 6-OHDA в ЧВ (n=15); III группа — модель ПС с последующим (на 14-е сутки) внутривенным введением в хвостовую вену МСККМ человека (в дозе $0,5 \times 10^6$ клеток в 0,5 мл раствора Хэнкса на 1 крысу) (n=9); IV группа — модель ПС с последующим (на 14-е сутки) внутривенным введением в хвостовую вену МСККМ крыс (в дозе 1×10^6 на 1 крысу) (n=9); V группа — модель ПС с последующим (на 14-е сутки) внутривенным введением в хвостовую вену МСККМ крыс (в дозе 2×10^6 на 1 крысу) (n=9).

Способ моделирования ПС путем введения в ЧВ 6-OHDA. Крысу массой тела 200–250 г вводили в наркоз внутривенной инъекцией тиопенталнатрия (50 мг/кг). Животное фиксировали в стереотаксическом аппарате, после обработки раствором йода по средней линии производили разрез длиной до 2 см, скелетировали кость. Для точного попадания в ЧВ использовали стереотаксические координаты: AP=4,0; L=1,5; D=8,2 мм вентрально к поверхности коры [25]. С двух сторон симметрично накладывали фрезевые отверстия диаметром 1 мм и через капилляр вводили 6-OHDA (8 мкг/кг) на глубину 8,2 мм.

В группе II при билатеральной деструкции ЧВ у крыс возникали грубые двигательные нарушения в виде монотонных движений головой (по типу «да-да» «нет-нет»), «горбоподобного» изгиба туловища, вертикально поднятого хвоста. Описанные расстройства выявлены у всех животных в 1-е сутки после деструкции ЧВ. Двигательные нарушения сохранялись в течение всего периода наблюдения (до 54 сут) после деструкции ЧВ (контрольная группа).

Метод выделения и размножения в культуре МСККМ крыс. Костный мозг вымывали из бедренной кости крысы в центрифужную пробирку, дважды отмывали его в растворе Хэнкса путем центрифугирования в течение 10 мин при скорости 450 g. Полученную суспензию клеток рассеивали в культуральные флаконы площадью 80 см² в среде DMEM/F12 с 20% фетальной бычьей сывороткой (SIGMA-ALDRICH) и 50 мкг/мл гентамицина. Через 24 ч культивирования среду сливали, прикрепившиеся клетки промывали раствором Хэнкса. Добавляли свежую среду и культивировали МСККМ в CO₂-инкубаторе в течение 14 сут до образования монослоя клеток, заменяя среду через каждые 3 сут. МСККМ снимали со дна культурального флакона после кратковременной инкубации в смеси растворов Версена и трипсина. Трипсин инактивировали средой с сывороткой и осаждали клетки путем центрифугирования. Осадок ресуспендировали в растворе Хэнкса до необходимой концентрации.

Метод выделения и размножения в культуре МСККМ человека. Из костно-губчатого биоптата подвздошной кости добровольного донора (1 см³) выделяли суспензию костного мозга в чашку Петри с раствором Хэнкса, перенесли ее в центрифужную пробирку и осаждали путем центрифугирования при скорости 450 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM с 10% фетальной бычьей сывороткой, 2 ммоль L-глутамин и раствором антибиотиков/антимикотиков (SIGMA-ALDRICH) (5 мкл/мл), рассеивали в культуральные флаконы (75 см²). Через 48 ч культивирования в CO₂-инкубаторе отмывали прикрепившиеся ко дну флаконов МСК от гемопоэтических клеток в двух сменах раствора Хэнкса, добавляли свежую среду и культивировали МСК до образования монослоя клеток в течение 2–3 нед. Среду меняли дважды в неделю. Клетки снимали со дна флаконов после инкубации в растворе трипсин-ЭДТА. Осаждали суспензию клеток путем центрифугирования при скорости 450 g в течение 10 мин, осадок ресуспендировали до необходимой концентрации клеток в растворе Хэнкса. Концентрацию клеток считали в камере Горяева. МСК человека использовали в эксперименте после получения информированного согласия добровольного донора костного мозга.

Способ введения суспензии клеток животным. Для внутривенного введения суспензии МСККМ

животное помещали в клетку с отверстием для хвоста. Кончик хвоста крысы фиксировали левой рукой, а правой рукой с помощью инсулинового шприца вводили 0,5 мл суспензии клеток в хвостовую вену.

Гистологический метод исследования. Через 10, 20 и 30 сут после введения МСККМ крысам, у которых моделировали ПС, животных умерщвляли, головной мозг фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и заключали в парафин. Серийные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Нисслю. Гистологическое исследование препаратов проводили с помощью светового микроскопа AXIO VERT (Zeiss).

