

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, ГИСТОЛОГИЯ. ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ



УДК 611.827:616-08:612.013

ОПЫТ МОДЕЛИРОВАНИЯ СПИНАЛЬНЫХ ТРАВМ И ЛЕЧЕНИЯ ИХ С ПОМОЩЬЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК

Т.Г.Глушкова, И.В.Титова

MODELING OF SPINAL CORD INJURIES AND TREATMENT WITH THE USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS

T.G.Glushkova, I.V.Titova

Ижевская государственная медицинская академия, glutg@mail.ru

Одним из самых перспективных методов лечения больных со спинномозговыми травмами на сегодняшний день считаются методы клеточной терапии, которые позволяют использовать стволовые клетки для участия в репаративных процессах в зоне травмы и активации внутренних резервов организма. Проведенный эксперимент на мышах с моделированием ушиба спинного мозга в грудном отделе и применением мезенхимальных стволовых клеток показал, что лишь незначительная часть введенных стволовых клеток дифференцировалась в нейроны, то есть дала материал для регенерации нервных клеток. Клеточная терапия в эксперименте обеспечила уменьшение области вторичного повреждения, способствовала более быстрой мобилизации внутренних регенеративных резервов. В результате у экспериментальных животных регенерация проводников спинного мозга в области повреждения привела к восстановлению двигательной активности нижних конечностей, функций органов брюшной полости, кожной чувствительности в области ниже зоны травмы.

Ключевые слова: *спинальная травма, мезенхимальные стволовые клетки, клеточная терапия*

According to WHO, each year, around the world, as many as 500 000 people suffer a spinal cord injury. As a rule, the injury leads to severe forms of disability. Nowadays there observed active development of cell therapy methods using stem cells of various origins for the treatment of spinal cord injury and other nervous system disorders. The most effective use of these methods is in the early stages after injury, as it develops secondary effects, such as the formation of connective tissue and glial scar, preventing the growth of neuronal processes. In the simulation experiment of spinal cord contusion there used mesenchymal stem cells, which were introduced into the injury zone. Most of the introduced stem cells differentiate into endothelial and glial cells and have trophic and regulatory effect on the tissues of the injured area. As a result, there observed recovery of motion activity in the lower limbs, functions of abdominal cavity organs, and skin sensitivity in the area below the injury zone.

Keywords: *spinal cord injury, mesenchymal stem cells, cell therapy*

Согласно данным ВОЗ, ежегодно в мире травмам позвоночника и спинного мозга подвергается порядка 500 тысяч человек. Среди них острые спинальные травмы составляют 23,7%, в числе которых ушибы (2,67%). По статистике, пострадавшими чаще являются лица мужского пола и трудоспособного возраста. Как правило, травма приводит к тяжелым формам инвалидизации: неспособности к самообслуживанию, необходимости в постоянной посторонней помощи и полной зависимости от других лиц. Благодаря достижениям нейрохирургии, фармакологии, реабилитации в последние годы значительно увеличилась продолжительность жизни спинальных больных [1]. Однако на данный момент главным в лечении и адаптации больных к новым условиям все еще является не восстановление утраченных функций, а обучение пользованию сохранившимися.

Активный экспериментальный и клинический интерес к различным методам клеточной терапии, который проявляется в последнее время, позволяет

рассматривать их как потенциально перспективные для лечения ряда заболеваний [2,3]. Особенно актуальны данные методы при лечении заболеваний нервной системы, связанных с гибелью или значительным повреждением ее клеточных элементов [4,5]. Наиболее эффективно применение данных методов в ранние сроки после получения травмы, т.к. развиваются вторичные ее эффекты, самый серьезный из которых — образование рубца, механического барьера, препятствующего восстановлению нервной ткани и вырабатывающего ингибиторы роста нервных отростков [6-8].

Цель исследования — оценить эффективность клеточной терапии с применением мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальной травме спинного мозга.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на самцах мышей линии C57Bl/6. Для эксперимента было отобрано 90

животных. Моделировали ушиб спинного мозга на уровне Т 10-12. В соответствии с правилами этичного отношения к экспериментальным животным травмирование проводилось под наркозом. Для проведения анестезии использовали эфирный наркоз. Для предотвращения передозировки наркоз подавался дробно. Ушиб наносился на открытый участок спинного мозга. В целях уменьшения таких осложнений, как вывих позвонков, в операциях применяли минимальное воздействие на позвоночный столб — ламинэктомию одного позвонка. Для улучшения фиксации места операции при закрытии раны над нею сшивали длиннейшие выпрямители спины. Степень нарушения целостности спинного мозга определяли по функциональным нарушениям в органах и системах ниже уровня повреждения. В результате спинальной травмы происходит нарушение двигательных функций и чувствительности задних конечностей и хвоста, а также нарушение работы органов брюшной полости. В результате у опытного животного возникают затруднения с дефекацией и мочеиспусканием. Возможно развитие гипертермии, болевого синдрома и многих других нарушений.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга получали из бедренных и больших берцовых костей от мышей той же линии. МСК культивировали в питательной среде, для введения использовали клетки 5-8-го пассажей. Перед введением в организм травмированного животного определяли полипотентность МСК путем добавления в культуральную среду индукторов дифференцировки. После наблюдения их дифференцировки *in vitro* не менее чем в трех направлениях (остеогенном, адипогенном, хондрогенном, нейрогенном) клетки вводили в область травмы в количестве 1 млн в 0,1 мл физиологического раствора, используя шприц и иглу для внутрикожных инъекций. Контрольным животным вводили физиологический раствор. После травмы за животными наблюдали в течение месяца. В этот период отслеживали двигательную активность мышей, их способность к самостоятельной дефекации и мочеиспусканию, чувствительность задних конечностей и хвостов. Для визуальной оценки течения репаративного процесса в зоне экспериментальной раны были использованы методы приготовления и анализа гистологических препаратов ткани спинного мозга. Материал забирали через месяц после начала опыта. Для изготовления гистологических препаратов использовались два метода: импрегнация по Гольджи в модификации Бюбенета, который позволяет выявить структурные элементы нервной ткани, и окраска нейронов по Нисслю, которая выявляет патологические изменения цитоплазмы нейронов (тигролиз, вакуолизацию и др.).

