

В. А. Пятиков, И. А. Григорова

Харьковский государственный медицинский университет (г. Харьков)

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИНАМИКИ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ И ИХ СОПОСТАВЛЕНИЯ С МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ОСОБЕННОСТЯМИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРКИНСОНИЗМЕ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ И НЕЙРОИНДУЦИРОВАННЫХ IN VITRO СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Паркинсонизм впервые был описан в 1817 г. английским врачом Джеймсом Паркинсоном (он назвал его «дрожательный паралич») и является одним из самых распространенных нейродегенеративных расстройств. По данным ООН, паркинсонизмом страдают 4 млн жителей Земли.

Как следует из первоначального названия болезни, ее характерными симптомами служат двигательные расстройства: тремор пальцев рук, нижней челюсти и языка, головы и век, замедленность и обеднение рисунка движений, скованность в конечностях и туловище, затруднение в начале движения и при остановке, нарушение координации и др. У некоторых больных возникают проблемы с речью, сном, мочеиспусканием. Причиной этому является нарастающий дефицит дофамина (ДА), возникающий вследствие дегенерации компактной части черной субстанции.

Тяжесть паркинсонизма коррелирует с темпом и степенью процесса гибели нейронов. Вместе с тем, полагают, что количество дофамина в полосатом теле уменьшается на 70—90 %, и гибнет 60—80 % нейронов черной субстанции еще до появления симптомов заболевания [1—3].

В основе принципов консервативной терапии паркинсонизма лежит восстановление дефицита дофамина, которое достигается применением дофасодержащих препаратов, агонистов дофамина, холинолитиков и других медикаментов, способствующих восстановлению равновесия между дофаминовой и ацетилхолиновой системами. Продолжительный прием больших доз противопаркинсонических средств приводит к снижению их эффективности и развитию дискинезий. В этих случаях показаны стереотаксические операции деструкции патологических корково-подкорковых связей или селективной высокочастотной электростимуляции базальных ганглиев, что приводит к регрессу тремора и ригидности мышц у больных П. Однако, указанные вмешательства носят симптоматический характер и их эффективность исчисляется 3—5 годами. В последние годы в литературе, посвященной экспериментальному паркинсонизму (ЭП), все чаще встречаются публикации о патогенетическом подходе в коррекции двигательных проявлений паркинсонизма с помощью применения клеточной терапии — введения эмбриональных и стромальных стволовых клеток [4, 5].

Настоящая работа является фрагментом научно-исследовательской работы Харьковского государственного медицинского университета «Нейротрансплантация в лечении экстрапирамидных расстройств, спинальных и церебральных травм и инсультов» государственной регистрационный номер 0105U002758 на 2005—2007 гг.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния клеточных суспензий на динамику двигательных расстройств при ЭП в сопоставлении с гистоморфологическими изменениями в различные сроки после введения клеток.

Исследование выполнено на 30 беспородных крысах-самцах, средней массой 250—300 г. Эксперименты на животных были проведены в соответствии с правилами «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в научных целях» (Страсбург, 1985 г.). Для моделирования двигательных нарушений подкоркового типа при ЭП был использован метод двусторонней стереотаксической деструкции черной субстанции (substantia nigra, SN) у крыс, описанный нами ранее [6]. Расстройства движений начинали появляться в течение первых суток после операции.

Все животные были разделены на 3 группы: I — контрольная группа животных с двусторонней деструкцией SN ( $N = 6$ ); II — группа животных с двусторонней деструкцией SN и последующим введением криоконсервированных эмбриональных нервных клеток (ЭНК) ( $N = 12$ ); III — группа животных с двусторонней деструкцией SN и последующим введением клеток стромы костного мозга (КСКМ), индуцированных в нейробласты ( $N = 12$ ).

ЭНК получали из эмбрионов крыс в сроки гестации 17—19 суток, которые подвергали программному замораживанию, позволяющему сохранить живыми до 85 % клеток [7].

КСКМ получали из бедренной кости крыс по методике, описанной нами ранее, и индуцировали их в нейробласты [8]. Для маркировки нейроиндуцированных стромальных клеток использовали специальный, проникающий в клетку маркер [9].

Введение клеточных суспензий животным II и III групп проводили на 1-е и 8-е сутки (по 6 животных в каждой подгруппе) после моделирования ЭП.

После моделирования ЭП появлялись различные нарушения движений, которые проявлялись у разных животных и с различной степенью выраженности. Так, у одних животных наблюдалось сочетание 3—4 видов двигательных расстройств, у других отмечали 1—2 вида двигательных дисфункций.

Из всех наблюдаемых нами расстройств движений у животных после моделирования ЭП можно выделить следующие проявления двигательных нарушений и их степени выраженности (см. табл. 1).

