

УДК 616.8-089

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ДИНАМИКУ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В МОДЕЛИ ЧЕРЕПНОМОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У КРЫС

¹Половников Е.В., ¹Цветовский С.Б., ¹Ступак В.В., ¹Васильев И.А., ²Шевела Е.Я.,
²Останин А.А., ²Черных Е.Р.

¹ФГБУ «ННИИТО» Минздрава России 630091, Новосибирск, e-mail: pev37@mail.ru;

²НИИ Клинической иммунологии СО РАМН 630099, Новосибирск, e-mail: ct_lab@mail.ru

Целью настоящего исследования явилось сравнительное исследование влияния трансплантации мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (КМ-МСК) и жировой ткани человека (ЖТ-МСК) на восстановление функциональной активности головного мозга крыс в модели очагового травматического повреждения головного мозга. Для этого сопоставляли динамику корковых соматосенсорных вызванных потенциалов (ССВП) в группах животных со спонтанным восстановлением и на фоне трансплантации КМ-МСК и ЖТ-МСК. Животные контрольной группы, не получившие трансплантации клеток, в первые сутки после травмы характеризовались увеличением времени латентности и выраженным снижением амплитуды ССВП с минимальной позитивной динамикой восстановления этих параметров к 21 суткам. В группах животных, которым КМ-МСК или ЖТ-МСК вводили на 1-е сутки после повреждения, средние значения амплитуды ССВП достоверно увеличивались к 21-ым суткам по сравнению с контролем. При введении клеток на 7-е сутки возрастание амплитуды ССВП на фоне введения ЖТ-МСК было статистически значимым, тогда как при введении КМ-МСК было менее выраженным и проявлялось в виде тенденции. Показатели латентности ССВП в этих группах достоверно снижались к этому сроку. Таким образом, трансплантация КМ-МСК или ЖТ-МСК крысам в модели очагового повреждения головного мозга сопровождалась более эффективным восстановлением электрофизиологической активности коры головного мозга.

Ключевые слова: очаговое повреждение головного мозга, соматосенсорные вызванные потенциалы, мезенхимальные стромальные клетки, костный мозг, жировая ткань

ELECTROPHYSIOLOGICAL FUNCTIONAL RECOVERY IN A RAT MODEL OF TRAUMATIC BRAIN INJURY FOLLOWING MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION

¹Polovnikov E.V., ¹Tsvetovsky S.B., ¹Stupak V.V., ¹Vasiliev I.A., ²Shevela E.Y.,
²Ostanin A.A., ²Chernykh E.R.

¹Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, e-mail: pev37@mail.ru;

²Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk, e-mail: ct_lab@mail.ru

The aim of this study was to elucidate the impact of transplantation of mesenchymal stromal cells obtained from bone marrow (BM-MSC) or adipose tissue (AT-MSC) on restoration of injured brain at different time points after injury, as well as compare the efficacy of these cells. For this, we compared the dynamic of cortical somatosensory evoked potentials (SSEP) in a model of focal brain damage caused by traumatic brain injury, during spontaneous recovery and under BM-MSC/AT-MSC transplantation. The animals in control group who did not receive cell therapy showed an increase in latency and a pronounced decrease in the amplitude of SSEP at first day after injury with minimal recovery during 21 d follow-up. In animals treated with BM-MSCs or AT-MSCs on the 1st day after trauma the average amplitude value of SSEP was significantly increased to 21st day in comparison with the control group. When cells were administered at day 7 following trauma, increase in the SSEP amplitude was statistically significant for AT-MSC, whereas effect of BM-MSC was less pronounced and manifested as a trend. SSEP latency in these groups was significantly decreased at 21 d. Thus, the transplantation of BM-MSCs or AT-MSC enhanced the recovery of electrophysiological activity of the cortex in rat model of focal brain injury with the same efficiency.