Биохимический метод оценки уровня дофамина. Уровень ДА в структурах головного мозга и в крови определяли с использованием метода колончатой хроматографии с последующим флуориметрическим анализом. Уровень ДА изучали через 10, 20 и 30 сут после введения МСККМ крысам, у которых моделировали ПС, результаты выражали в нмоль/л.

Результаты и их обсуждение

Морфологическая характеристика МСККМ крысы и человека в культуре. МСККМ человека, как и крысы, характеризуются адгезией к культуральному

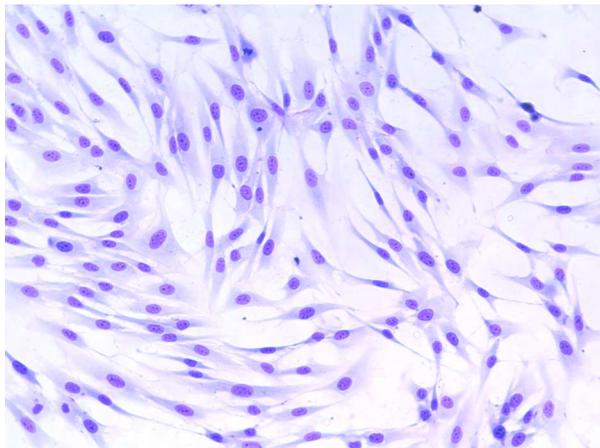


Рис. 1. Микрофото. Фибробластоподобные МСККМ человека на 12-е сутки культивирования *in vitro*. Окраска по Гимза. Ув.×200.

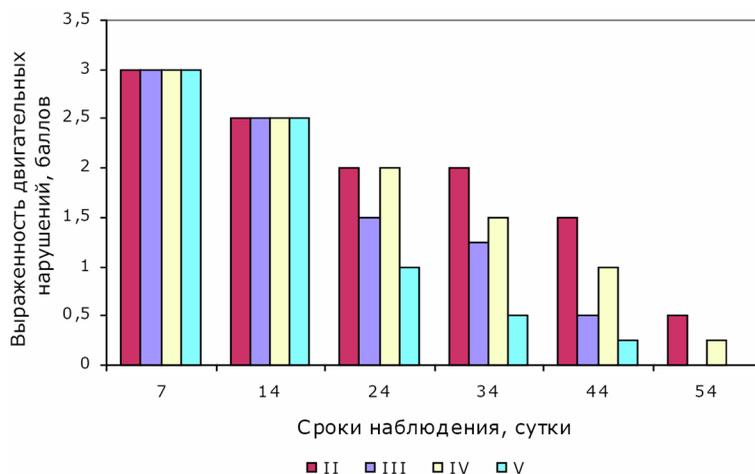


Рис. 2. Выраженность и сроки проявления двигательных расстройств у крысы при модели ПС до и после трансплантации МСККМ крысы и человека.

пластику, формируют на дне флаконов гетерогенные колонии фибробластоподобных клеток с овальными ядрами средних размеров и несколькими ядрышками (**рис. 1**). Через 2 нед культивирования с каждого флакона можно получить 1,5–2 млн. клеток. Жизнеспособность клеток в препарате для инъекции составляла в среднем $(92 \pm 2)\%$.

Результаты анализа двигательных расстройств. Выраженность двигательных расстройств у крысы при моделировании ПС достигала максимума к 7-м суткам. Монотонные движения головой, «вертикальный» хвост, «горбоподобный» изгиб туловища, малоподвижность были максимально выражены в сроки 7–15 сут и сохранялись практически без изменений в течение всего периода наблюдения. Выраженность двигательных расстройств оценивали по балльной системе, предложенной нами [26].

В группе III движения нормализовались на 14–15-е сутки после введения суспензии клеток, в группе IV — на 20–21-е сутки, в группе V — на 9–10-е сутки (**рис. 2**). Результаты изучения динамики регресса двигательных нарушений свидетельствуют о высокой эффективности внутривенного введения МСККМ человека в дозе $0,5 \times 10^6$ на 1 крысу и крысы в дозе 2×10^6 клеток на 1 крысу. Более низкая концентрация МСККМ крысы существенно не влияет на коррекцию моторных функций у экспериментальных животных.

Биохимический анализ уровня дофамина.

Для анализа значимости различий в опытах применяли критерий Манна–Уитни как наиболее информативный из непараметрических критериев для малых независимых выборок.

Критерий Манна–Уитни — статистический критерий для проверки гипотезы об однородности двух выборок, все элементы которых взаимно независимы и подчиняются непрерывным распределениям. Непрерывность критерия предполагает отсутствие равных значений (связок) в группах данных. Однако в нашем исследовании такие связи были, поэтому для оценки значимости различий учитывали скорректированную оценку. Для парного сравнения результатов опыта среди групп объема в пределах 9–15 проведен расчет с помощью пакета статистического анализа Statistica.

