

УДК 576.3/.7.086.83:616-089.811-092.9

В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, Б.Б. Ивнев, Р.М. Радык

*ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака
НАМН Украины», г. Донецк*

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДВИГАТЕЛЬНЫХ И КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ У КРЫС ПОСЛЕ ФОКАЛЬНОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Проведен анализ результатов комплексного экспериментального исследования воздействия мезенхимальных стволовых клеток на восстановление неврологических функций у крыс линии Вистар–Киото после моделирования острой фокальной ишемии. Исследование проведено на 45 здоровых крысах-самках инбредной линии Вистар–Киото. Клеточный материал вводили в день моделирования ишемии. Животные были разделены на пять групп: две группы клеточной терапии с интравентрикулярным и парентеральным введением клеточного материала; две группы с интравентрикулярным и парентеральным введением плацебо, ложнооперированные животные. Показано, что восстановление когнитивных функций происходит уже на вторую неделю наблюдений в группах клеточной терапии, тогда как в группах без введения клеток статистически достоверного улучшения не наступало. Также в группах клеточной терапии выявлено существенное снижение показателей смертности животных.

Ключевые слова: *фокальная ишемия, мезенхимальные стволовые клетки.*

Ишемический инсульт является наиболее часто встречаемым синдромом в общей структуре цереброваскулярной патологии. По данным международных мультицентровых исследований, удельный вес ишемических поражений головного мозга составляет 80–85 % от всех мозговых инсультов. По данным ВОЗ, ежегодно от цереброваскулярных заболеваний умирают около 5 млн человек.

В связи с высоким уровнем летальности, значительной инвалидизацией и социальной дезадаптацией пациентов особое значение приобретает церебральный ишемический инсульт. В развитых странах заболеваемость инсультом составляет 2900 случаев (500 преходящих нарушений мозгового кровообращения и 2400 инсультов) на 1 млн населения в год; при этом 75 % инсультов являются первыми в жизни. Заболеваемость инсультом в возрасте старше 55 лет удваивается с каждым десятилетием жизни. Около 80 % больных, перенесших инсульт, становятся инвалидами, из них у 10 % пациентов состояние здоровья расценивается как тяжелое, что определяет постоянную постороннюю помощь. Данный факт показывает

большую экономическую значимость и заинтересованность научных сообществ и социальных служб в решении проблемы церебральных инсультов [1].

На данный момент коррекция патохимического каскада, вызванного ишемическим инсультом, включает реперфузионную и нейропротекторную терапию. Клинический успех этих лечебных мероприятий зависит от срока давности наступления острой ишемии, объема поражения ткани головного мозга, анатомии кровоснабжения ишемизированной области у конкретного пациента, пластичности мозга [2] и особенностей ответа на лекарственную терапию. Три последних пункта зависят от индивидуальных особенностей организма пациентов, поэтому терапевтический эффект у разных пациентов при прочих равных условиях различается.

В условиях постоянно развивающейся современной медицины появилось новое направление лечения ишемического инсульта, такое как клеточная терапия. Данный метод лечения является хирургическим и относится к трансплантологии. Концепция этого метода заключается в наличии у ство-

© В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, Б.Б. Ивнев, Р.М. Радык, 2011

ловых клеток, с определенной квазипотентностью и стволовостью, репаративного и нейропротекторного эффектов на головной мозг в условиях патологического процесса при их трансплантации [3].

Материал и методы. Исследование проведено на 45 здоровых крысах-самках инбредной линии Вистар–Киото массой 180–220 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария по 4 особи в клетке со свободным доступом к пище и воде и постоянным светотемновым режимом согласно «Принципам ухода за лабораторными животными». В течение 7 суток перед началом исследования животные были адаптированы к условиям лаборатории и персоналу.

Все мероприятия с использованием животных проводились в соответствии с положениями международных принципов гуманного обращения с животными, изложенными в «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (NIH publ. No. 93-23, revised 1985). Животных выводили из эксперимента путем декапитации после предварительной наркотизации.

Все особи, вошедшие в исследование, были разделены на пять групп: I — 5 животных, которым была произведена трепанация черепа без других хирургических манипуляций; IIА — 10 особей, которым была произведена трепанация черепа с последующей окклюзией средней мозговой артерии (СМАо) и внутривенным введением 100 мкл 0,9 % NaCl; IIВ — 10 особей, которым была произведена трепанация черепа с последующей СМАо и внутрижелудочковым введением 10 мкл 0,9 % NaCl; IIIА — 10 крыс, которым производилась внутривенная инъекция 5 млн ММСК в 100 мкл; IIIВ 10 крыс, которым производилась интравентрикулярная инъекция 500 тыс. ММСК в 10 мкл; IV — 45 интактных животных.