Keywords: brain injury in rats, somatosensory evoked potentials, transplantation of mesenchymal stromal cells, bone marrow, adipose tissue

Поиск новых подходов к лечению черепно-мозговой травмы является одной из насущных задач современной нейрохирургии. В этом аспекте большой интерес представляют клеточные технологии, среди которых наибольшие перспективы связывают с использованием мезенхимальных стромальных клеток (МСК). В ряде работ была продемонстрирована способность данного типа клеток улучшать неврологическое восстановление в моделях черепно-мозговой травмы у экспериментальных

животных [4, 5, 6, 7]. Позитивный эффект МСК связывают с продукцией широкого спектра ростовых и трофических факторов, способных активировать нейрональные предшественники и ангиогенез, стимулировать процессы нейрорепарации и ускорять проведение нервных импульсов через синапсы, а также подавлять воспаление и апоптоз нервных клеток в очаге повреждения [2, 8, 9]. Кроме того, не исключается возможность миграции МСК в ткани поврежденного головного мозга с

последующей дифференцировкой в нейрональном направлении [2, 10].

Традиционно в качестве источника МСК используется костный мозг, однако в последнее время большой интерес представляют МСК, полученные из жировой ткани. Сравнительный анализ МСК различного тканевого происхождения свидетельствует о существовании определенных различий в свойствах МСК, выделенных из разных тканей [3]. Подобные данные имеют не только фундаментальное значение, но также важны при выборе оптимального источника МСК для клинического использования. Однако в доступной литературе практически не освещен вопрос о сравнительной эффективности костномозговых МСК и МСК, выделенных из жировой ткани. Проведенные нами ранее исследования показали, что КМ-МСК и ЖТ-МСК оказывали схожий стимулирующий эффект на неврологическое восстановление в модели очагового повреждения головного мозга [4]. При этом оставалось неясным, насколько выявленное улучшение моторных функций связано с нормализацией функциональной (электрофизиологической) активности головного мозга и одинаков ли эффект КМ-МСК и ЖТ-МСК в этом аспекте.

Цель исследования: оценка динамики показателей ССВП в модели очагового повреждения головного мозга на фоне спонтанного восстановления и трансплантации КМ-МСК и ЖТ-МСК.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на крысах линии Вистар (обоего пола; средняя масса 250–270 г.), с соблюдением этических норм, регламентированных приказом МЗ РФ №266 от 19.03.2003 г. Операции по моделированию очаговых повреждений головного мозга проводили в соответствии с патентом [5]. Животные в пред- и послеоперационном периоде содержались в условиях вивария Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии. МСК костного мозга и жировой ткани получали согласно описанной ранее методике [3].

В ходе исследования были сформированы 6 групп животных, включая две контрольные и четыре опытные группы. Контрольные группы: 1-я – животные с трепанацией, но без нанесения травмы ($n = 3$), 2-я – «хирургический контроль» (с нанесением травмы, но без введения клеток; $n = 6$). Животным опытных групп после формирования очагового повреждения вводили клетки (1×10^6 на животное; через хвостовую вену): 3-я группа – введение КМ-МСК на 1-е сутки ($n = 8$), 4-я – введение ЖТ-МСК на 1-е сутки ($n = 8$), 5-я – введение КМ-МСК на 7-е сутки ($n = 8$), 6-я – введение ЖТ-МСК на 7-е сутки ($n = 8$). Для объективной инструментальной оценки функционального состояния мозга при травме одного из полушарий и оценки динамики состояния в ходе лечения с применением каждого из видов клеточной терапии регистрировались корковые соматосенсорные вызванные

потенциалы (ССВП) на стимуляцию нервов передних конечностей с помощью электромиографа «Нейропак-2» (Nihon Kohden Corp., Япония) [1, 9]. Оценка нейрофизиологических показателей включала измерение амплитуды пиков (в мкВ) и латентность (в мс) компонентов ССВП.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Для оценки достоверности различий использовали критерий Манна-Уитни (для сравнения непрерывных переменных). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Регистрация ССВП интактного головного мозга крыс (до проведения трепанации) показала, что величина амплитуды ССВП составляла в среднем $13,5 \pm 0,81$ мкВ, задержка основного негативного компонента – $8,7 \pm 0,14$ мс. При этом межполушарные различия амплитуд и показателей латентности компонентов ССВП не превышали 10%.