Наличие значительного количества связок между группами I–III, I–V потребовало дополнительного исследования гипотезы об однородности с помощью критерия Колмогорова–Смирнова, которые показали, что гипотеза принимается.

При анализе уровня ДА в крови и ткани лобной доли мозга экспериментальных животных отмечен ряд закономерностей (**см. таблицу**).

Таким образом, при сопоставлении динамики моторных нарушений и уровня ДА в крови и ткани лобной доли установлена корреляционная связь между этими показателями.

Морфологический анализ изменений в черном веществе.

По данным гистологического исследования ЧВ у животных группы I, комплекс клеток ЧВ имеет форму, напоминающую треугольник, с нейронами средней величины, угловатой или продолговатой формы, с отростками, формирующими конусы в месте отхождения от тела нейрона.

Уровень ДА в крови и ткани лобной доли мозга

Группы животных	ДА в сроки наблюдения, сутки							
	в крови, нг/мл			p<	в ткани лобной доли мозга, нмоль/л			p<
	10-е	20-е	30-е		10-е	20-е	30-е	
I	0,85	0,85	0,85		1,09	1,09	1,09	
II	0,64	0,70	0,76	0,005	0,94	0,97	1,05	0,005
III	0,95	0,92	0,96	0,15	1,0	1,0	1,17	0,20
IV	0,72	0,89	0,79		0,97	1,05	1,09	
V	1,00	0,95	0,95	0,05	1,22	1,05	1,17	0,05

Цитоплазма базофильна обычно в нейронах с гиперхромным ядром. Нейропил в ЧВ и вокруг него мелкоячеистый, что характерно для нервной ткани с высокой степенью сохранности отростков нейронов (рис. 3).

Через 2 нед после моделирования ПС, на момент трансплантации МСККМ поврежденная зона ЧВ представлена меньшим количеством нейронов, чем у интактных животных. Эти нейроны, часто с гиперплазированными отростками, располагаются в виде узкой полосы вдоль нижней поверхности мозга

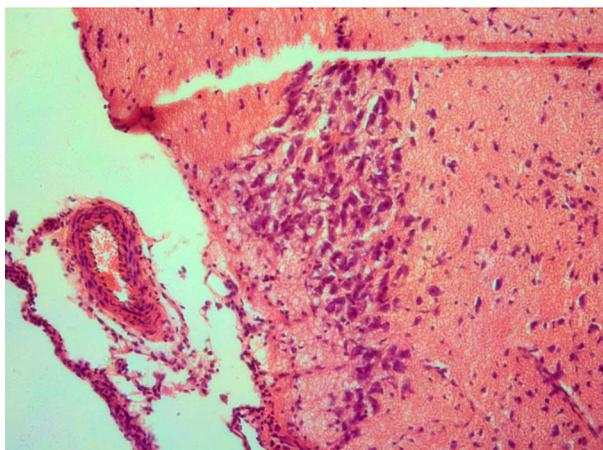


Рис. 3. Микрофото. Скопление нейронов в зоне ЧВ у интактной крысы (группа I). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.×100.

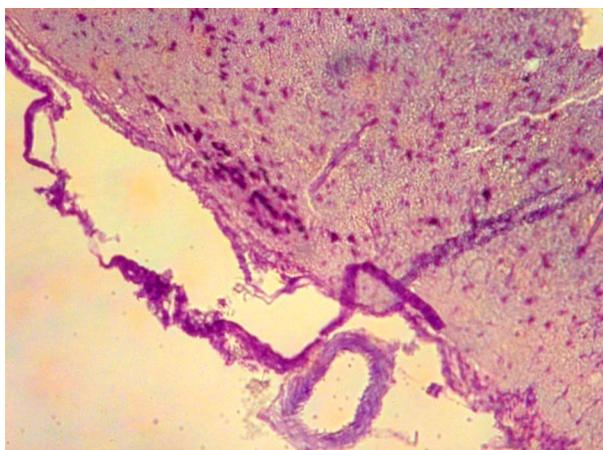


Рис. 4. Микрофото. Фронтальный срез головного мозга в участке ЧВ через 2 нед после деструкции (группа II). Окраска по Нисслю. Ув.×100.

(рис. 4). Таким образом, даже через 2 нед после химической деструкции в зоне ЧВ отмечен отчетливый дефицит нейронов.

Через 10 сут после внутривенного введения МСККМ человека крысам (III группа) в зоне ЧВ обнаружена небольшая группа нейронов преимущественно угловатой формы, с темными ядрами и малым объемом цитоплазмы. Нейропил в значительной мере восстановлен, выглядит мелкоячеистым и густым (рис. 5).