Таблица 1

**Вид двигательных расстройств и степень их выраженности**

№ п/п	Вид двигательных расстройств	Степень выраженности двигательных расстройств
1.	Тремор мышц	1 балл — легкие проявления
2.	Ригидность мышц	
3.	«Манежный» бег	2 балла — умеренные проявления
4.	Монотонные движения головой	
5.	«Вертикальный» хвост	3 балла — пик проявлений
6.	«Горбоподобный» изгиб туловища	
7.	Малоподвижность	

Динамику двигательных расстройств у животных с моделированным ЭП наблюдали на 1-е (до введения), 5-е, 15-е, 30-е и 50 сутки после введения криоконсервированных ЭНК (КЭНК) и КСКМ, индуцированных в нейробласты (рис. 1—5).

Анализируя данные динамики двигательных расстройств у животных контрольной группы, можно отметить следующее (рис. 1). Такие патогномичные для паркинсонизма расстройства движений как тремор и ригидность развиваются у крыс в течение 5 суток, в эти же сроки появляется и «манежный» бег, который характерен для подкорковых нарушений у крыс. Остальные двигательные нарушения развиваются в сроки от 5-ти до 15-ти суток, после чего можно наблюдать спонтанный регресс симптоматики, который завершается к 50-м суткам.

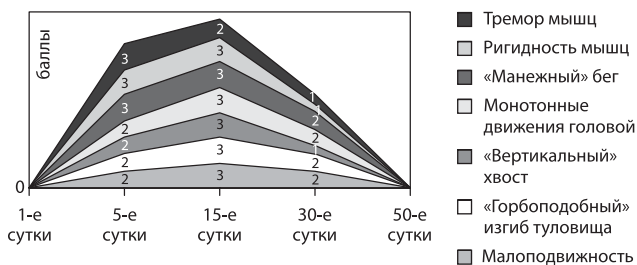


Рис. 1. Динамика двигательных нарушений при ЭП у крыс в контрольной группе

После введения криоконсервированных ЭНК (КЭНК) в 1-е сутки после моделирования ЭП у животных (рис. 2) начиная с 15-ти суток отмечается заметное уменьшение тремора, ригидности, которые к 30-м суткам практически исчезли. Также уменьшилась степень выраженности монотонного движения головой, «горбоподобного» изгиба туловища и малоподвижности по сравнению с контрольной группой.

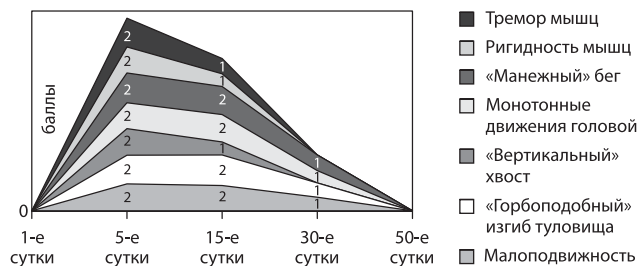


Рис. 2. Динамика двигательных нарушений при ЭП у крыс в различные сроки после введения КЭНК в 1-е сутки после операции моделирования ЭП

Проводя сравнительный анализ эффективности введения КЭНК и КСКМ, индуцированных в нейробласты, в 1-е сутки после операции моделирования ЭП, можно отметить следующее:

- 1) у обеих групп животных двигательные нарушения не достигли максимальной степени проявлений (3 балла);
- 2) у животных, которым вводили стромальные индуцированные клетки, все двигательные расстройства, кроме малоподвижности, к 15-м суткам регрессировали до 1-го балла, в отличие от группы животных, которым вводили КЭНК (см. рис. 3).

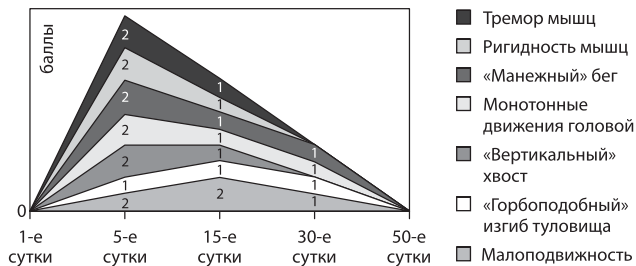


Рис. 3. Динамика двигательных нарушений при ЭП у крыс после введения КСКМ, индуцированных в нейробласты, в 1-е сутки после операции моделирования ЭП