У животных контрольной группы 1 (с трепанацией) значения амплитуд и латентности компонентов ССВП во все сроки наблюдения не отличались от таковых у интактных животных, как на интактной стороне, так и на стороне трепанации. Эти данные указывают на то, что процедура трепанации не вызывает нарушений электрофизиологической активности головного мозга, по данным ССВП. У животных контрольной группы 2 в первые сутки после травмы регистрировалось снижение величины амплитуды ССВП на стороне повреждения в 2–5 раз. Восстановление данного показателя в динамике было крайне незначительным, и к 21 суткам величина амплитуды составляла лишь 30% от исходного уровня. Наряду с этим в этой группе отмечалось статистически значимое возрастание латентности компонентов ССВП, которое регистрировалось на всех сроках наблюдения. Выявленные изменения показателей ССВП регистрировались только на стороне повреждения и отсутствовали в интактном полушарии, поэтому в последующих таблицах (начиная с табл. 2) опущены результаты измерения параметров ССВП для интактной стороны и представлены данные только для стороны повреждения.

Анализ влияния клеточной терапии на показатели ССВП у животных с очаговым повреждением головного мозга показал, что введение МСК в первые сутки после травмы сопровождалось достоверным увеличением амплитуды ССВП на всех сроках наблюдения (7-ые, 14-ые и 21-ые сутки). При этом значения амплитуды в каждой точке наблюдения двукратно превышали

таковые в контрольной группе 2. Значения другого регистрируемого показателя ССВП – латентности – в первые две недели после введения МСК не отличались от контроля. Однако при регистрации ССВП на 21-ые сутки величина латентного периода у животных, получивших клетки, была значимо более низкой. Сравнительный анализ результатов введения МСК, полученных из костного мозга и жировой ткани, показал, что эффекты КМ- и Ж-МСК, вводимых в

первые сутки после травмы, достоверно не различались. Таким образом, введение клеток в раннем посттравматическом периоде сопровождается более быстрым восстановлением электрофизиологических показателей, при этом амплитуда ССВП восстанавливается на 56%, латентность – на 66% от исходного уровня. Однако полного восстановления электрофизиологической активности головного мозга к 21-ым суткам не происходит.

Таблица 1

Значения амплитуд ССВП (мкВ) и латентности ССВП (мс) в контрольных группах

Группы животных	Сторона регистрации	Латентность (мс)			
		1 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Группа 1 (трепанация)	Интактная	9,1 ± 0,4	8,9 ± 0,2	9,0 ± 0,2	9,1 ± 0,2
	Сторона трепанации	9,0 ± 0,3	8,8 ± 0,4	7,9 ± 0,6	8,0 ± 0,8
Группа 2 (травма)	Интактная	9,0 ± 0,2	8,9 ± 0,3	8,0 ± 0,5	8,0 ± 0,6
	Сторона повреждения	11,7 ± 0,3*#	10,9 ± 0,4*#	9,8 ± 0,9*#	10,9 ± 0,3*#
Амплитуда (мкВ)					
Группа 1 (трепанация)	Интактная	15,4 ± 0,6	15,4 ± 0,6	15,3 ± 0,6	15,4 ± 0,6
	Сторона трепанации	15,3 ± 0,3	15,2 ± 0,2	15,3 ± 0,3	15,3 ± 0,3
Группа 2 (травма)	Интактная	15,2 ± 0,2	15,1 ± 0,2	15,2 ± 0,2	15,3 ± 0,3
	Сторона повреждения	2,9 ± 0,1*#	3,8 ± 0,3*#	3,7 ± 0,4*#	4,9 ± 0,9*#

Примечание:

* – достоверность различий с интактными животными, # – достоверность различий с интактной стороной ($p < 0,01$).