На 20-е и 30-е сутки в зоне ЧВ наблюдали формирование компактного скопления клеток. Многие из них овальной или угловатой формы в связи с наличием отростков нейронов. Нейропил возле нейронов с овальными телами разрежен (по-видимому, это молодые клетки), возле нейронов угловатой формы — более густой. Это более дифференцированные нейроны со своими отростками и отростками других нейронов (рис. 6).

Животные IV и V групп различались дозой трансплантированных внутривенно МСККМ крыс. По данным гистологических исследований у животных группы IV на 10-е и 20-е сутки в зоне ЧВ обнаружена компактная группа нейронов, однако их количество меньше, чем в те же сроки у животных группы V. Некоторые нейроны с темным ядром и резко базофильной цитоплазмой, что свидетельствует об активном синтетическом процессе, другие клетки меньше, с гиперхромным ядром (рис. 7).

Через 30 сут после трансплантации МСККМ у животных группы V в зоне ЧВ наблюдали многоклеточное образования обычной формы, как у интактных животных. Клетки размещены плотно, большинство

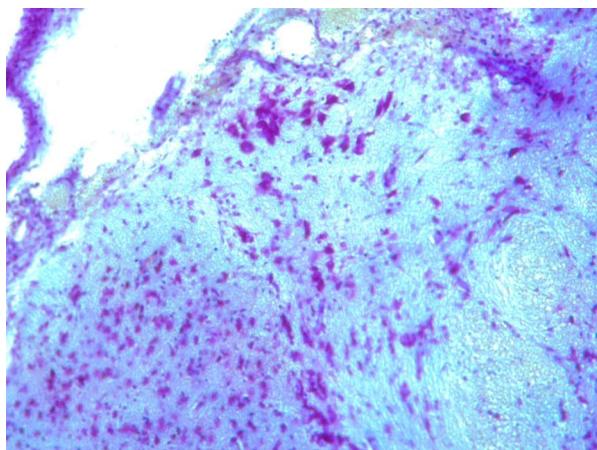


Рис. 5. Микрофото. Фронтальный срез головного мозга в участке ЧВ через 10 сут после трансплантации МСККМ человека (группа III). Окраска по Нисслю. Ув.×100.

— угловатой формы, с интенсивно базофильной цитоплазмой (**рис. 8**), что, вероятно, обусловлено компенсаторным увеличением количества рибосом и активным синтезом.

Таким образом, анализ данных, полученных при использовании различных методов, показал, что в группе II под влиянием билатеральной деструкции ЧВ у крыс возникали грубые двигательные нарушения в виде монотонных движений головой (по типу «да-да», «нет-нет»), выявляли «горбоподобный» изгиб туловища, вертикально поднятый хвост. Совокупность симптомов описана как ПС. Динамика двигательных расстройств у крыс свидетельствовала, что выраженность этих расстройств к 7-м суткам была максимальной. Монотонные движения головой, «вертикальный» хвост, «горбоподобный» изгиб туловища, малоподвижность были максимально выражены в сроки 7–15 сут и сохранялись практически в течение всего периода наблюдения. По данным гистологических исследований зоны ЧВ у животных с моделированным ПС подтвержден дефицит нейронов в этой зоне.

В связи с тем, что в некоторых исследованиях показана эффективность применения МСК человека

(несмотря на их ксеногенность) при лечении некоторых заболеваний в эксперименте, а также высказываются предположения об иммунотолерантности МСК, мы решили сравнить эффективность лечения ПС у крыс путем внутривенного введения МСККМ крысы и человека.

В группе III движения животных нормализовались на 14–15-е сутки после введения МСККМ человека, уровень ДА в крови и ткани лобной доле мозга повысился на 10-е сутки. Небольшие группы нейронов обнаружены в зоне ЧВ также через 10 сут после трансплантации клеток. Компактные группы нейронов выявлены в этой зоне уже через 20 сут. Несмотря на то, что для лечения ПС применяли ксеногенные для крыс клетки человека, результат оказался положительным. Возможно, это обусловлено паракринным влиянием МСК человека на репаративные механизмы в мозгу крыс, которые могут стимулировать деление и дифференцировку собственных нервных СК крыс *in vivo*.

В группе IV нормализация движений отмечена на 20–21-е сутки, уровень ДА в крови и ткани лобной доли повысился на 20-е сутки. В зоне ЧВ в эти сроки обнаружено незначительное количество нейронов. Это свидетельствовало об отсутствии значимого восстановительного эффекта после трансплантации МСККМ крыс в такой дозе.