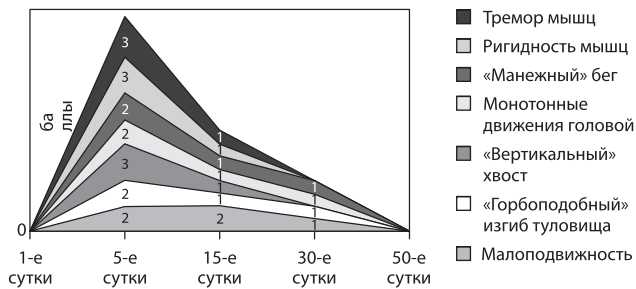


Рис. 4. Динамика двигательных нарушений при ЭП у крыс в различные сроки после введения КЭНК на 8-е сутки после операции моделирования ЭП

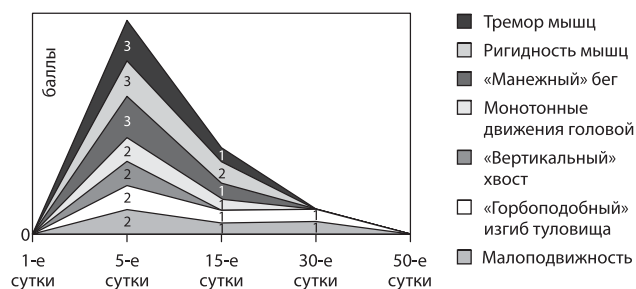


Рис. 5. Динамика двигательных нарушений при ЭП у крыс в различные сроки после введения КСКМ, индуцированных в нейробласты, на 8-е сутки после моделирования ЭП

При анализе представленных диаграмм можно отметить, что наиболее стойкими из всех двигательных расстройств являются малоподвижность и монотонные движения головой. Несколько быстрее регрессируют такие двигательные проявления, как ригидность мышц, «вертикально» поднятый хвост и тремор конечностей.

Кроме того, обращает на себя внимание более быстрое восстановление движений у животных с пересаженными клеточными суспензиями по сравнению с контрольной группой. При более детальном анализе кривых можно заметить, что все же при введении КСКМ, индуцированных в нейробласты, на 8-е сутки с момента моделирования ЭП, после 30-ти суток наблюдения определяется наличие у животных лишь слабо выраженной малоподвижности и монотонных движений головой, а остальные двигательные расстройства регрессировали. При этом у животных с введенными в тот же срок криоконсервированными ЭНК после 30 суток можно выявить также и элементы «манежного» бега и «горбоподобного» изгиба туловища.

В табл. 2 приведены результаты морфологических изменений в мозге крыс в различные сроки после введения КЭНК и КСКМ, индуцированных в нейробласты.

Таблиця 2

**Основные гистоморфологические данные после введения ЭНК и КСКМ в зависимости от сроков исследования**

Сутки	Эмбриональные нервные клетки	Клетки стромы костного мозга
5	Неравномерное распределение нейробластов, уплотнение и гипертрофия глиальных клеток. Начало формирования отграниченного вала	Равномерное, компактное распределение нейробластов в виде групп малодифференцированных клеток
15	В зоне введения — ограниченная пролиферация, уплотнение глиальных клеток с образованием глиального рубца.	На фоне умеренного отека видна зона имплантации КСКМ, глиальный рубец не образуется
30	Участки приживления трансплантата, признаки плеоморфизма в ядрах глиальных клеток	Нейробласты распределены равномерно, заметна гиперплазия и гипертрофия глиальных клеток
50	Преобладание плазматических клеток, признаки дифференцировки клеток	Наличие в зоне введения двуядерных нейронов грушевидной формы

При сопоставлении динамики развития двигательных расстройств с гистоморфологическими показателями, приведенными в таблице 2, а также ранее описанными [7, 8], можно отметить тот факт, что максимальная степень проявления двигательных расстройств у животных контрольной группы наступает на 5—15-е сутки после моделирования ЭП. Эти нарушения движений морфологически соответствует продолжающемуся развитию отека головного мозга в месте введения суспензии клеток, процессу уплотнения глиальных клеток и формированию глиального рубца при введении КЭНК. Сроки восстановления двигательных нарушений у крыс обеих групп совпадают с началом дифференцировки и функционирования введенных клеток — 30-е сутки. Необходимо лишь еще раз подчеркнуть, что при введении животным с ЭП суспензии КСКМ, индуцированных в нейробласты, не наблюдается формирование глиального вала в зоне введения, что отмечается при введении криоконсервированных ЭНК.

Таким образом, анализируя полученные результаты экспериментальных исследований у крыс с ЭП после введения криоконсервированных ЭНК и нейроиндуцированных КСКМ, можно сделать следующие выводы.

1. Двусторонняя деструкция SN у крыс вызывает развитие характерных двигательных расстройств, которые спонтанно регрессируют в контрольной группе животных на 50-е сутки после моделирования ЭП.