Таблица 2

Значения амплитуд (мкВ) и латентности (мс) ССВП на стороне повреждения после введения клеток на 1-ые сутки после травмы

Группы животных	Показатели ССВП	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Группа 2 (без введения клеток)	Амплитуда	3,8 ± 0,3	3,7 ± 0,4	4,9 ± 0,9
	Латентность	10,9 ± 0,4	9,8 ± 0,9	10,9 ± 0,3
Введение клеток (группы 3 и 4)	Амплитуда	5,65 ± 0,5*	6,8 ± 0,7**	8,6 ± 0,8**
	Латентность	10,3 ± 0,4	10,4 ± 0,6 ^{0,1}	10,1 ± 0,6*
Группа 3 (КМ-МСК)	Амплитуда	5,9 ± 1,0*	7,4 ± 1,4*	9,8 ± 1,3**
	Латентность	10,8 ± 0,8	10,8 ± 1,1	10,5 ± 1,2*
Группа 4 (ЖТ-МСК)	Амплитуда	5,3 ± 0,4*	6,2 ± 0,5**	7,3 ± 0,6*
	Латентность	9,8 ± 0,4*	9,8 ± 0,7	9,7 ± 0,3*

Примечание:

*, ** – достоверность различий по сравнению с контролем (группа 2) ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно).

У животных 5-ой и 6-ой групп, которым клетки вводили на седьмой день после травмы, наблюдалось постепенное увеличение амплитуды ССВП - более чем

в 1,5 раза, достигающее статистической значимости на 21-ые сутки. Кроме того, к этим же суткам регистрируется достоверное уменьшение латентности компонентов

ССВП. И хотя эффекты КМ- и ЖТ-МСК, вводимых на седьмые сутки после травмы, достоверно не различались, использование ЖТ-МСК оказывало более выраженный позитивный эффект на величину амплитуды ССВП. Следует отметить, что, как и

при раннем введении, введение клеток на седьмые сутки после травмы, оказывая несомненный позитивный эффект на восстановление электрофизиологической активности мозга, тем не менее не приводит к ее полной нормализации.

Таблица 3

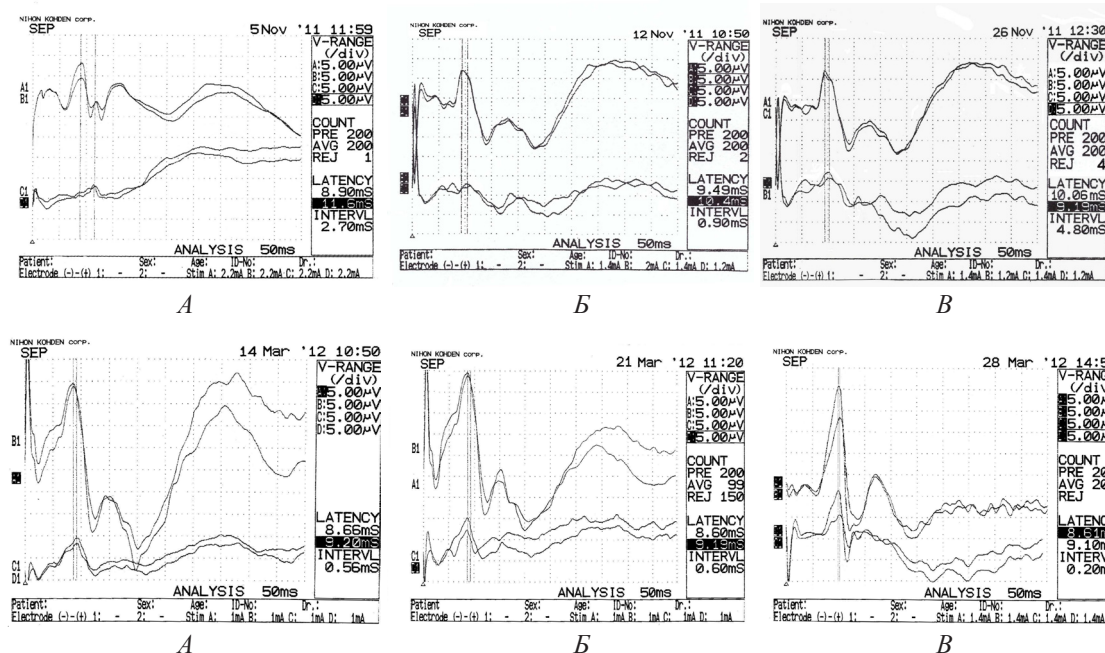
Значения амплитуд ССВП (мкВ) и латентности ССВП (мс) на стороне повреждения после введения клеток на 7-ые сутки