В группе V движения у животных нормализовались на 9–10-е сутки, уровень ДА в крови и ткани лобной доли повысился на 10-е сутки, по данным гистологических исследований в зоне ЧВ на 10-е и 20-е сутки обнаружены группы активных нейронов, количество которых значительно увеличивалось к 30-м суткам после трансплантации МСККМ. Эффективность внутривенного введения МСККМ человека (в дозе $0,5 \times 10^6$ кл на 1 крысу) и МСККМ крысы (в дозе 2×10^6 кл на 1 крысу) при лечении ПС аналогична, однако механизмы их влияния на симптомы ПС могут быть различными.

Результаты наших исследований свидетельствуют об эффективности внутривенного введения МСККМ для лечения ПС у крыс. Эффект зависит от количества трансплантированных клеток. Для оценки возможности применения такой клеточной терапии в лечении БП у человека необходимо проведение многосторонних клинических исследований.

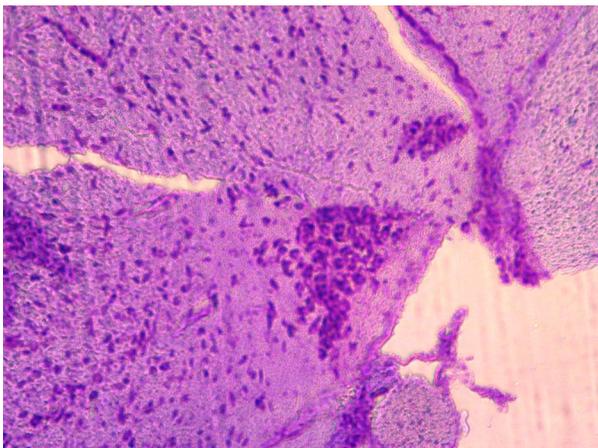


Рис. 6. Микрофото. Скопление нейронов в участке ЧВ через 20 сут после трансплантации МСККМ человека. Окраска по Ниссля. Ув. $\times 100$.

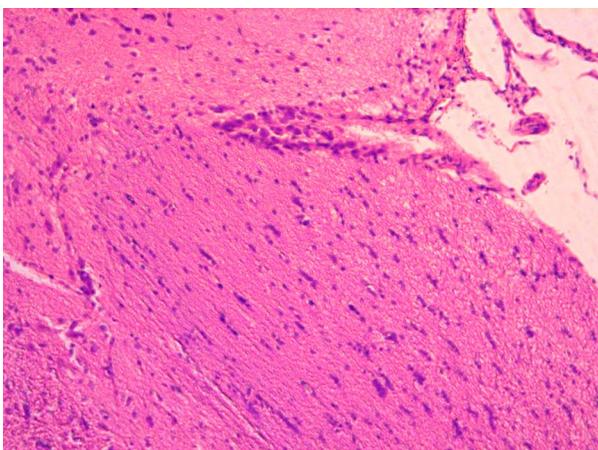


Рис. 7. Микрофото. Небольшое скопление нейронов в зоне ЧВ мозга крыс группы IV на 20-е сутки после введения МСККМ. Окраска по Ниссля. Ув. $\times 100$.

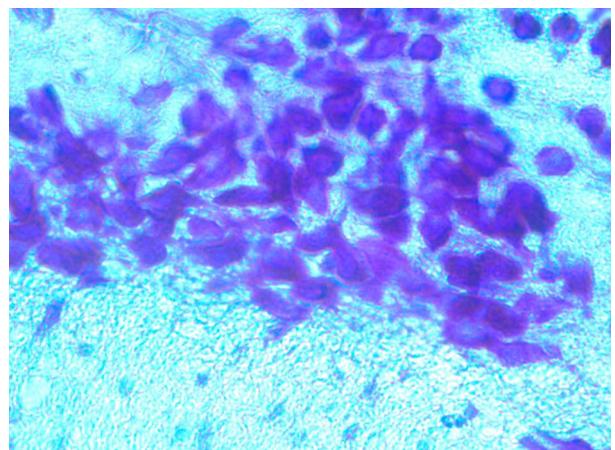


Рис. 8. Микрофото. Скопление нейронов в зоне ЧВ головного мозга у крысы группы V на 30-е сутки после введения МСККМ крысы. Окраска по Ниссля. Ув. $\times 400$.

Выводы. 1. Билатеральная деструкция ЧВ путем введения в него 6-OHDA обуславливает возникновение у животных ПС с характерными двигательными проявлениями (монотонные движения головой, «вертикальный» хвост, «горбоподобный» изгиб туловища, похудение) и снижение уровня ДА в крови и ткани лобной доли мозга.