Первая группа животных была набрана для исключения влияния посторонних факторов на чистоту получаемых результатов и максимального ограничения изучаемого

воздействия. Исходя из этих соображений, животным I группы была произведена хирургическая операция в таком объеме: наркотизация (раствор кетамина 125 мг/кг), доступ (разрез произведен от латерального края глазницы до ушной раковины, разво-дились мышцы, обнажалось овальное отверстие тройничного нерва, которое было расширено до размера примерно 4×4 мм с помощью бормашины), вскрытие твердой мозговой оболочки. Операционная рана послойно ушита [4].

У животных II и III групп смоделировано состояние острой фокальной ишемии путем окклюзии средней мозговой артерии (СМАо) [5]. После СМАо животные I, II и III групп были тестированы для исследования поведенческого статуса: водный лабиринт Морриса [6], «открытое поле», тест «на избегание», тест «на предпочтительное использование конечности».

Животных I, II и III групп тестировали за 5 дней до начала эксперимента, а также на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки после операции. Животные выводились из эксперимента на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки соответственно.

Результаты и их обсуждение. До начала исследования все особи, включенные в эксперимент, были подвергнуты предварительному тестированию и составили IV экспериментальную группу. Параметры, полученные в ходе предварительного тестирования, были приняты за нормальные, а показатели следующих фаз эксперимента сравнивались с ними. В тесте «открытое поле» оценивали количество пересеченных квадратов исследуемым животным (табл. 1) и количество стоек (табл. 2).

Анализ данных, полученных в ходе тестирования группы I в открытом поле показал, что, исследуя такой параметр, как количество пересеченных квадратов, по контрольным временным промежуткам 3-и, 7-е, 14-е, 21-е, 28-е сутки не обнаружено статистически значимого различия ($p=0,438$). Эти результаты позволяют предположить,

Таблица 1. Количество пересеченных квадратов в тесте «открытое поле»

Группа	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
I	96,000±2,642	101,000±2,195	103,500±3,624	98,670±7,468	104,300±6,741
IIА	23,00±2,81	27,500±3,036	19,000±3,254	20,250±2,027	30,000±2,394
IIВ	19,00±1,76	16,500±2,244	22,00±2,33	20,000±2,093	18,830±2,344
IIIА	22,000±2,226	47,000±4,565	98,500±3,684	98,670±3,955	103,00±10,82
IIIВ	20,000±2,279	40,000±3,308	92,000±3,107	100,20±3,41	105,000±7,506
IV				103,900±1,078	

Таблица 2. Количество стоек в тесте «открытое поле»

Группа	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
I	6,0000±0,5719	6,5000±0,5222	6,0000±0,7169	5,500±1,152	6,000±1,914
IIA	1,0000±0,2243	1,000±0,392	1,0000±0,3942	1,0000±0,4959	2,500±0,993
IIB	1,0000±0,2036	1,000±0,277	1,0000±0,4195	1,0000±0,3604	1,0000±0,4576
IIIA	1,0000±0,2007	3,0000±0,3062	5,0000±0,4509	5,0000±0,8813	6,000±1,105
IIIB	1,0000±0,2166	2,0000±0,3228	4,5000±0,4695	4,5000±0,5031	5,0000±0,8355
IV				5,0000±0,1924	

что трепанация черепа в своем объеме не оказывает такого эффекта, который мог бы значительно повлиять на изменения неврологического статуса животных и условно сравнивать СМАо у животных с классическим эндогенным ишемическим инсультом.

Результаты теста «на предпочтительное использование конечности» показывают, что животные группы II не вернулись к использованию правой конечности при приеме пищи (табл. 3). Большинство животных III группы использовали правую конечность уже на 21-е сутки. К концу наблюдения все животные III группы использовали правую конечность при приеме пищи.

в группах IIIA и IIIB (табл. 4). Смертность животных в группах с интравентрикулярными инъекциями немного выше, чем в группах с внутривенным введением как клеточного материала, так и плацебо, и была максимальной на 3-и и 7-е сутки после СМАо.

Выводы

Уровень регресса неврологического дефицита крыс линии Вистар–Киото после экспериментальной фокальной ишемии в широком временном спектре с использованием мезенхимальных стволовых клеток свидетельствует о наличии значительного

Таблица 3. Показатель использования правой конечности в тесте «на предпочтительное использование конечности», %

Группа	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
I	80	75	75	66,6	100
II (A, B)	20	10	25	25	25
III (A, B)	20	20	45	75	100
IV	84	84	84	84	84

Таблица 4. Распределение показателей гибели животных по основным временным промежуткам

Группа	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки	Всего, %	
						в подгруппе	в группе
I	0	0	0	0	0	–	–
IIA	3	1	0	0	0	40	55
IIB	4	2	1	0	0	70	
IIIA	1	0	0	0	0	12,5	18,75
IIIB	2	0	0	0	0	25	

Остальные блоки неврологических тестов, примененных в исследовании, соответствуют основным тенденциям восстановления неврологических функций после фокальной ишемии по основным временным промежуткам.