Группы животных	Показатели ССВП	14 сутки	21 сутки
Группа 2 (без введения клеток)	Амплитуда	$3,7 \pm 0,4$	$4,9 \pm 0,9$
	Латентность	$9,8 \pm 0,9$	$10,9 \pm 0,3$
Введение клеток (группы 5 и 6)	Амплитуда	$6,7 \pm 0,9$	$7,7 \pm 0,7^*$
	Латентность	$10,9 \pm 0,4$	$10,1 \pm 0,3$
Группа 5 (КМ-МСК)	Амплитуда	$5,1 \pm 0,9$	$6,4 \pm 1,0$
	Латентность	$10,6 \pm 0,5$	$10,0 \pm 0,5$
Группа 6 (ЖТ-МСК)	Амплитуда	$5,9 \pm 1,2$	$8,3 \pm 1,3^*$
	Латентность	$11,2 \pm 0,6$	$10,3 \pm 0,2$

Примечание: * – достоверные различия по сравнению с контролем (группа 2) ($p < 0,05$).

В качестве примера на рисунке представлены данные регистрации ССВП в динамике при спонтанном восстановлении (у

животных контрольной группы 2) и после введения КМ-МСК в первые сутки после травмы (у животных группы 3).



Динамика изменений ССВП в разные сроки после травмы у животных контрольной группы 2 (верхний ряд) и опытной группы 3 (нижний ряд). Верхний ряд: А – 1-ые сутки после травмы; Б – 7-ые сутки; В – 21-ые сутки. Нижний ряд: А – 7-ые сутки после травмы; Б – 14-ые сутки; В – 21-ые сутки

Суммируя представленные данные, можно заключить, что использование МСК в терапии очаговых повреждений головного мозга с целью улучшения неврологического восстановления оказывает позитивный

эффект на электрофизиологическую активность головного мозга лабораторного животного. Характерно, что при раннем введении клеток стимулирующий эффект КМ-МСК и ЖТ-МСК был сходным, тогда как при позд-

нем введении ЖТ-МСК оказали более выраженный эффект. И хотя трансплантация МСК не обеспечивает полной коррекции электрофизиологических показателей, восстановление ССВП на фоне введения МСК протекает более эффективно по сравнению со спонтанным восстановлением.

Заключение

Моделирование очагового повреждения головного мозга, обусловленного черепно-мозговой травмой, сопряжено с изменением электрофизиологической активности головного мозга у экспериментальных животных. Применение клеточной терапии оказывает позитивное влияние на динамику восстановления функционального состояния коры головного мозга в данной модели. Использование ССВП является информативным и объективным способом оценки эффективности клеточной терапии.