2. Внутривенное введение МСККМ человека при ПС способствовало восстановлению движений на 14–15-е сутки, нормализации уровня ДА в крови и ткани лобной доли мозга на 10-е сутки, увеличению количества нейронов в поврежденной зоне ЧВ на 20-е сутки

3. Внутривенное введение МСККМ крыс в дозе 1×10^6 при ПС у крыс недостаточно эффективно, частичное восстановление движений и нормализацию уровня ДА в крови и ткани лобной доли мозга наблюдали лишь на 20–21-е сутки. Внутривенное введение МСККМ крыс в дозе 2×10^6 при ПС способствовало восстановлению двигательной активности животных на 9–10-е сутки, нормализации уровня ДА в крови и ткани лобной доли на 10-е сутки, появлению активных нейронов в области ЧВ.

Список литературы

- Коррекция ориентировочно-исследовательского дефицита у крыс с помощью мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / И.Б. Соколова, О.Р. Федотова, Е.Г. Гилерович, А.А. Билибина, Н.Н. Павличенко, П.В. Кругляков, Д.Г. Полинцев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2009. — Т.4, №4. — С.65–72.
- Никольский Н.Н. Эмбриональные стволовые клетки человека. Проблемы и перспективы / Н.Н. Никольский, И.А. Габай, Н.В. Сомова // Цитология. — 2007. — Т.49, №7. — С.529–537.
- Болезнь Паркинсона: клиника, диагностика и лечение / Е.И. Гусев, А.Б. Гехт, Г.Р. Попов [и др.] // Нейродегенеративные заболевания. Фундаментальные и прикладные аспекты; под ред. М.В. Угрюмова. — М.: Наука, 2010. — С.52–86.
- Пятикоп В.О. Нейрохірургічна корекція рухових порушень при паркінсонізмі (експериментальне та клінічне дослідження): автореф. дис. ... д-ра мед. наук: спец. 14.01.05 — нейрохірургія / В.О. Пятикоп В.О.; ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України». — К., 2009. — 36 с.
- Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains / E. Mezey, S. Key, G. Vogelsang, I. Szalayova, G.D. Lange, B. Crain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — V.100, N3. — P.1364–1369.
- Нейротрансплантация в лечении болезни Паркинсона (катамнез) / В.А.Шабалов, Н.В.Федорова, М.В.Угрюмов, А.П.Попов, В.Н.Шток, С.А.Яковлева, М.Аропа // Вопр. нейрохірургії ім. Н.Н. Бурденко. — 2002. — №2. — С.29–33.
- О трансплантации эмбриональных нервных тканей в лечении паркинсонизма / Н.П. Бехтерева, Е.Г. Гилерович, Ф.А. Гурчин, В.А. Лукин // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 1990. — Т.90, №11. — С.1013.
- Дыбан А.П. Стволовые клетки в экспериментальной и клинической медицине / А.П. Дыбан, П.А. Дыбан // Мед. академ. журн. — 2002. — Т.2, №3. — С.3–25.
- Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на динамику морфологических изменений в головном мозге крыс после ишемического инсульта / Н.Н. Зинькова, Е.Г. Гилерович, И.Б. Соколова, Е.В. Шведова // Цитология. — 2007. — Т.49, №11. — С.923–933.
- Отеллин В.А. Морфологическое обоснование применения метода нейротрансплантации в клинике / В.А. Отеллин // Вопр. нейрохірургії ім. Н.Н. Бурденко. — 1999. — Т.4. — С.32–36.
- MEF2C enhances dopaminergic neuron differentiation of human embryonic stem cells in a parkinsonian rat model / E.G. Cho, J.D. Zaremba, S.R. McKercher, M. Talantova, S. Tu, E. Masliah, S.F. Chan, N. Nakanishi, A. Terskikh, S.A. Lipton // PLoS One. 2011;6(8):e24027. doi: 10.1371/journal.pone.0024027
- Dopamine cell transplantation in Parkinson's disease: Challenge and perspective / Y. Ma, S. Peng, V. Dhawan, D. Eidelberg // Br. Med. Bull. — 2011. — N100. — P.173–189.
- Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α synuclein locus / M.J. Devine, M. Ryten, P. Vodicka, A.J. Thomson, T. Burdon, H. Houlden, F. Cavaleri, M. Nagano, N.J. Drummond, J.W. Taanman, A.H. Schapira, K. Gwinn, J. Hardy, P.A. Lewis, T. Kunath // Nat. Commun. — 2011. — V.2, N440. — P.440.
- Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations / F. Soldner, J. Laganière, A. Cheng, D. Hockemeyer, Q. Gao, R. Alagappan, V. Khurana, L.I. Golbe, R.H. Myers, S. Lindquist, L. Zhang, D. Guschin, L.K. Fong, B.J. Vu, X. Meng, F.D. Urnov, E.J. Rebar, P.D. Gregory, H.S. Zhang, R. Jaenisch // Cell. — 2011. — V.146, N2. — P.318–331.
- Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts / M. Caiazzo, M.T. Dell'Anno, E. Dvoretzkova, D. Lazarevic, S. Taverna, D. Leo, T.D. Sotnikova, A. Menegon, P. Roncaglia, G. Colciago, G. Russo, P. Carninci, G. Pezzoli, R.R. Gainetdinov, S. Gustincich, A. Dityatev, V. Broccoli // Nature. — 2011. — N476. — P.224–227.
- Анисимов С.В. Клеточная терапия болезни Паркинсона: I. Трансплантация эмбриональной и взрослой ткани / С.В. Анисимов // Успехи геронтологии. — 2008. — №4. — С.575–592.
- Chao Y.X. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates blood brain barrier damage and neuroinflammation and protects dopaminergic neurons against MPTP toxicity in the substantia nigra in a model of Parkinson's disease / Y.X. Chao, B.P. He, S.S. Tay // J. Neuroimmunol. — 2009. — N1–2. — P.39–50.
- Adult bone marrow: which stem cells for cellular therapy protocols in neurodegenerative disorders? / S. Wislet-Gendebien, E. Laudet, V. Neirinckx, B. Rogister // J Biomed Biotechnol. 2012;2012:601560. doi: 10.1155/2012/601560.
- Neurotrophin-3 gene modified mesenchymal stem cells promote remyelination and functional recovery in the demyelinated spinal cord of rats / Y.J. Zhang, W. Zhang, C.G. Lin, Y. Ding, S.F. Huang, J.L. Wu, Y. Li, H. Dong, Y.S. Zeng // J. Neurol. Sci. — 2012. — V.313, N1–2. — P.64–74.
- Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats / L. Wei, J.L. Fraser, Z.Y. Lu, X. Hu, S.P. Yu // Neurobiol. Dis. — 2012. — V.46, N3. — P.635–645.
- Kang E.S. vFate of transplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells following spinal cord injury in rats by transplantation routes / E.S. Kang, K.Y. Ha, Y.H. Kim // J. Korean Med. Sci. — 2012. — N6. — P.586–593.
- Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neuronal perikarya and transporter function from oxidative stress by the secretion of glial-derived neurotrophic factor / A.L. Whone, K. Kemp, M. Sun, A. Wilkins, N.J. Scolding // Brain Res. — 2012. — N1431. — P.86–96.
- Jing Y 3-D spheroid culture of bone marrow mesenchymal stem cell of rhesus monkey with improved multi-differentiation potential to epithelial progenitors and neuron in vitro / Y. Jing, Y. Jian-Xiong // Clin. Experim. Ophthalmol. — 2011. — N8. — P.808–819.
- Allogeneic bone marrow stromal cell transplantation after cerebral hemorrhage achieves cell transdifferentiation and modulates endogenous neurogenesis / L. Otero, M. Zurita, C. Bonilla, C. Aguayo, M.A. Rico, A. Rodriguez, J. Vaquero // Cytotherapy. — 2012. — V.14, N1. — P.34–44.
- Фифкова Е. Стереотасические атласы мозга кошки, кролика и крысы. Приложение / Е. Фифкова, Дж. Маршала // Электрофизиологические методы исследования (рус. перевод) / Я. Буреш, М. Петрань, И. Захар. — М.: Инстр., лит., 1962. — С.384–426.
- Пятикоп В.А. Сравнительная характеристика динамики двигательных нарушений и их сопоставления с морфофункциональными особенностями при экспериментальном паркинсонизме после введения криоконсервированных эмбриональных нервных клеток и нейроиндуцированных in vitro стромальных клеток / В.А. Пятикоп, И.А. Григорова // Укр. вісн. психоневрології. — 2007. — Т.15, вип.1. — С.51–53.