2. Пик двигательных нарушений у животных соответствует продолжающемуся развитию отека головного мозга в месте введения суспензии клеток, процессу уплотнения глиальных клеток и формированию глиального рубца при введении криоконсервированных ЭНК, а также при имплантации КСКМ, индуцированных в нейробласты.

3. Сроки регресса двигательных нарушений у животных после введения КСКМ, индуцированных в нейробласты, меньше, чем после введения КЭНК, но в целом сроки у животных обеих групп совпадают с началом дифференцировки и функционирования введенных суспензий клеток — 15—30-е сутки.

**Список литературы**

- Gottwald M. D. Bainbridge J. L., Dowling G. A. et al. New pharmacotherapy for Parkinson's disease // *Ann. Pharmacother.* — 1997. — Vol. 31. — P. 1205—1207.
- Guttman M., Burkholder J., Kish S. J. et al. CRTI-32 PET studies of the dopamine transporter in early Parkinson's disease: implications for the symptomatic threshold // *Neurology.* — 1997. — Vol. 48. — P. 1578—1583.
- Koller W. C. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease // *Ibid.* — 2000. — V. 55, № 4. — P. 2—7.
- Bjorklund A., Gage F. H. Neural Grafting in Animal Models of Neurodegenerative Diseases // *Ann NY Acad. Sci.* — 1985. — P. 53—81.
- Prockop D. J., Azizi S. A., Phinney D. G. et al. Potential use of marrow stromal cells as therapeutic vectors for diseases of the central nervous system // *Prog. Brain Res.* 2000. — V. 128. — P. 293—297.
- Пятикоп В. А., Щегельская Е. А., Горбач Т. В. и др. Динамика изменений уровня дофамина в головном мозге и крови крыс с моделью паркинсонизма после трансплантации клеток стромы костного мозга, индуцированных в нейробласты // *Проблемы криобиологии.* — 2005. — Т. 15. — № 3. — С. 452—454.
- Пятикоп В. А., Карамышев В. Д., Шеверева В. М. и др. Гистологический анализ изменений тканей головного мозга крыс с экспериментальным паркинсонизмом до и после трансплантации криоконсервированных эмбриональных нервных клеток // *Там же.* — 2006. — № 2. — С. 211—215.
- Пятикоп В. А., Щегельская Е. А., Микулинский Ю. Е. и др. Морфофункциональная характеристика клеток стромы костного мозга, индуцированных в нейробласты, после их трансплантации у крыс с моделью паркинсонизма // *Врачебная практика.* — 2006. — № 1 — С. 62—64.
- Деклараційний патент на корисну модель № 13724 від 17.04.2006. Бюл. № 4. Спосіб одержання суправітально забарвлених клітин різних типів біологічних клітин. Боровий І. А., Малюкін Ю. В., Семиноженко В. П., Щегельська О. А., Микулинський Ю. Ю., Хвисько О. М., Дьомін Ю. А., П'ятикоп В. О., Антонян І. М.

Надійшла до редакції 17.01.2007 р.

*В. А. Пятикоп, І. А. Григорова*

**Порівняльна характеристика динаміки рухових порушень та їх співставлення з морфофункціональними особливостями при експериментальному паркинсонізі після введення криоконсервованих ембріональних нервових та нейроіндуційованих in vitro стромальних клітин**  
*Харківський державний медичний університет (Харків)*

У роботі наведені дані, отримані в результаті вивчення впливу клітинних суспензій на динаміку рухових розладів при експериментальному паркинсонізі (ЕП) порівняно з гистоморфологічними змінами в різні терміни після введення клітин. Дослідження проведено на 30 щурах-самцях, яким було проведено моделювання підкіркового типу ЕП. Виявлено, що двостороння деструкція SN у щурів викликає розвиток характерних рухових розладів, які мають властивість спонтанно регресувати. Терміни регресу рухових порушень у тварин після введення КСКМ, індуційованих в нейробласти, менше, ніж після введення КЭНК.

*В. А. Pyatikop, I. A. Grigорова*

**The comparative typical dynamics the motor disorders and their comparison with morphofunctional peculiarities in experimental parkinsonism after introduction the cryoconservation embryonic neurals and neuroinductive in vitro stroma cells**

*Kharkiv State Medical University (Kharkiv)*

The data received in the result of studying the influence of cellular suspension on experimental Parkinsonism in comparison with histomorphologic changes in different periods after the cell introduction. The research was carried out on 30 rats whom were made the model of subcortical type experimental Parkinsonism. As the result of research was revealed that the double destruction SN in rats causes the development of typical motor disorders which have property of spontaneous regression. The periods of regression the motor disorders in animals after introduction the CSBB inductive in neuroblasts as little as after introduction CENC.