Список литературы

1. Гнездицкий В.В. Вызванные потенциалы мозга в клинической практике / В.В. Гнездицкий. – Таганрог: Издательство ТРТУ, 1997. – 252 с.
2. Григорян А.С. Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на развитие посттравматических процессов в головном мозге крыс // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук.
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. Половников Е.В., Ступак В.В., Самохин А.Г., Васильев И.А., Добрякова О.Б., Шевела Е.Я., Черных Е.Р. Влияние мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и жировой ткани человека на эффективность восстановления неврологического дефицита в модели черепно-мозговой травмы у крыс. – Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 3 (85) часть 2. – 301 с.
5. Патент РФ № 2486602, 27.06.2013.
6. Соколова И.Б. Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте / И.Б. Соколова, Н.Н. Зинькова, А.А. Билибина, П.В. Кругляков, Е.Г. Гилерович, Д.Г. Польшцев, В.А. Отеллин // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 11, № 4. – С. 54–62.
7. Южаков В.В., Конопляников А.Г., Цыб А.Ф., Рoshal Л.М., Сушкевич Г.Н. и др. Действие аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на репаративные процессы в нервной ткани при диффузной травме головного мозга крыс // Тез. докл. Всероссийской и международной научной конференции «Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении», Москва (30–31 мая 2007 г.).
8. Borlongan C.V. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke / C.V. Borlongan, M. Hadman, C.D. Sanberg, P.R. Sanberg // Stroke. – 2004. – Vol. 35. – P. 2385–2389.

9. Chen J. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats / J. Chen, Y. Li, L. Wang, Z. Zhang, D. Lu, M. Lu, M. Chopp // Stroke. – 2001. – Vol. 32. – P. 1005–1011.

10. Sykova E. Magnetic Resonance Tracking of Transplanted Stem Cells in Rat Brain and Spinal Cord / E. Sykova, P. Jendelova // Ann NY Acad Sci. – 2005. – Vol. 1049. – P. 146–160.

References

1. Gnezditsky V.V. Evoked potentials of the brain in clinical practice / V.V. Gnezditsky. – Taganrog: Publisher TSURE, 1997. 252 p.
2. Grigoryan A.S. Effect of transplantation of mesenchymal stem cells in the development of post-traumatic processes in the brain of rats // dissertation Author's abstract on scientific degree of candidate of biological sciences.
3. Ostanin A.A., Petrovsky J.L., Shevela E.Y., Chernykh E.R. The multiplex analysis of cytokines, chemokines, growth factors, MMP-9 and TIMP-1 is produced by mesenchymal stromal cells of bone marrow, adipose tissue and human placenta // Cell Technology in Biology and Medicine. 2011. no. 1. pp. 29–38.
4. Polovnikov E.V., Stupak V.V., Samokhin A.G., Vasiliev I.A., Dobryakova O.B., Shevela E. Y., Chernykh E.R. 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. – Bulletin ESSC SB RAMS 2012. no. 3 (85) Part 2. 301 p.
5. Patent RF no. 2486602, 27.06.2013.
6. Sokolova I.B. The possibility of using stem cell therapy in the treatment of ischemic stroke in-sky experiment / I.B. Sokolova, N.N. Zin'kova, A.A. Bilibina, P.V. Kruglyarov, E.G. Gilerovich, D.G. Polyntsev, V.A. Otellin // cell transplantation and TCA-nevaya Engineering. 2007. Vol. 11, no. 4. pp. 54–62.
7. Yuzhakov V.V., Konoplyannikov A.G., Tsyb A.F., Roshal L.M., Sushkevich G.N. and others. Action autologous mesenchymal stem cells on reparative processes in the nervous tissue in diffuse brain injury in rats // Proc. of reports. National and international scientific conference «Stem cells and their potential use in health care», Moscow (30–31 May 2007).
8. Borlongan C.V. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke / C.V. Borlongan, M. Hadman, C.D. Sanberg, P.R. Sanberg // Stroke. 2004. Vol. 35. pp. 2385–2389.
9. Chen J. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats / J. Chen, Y. Li, L. Wang, Z. Zhang, D. Lu, M. Lu, M. Chopp // Stroke. 2001. Vol. 32. pp. 1005–1011.
10. Sykova E. Magnetic Resonance Tracking of Transplanted Stem Cells in Rat Brain and Spinal Cord / E. Sykova, P. Jendelova // Ann NY Acad Sci. 2005. Vol. 1049. pp. 146–160.

Рецензенты:

Труфакин С.В., д.м.н., заведующий Отделением лучевой диагностики клиники иммунопатологии, ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН г. Новосибирск;

Повещенко А.Ф., д.м.н., заведующий Лабораторией физиологии протективной системы, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 07.08.2014.