П'ятикоп В.О.¹, Мсаллам М.А.¹, Щегельська О.А.¹, Кутовий І.О.¹, Губіна-Вакулик Г.І.², Горбач Т.В.³

¹ Кафедра нейрохірургії, Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

² Кафедра патологічної анатомії, Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

³ Кафедра медичної та біоорганічної хімії, Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

Порівняльна ефективність внутрішньовенного введення мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку щурам, у яких моделювали паркінсоноподібний синдром

Мета: вивчення ефективності внутрішньовенного введення мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (МСККМ) людини і щурів щурам, у яких моделювали паркінсоноподібний синдром (ПС) шляхом хімічної деструкції чорної речовини (ЧР) на підставі аналізу поведінкових, морфофункціональних та біохімічних показників.

Матеріали і методи. Тварини розподілені на 5 груп: I — інтактні (n=7); II — модель ПС, двобічне введення 6-OHDA у ЧР (n=15); III — модель ПС, внутрішньовенне введення МСККМ людини (в дозі 0,5×10⁶ кл на 1 щура) (n=9); IV — модель ПС, внутрішньовенне введення МСККМ щурів (в дозі 1×10⁶) (n=9); V — модель ПС, внутрішньовенне введення МСККМ щурів (в дозі 2×10⁶) (n=9). Клітини вводили на 14-ту добу після створення моделі ПС. Ефективність внутрішньовенного введення МСККМ оцінювали за ступенем відновлення рухових функцій, зміни рівня дофаміну (ДА) в крові і тканині лобової частки мозку щурів і морфологічними змінами ЧР.

Результати. Внутрішньовенне введення МСККМ людини при ПС сприяло відновленню рухів на 14–15-ту добу, нормалізації рівня ДА в крові та тканині лобової частки на 10-ту добу, збільшенню кількості нейронів в пошкодженій зоні ЧР.

Внутрішньовенне введення МСККМ щурів в дозі 1×10⁶ при ПС малоефективне, часткове відновлення рухів і нормалізацію рівня ДА в крові і тканині лобової частки спостерігали лише на 20–21-шу добу. Внутрішньовенне введення МСККМ щурів в дозі 2×10⁶ при ПС сприяло відновленню рухів на 9–10-ту добу, нормалізації рівня ДА в крові і тканині лобової частки мозку на 10-ту добу, появи активних нейронів у ЧР.

Висновки. Внутрішньовенне введення МСККМ щурів і людини ефективне при лікуванні симптомів ПС у щурів і залежить від кількості введених клітин.

Ключові слова: паркінсоноподібний синдром, мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку, поведінка щурів, морфологічні зміни, рівень дофаміну, експеримент.

Український нейрохірургічний журнал. — 2014. — №2. — С. 55-61.

Надійшла до редакції 11.03.14. Прийнята до публікації 25.04.14.

Адреса для листування: Кутовий Ігор Олександрович, Кафедра нейрохірургії, Харківський національний медичний університет, пр. Леніна, 4, Харків, Україна, 61022, e-mail: kutovoy@ua.fm.

Pyatikop V.A.¹, Msallam M.A.¹, Shchegehlskaya E.A.¹, Kutovoy I.A.¹, Gubina-Vakulik G.I.², Gorbach T.V.³

¹ Department of Neurosurgery, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

² Department of Pathological Anatomy, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

³ Department of Medical and Bioorganic Chemistry, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Comparative efficacy of intravenous injection of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with model of Parkinson-like syndrome

The purpose: to study efficacy of intravenous injection of human and rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSC) in rats with Parkinson-like syndrome (PS), modeled by chemical degradation of substantia nigra (SN).

Materials and methods. Animals were divided into 5 groups: I — intact (n=7); II — PS, bilateral injection of 6-OHDA in SN (n=15); III — PS, intravenous injection of human BMMSC (0.5×10⁶ cells per 1 rat) (n=9); IV — PS, intravenous injection of rat BMMSC (1×10⁶) (n=9); V — PS, intravenous injection of rat BMMSC (2×10⁶) (n=9). Cells were injected 2 weeks after PS modelling. Efficacy of intravenous injection of stem cells was estimated by recovery of movements, changes of dopamine level in blood and brain frontal lobe of the rats and morphological changes of SN.

Results. Intravenous injection of human BMMSC at PS helps to restore movement for 14–15 days, normalize DA level in the blood and tissue of frontal lobe of the rats on the 10th day and increase the number of neurons in damaged SN area.

Intravenous injection of rats BMMSC (in doze 1×10⁶) was inefficient, partial restoration of movement and DA level normalization in the blood and in tissue of frontal lobe was observed only to 20–21 day. Intravenous injection of rat BMMSC (in doze 2×10⁶) at PS helps to restore movement to 9–10 day, normalize DA level in the blood and tissue of frontal lobe on 10th day, active neurons in SA are observed.

Conclusions. Intravenous injections of rat and human BMMSC are effective for treatment of PS symptoms in rats, the results depend on the amount of injected cells.

Key words: Parkinson-like syndrome, bone marrow mesenchymal stem cells, rat behavior, morphological changes, dopamine level, experiment.

Ukr Neyrokhir Zh. 2014; 2: 55-61.

Received, March 11, 2014. Accepted, April 25, 2014.

Address for correspondence: Igor Kutovoy, Department of Neurosurgery, Kharkiv National Medical University, 4 Lenina Ave, Kharkov, Ukraine, 61022, e-mail: kutovoy@ua.fm.