Показатели смерти животных в группах IIA и IIB достоверно отличаются от таковых

положительного эффекта трансплантации данного вида клеточного материала. По данным неврологического тестирования по всем исследуемым параметрам выявлено, что восстановление неврологических функций у крыс групп IIIA и IIIB наблюдается уже на 7-е сутки и достоверно отличается от показателей тестирования на 3-и сутки

после СМАо. При проведенні тестирования на 14–28-е сутки у крыс групп ПА и ПВ не выявлено статистически различимого отличия от показателей группы контроля. В группах ПА и ПВ восстановления когнитивных функций не произошло до окончания наблюдений.

Результаты большинства блоков тестирования показали, что уровень восстановле-

ния неврологических функций при интравентрикулярном и внутривенном пути введения статистически значимо не различается. Более предпочтительным все же считается интравентрикулярный путь введения, так как является более селективным и объем введения клеточного материала значительно меньше, чем при внутривенной трансплантации.

Список литературы

1. Human stem cell therapy in ischaemic stroke: a review / S. Banerjee, D. Williamson, N. Habib [et al.] // Oxford Journals. — 2011. — Iss. 1. — P. 7–13.
2. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat / Kunlin Jin, Manabu Minami, Jing Q. Lan [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — V. 98 (8). — P. 4710–4715.
3. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia / R. L. Zhang, Z. G. Zhang, L. Zhang [et al.] // Neuroscience. — 2006. — V. 105. — P. 33–41.
4. Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. / S. Brint, M. Jacewicz, M. Kiessling [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2006. — V. 8. — P. 74–85.
5. Зинькова Н. Н. Терапия ишемического инсульта головного мозга у крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток / Н. Н. Зинькова, Е. Г. Гилерович, И. Б. Соколова // Цитология. — 2007. — Т. 7, № 49. — С. 566–575.
6. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat / R. Morris // J. Neurosci. Methods. — 2006. — V. 11. — P. 47–60.

В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, В.В. Івнєв, Р.М. Радик

ВІДНОВЛЕННЯ РУХОВИХ ТА КОГНІТИВНИХ ФУНКЦІЙ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПІСЛЯ ФОКАЛЬНОЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Проведено аналіз результатів комплексного експериментального дослідження впливу мезенхімальних стовбурових клітин на відновлення неврологічних функцій у щурів лінії Вістар-Кіото після моделювання гострої фокальної ішемії. Дослідження проведено на 45 здорових щурах-самцях інбредної лінії Вістар-Кіото. Клітинний матеріал вводили в день моделювання ішемії. Тварин було розподілено на п'ять груп: дві групи клітинної терапії з інтравентрикулярним та парентеральним введенням клітинного матеріалу; дві групи з інтравентрикулярним та парентеральним введенням плацебо, хібнооперовані тварини. Показано, що відновлення когнітивних функцій відбувається вже на другий тиждень спостереження у групах клітинної терапії, тоді як у групах без введення клітин статистично вірогідного покращання не було. Також у групах клітинної терапії виявлено суттєве зниження показників смертності тварин.

Ключові слова: фокальна ішемія, мезенхімальні стовбурові клітини.

V.K. Grin, A.G. Popandopulo, V.V. Ivnev, R.M. Raduk

NEUROLOGICAL FUNCTIONS RECOVERY AT RATS AFTER FOCAL EXPERIMENTAL ISCHEMIA BY MESENCHYMAL STEM CELLS TRANSPLANTATION

The analysis of results of complex experimental research of mesenchymal stem cells influence on neurological functions recovery of rats of Wistar-Kioto line after modeling acute focal ischemia has been made. The research has been performed on 45 healthy female rats of Wistar-Kioto inbreeding line. The cell material deliver on the day of ischemia modeling. The animals were divided in 5 groups: cell therapy groups with intraventricular and parenteral cell material delivery; groups with intraventricular and parenteral placebo delivery (PIA and PIB) and group of false-operated animals. It was shown, that the recovery of cognitive functions takes place already on the second week of observations in the cell therapy groups, whereas in the groups without cell delivery there was no statistically significant improvement. The considerable reduction of rate of mortality of animals is also observed in the cell therapy groups.

Key words: focal ischemia, mesenchymal stem cells.