Результаты исследования и их обсуждение

После оперативного вмешательства осмотр животных производили ежедневно. Животные со спинальными травмами нуждаются в постоянном уходе. Частичная или полная денервация тазовых органов приводит к застою мочи и кала, способствует развитию инфекций, что может иметь летальные по-

следствия. Эвакуацию мочи и кала проводили ежедневно путем массирования мочевого пузыря и толстой кишки и осторожного выдавливания кала и мочи движением пальца в каудальном направлении. Одним из критериев оценки эффективности проведенной клеточной терапии при наблюдении за прооперированными животными являлся уровень их смертности. Незначительная часть животных (5 из 90 или около 5,5%) погибла непосредственно во время операции и сразу после нее, вследствие передозировки наркоза или хирургических ошибок. Таким образом, непосредственно в эксперименте участвовало 85 мышей.

После проведения операции основной пик гибели животных наблюдался на сроках от 3 до 7 дней во всех опытных группах. Всего в течение 7 дней погибло примерно половина (48%) от всех погибших в течение эксперимента животных. После восьмого дня смертность значительно снижалась. Причиной смерти в этом случае обычно служила восходящая урогенитальная инфекция. При вскрытии этих мышей обнаруживали переполненный мочевой пузырь с признаками инфекции и расширение почечных лоханок. Также у погибающих в последующие мышей кроме перечисленных наблюдался ряд других характерных послеоперационных признаков: помутневшая роговица, покусанный бесчувственный хвост, вывих позвонков, постоянная эрекция.

Сравнение общей летальности показывает, что она варьировала от 20 до 43,3% в контроле и в опыте. Статистический анализ не позволяет установить значимых различий между этим показателем в контроле и у животных, которым вводили клетки. В контроле погибло 11 из 28 мышей (43,3%±13%), в опытах с введением МСК — 14 мышей из 57 (23,3%±10%) (доверительные интервалы рассчитаны для вероятности 95%).

Наблюдение за двигательной активностью животных показало, что восстановление произвольных движений у животных в контрольной группе не происходило, в то время как в опытных группах у ряда животных наблюдалось восстановление произвольной подвижности задних лап. Так, из 12 случаев при введении МСК отмечено 5 случаев (42%) восстановления подвижности задних конечностей. Также у животных с восстановленной подвижностью лап наблюдалось самостоятельное мочеиспускание к концу эксперимента (1 месяц после травмирования).

Регенераторные возможности тканей спинного мозга зависят от степени их травмирования, поэтому использовались модели различных повреждений от сдавливания до полного пересечения органа. Тем не менее, при использовании различных моделей травм спинного мозга были обнаружены и некоторые общие черты в картинах восстановления органа.

Отмечено, что морфологические изменения выше перерезки носят характер диффузно-очаговых перестроек в группах нейронов. Среди нейронов встречаются как вакуолизированные, так и сморщенные, деформированные клетки. У сморщенных нейронов преобладают признаки кариопикноза с гиперхромностью гомогенно окрашенной цитоплазмы. Набухание нейронов встречается несколько реже и со-

проводятся просветлением ядер. У некоторых из этих клеток хорошо заметно ядрышко. Мелкоклеточные нейроны сморщены, содержат темные ядра. У двигательных нейронов преобладают диффузные, умеренно выраженные реакции в виде вакуолизации отдельных клеток, набухания и ацентрического расположения их ядер. Наблюдаются признаки гипертрофии отдельных астроцитов, что проявляется в увеличении размеров их ядер, увеличении длины и степени разветвленности отростков.

В зоне повреждения выявляется выраженное изменение организации нервных структур. В данном очаге можно найти лишь отдельные, часто деформированные нейроны, имеющие сильно окрашенную кариоплазму. Здесь наблюдаются скопления молодых астроцитов и клетки лимфоцитарно-макрофагального ряда. Астроциты сильно деформированы.

Сегменты ниже места повреждения характеризуются выраженными морфологическими реакциями. Обнаруживаются очаговые выпадения нейронов, которые наиболее сильно заметны среди пучковых нейронов. Сохранившиеся нейроны сильно вакуолизированы. В их просветленной цитоплазме заметны неправильной формы глыбки тигроида. Интернейроны также вакуолизированы. Большинство двигательных корешковых нейронов вакуолизировано, но встречаются и гиперхромные клетки. Астроциты формируют группы, часть из них проявляет признаки умеренной гиперплазии отростков.

Применение стволовых клеток существенно изменяет патоморфологическую динамику как выше, так и ниже места повреждения. Вышележащие сегменты мозга содержат значительно меньшее число измененных нейронов среди всех рассмотренных популяций клеток. В частности, в корешковых и внутренних нейронах часто выявляются плотно упакованные глыбки тигроида на фоне просветленной кариоплазмы, что указывает на усиление белок-синтетической активности рассматриваемых клеток. В то же время сегменты ниже разрушенных зон отличаются многочисленными клетками с признаками набухания и вакуолизации, однако во многих из них обнаруживаются гипертрофия ядрышек, появление крупных глыбок хроматофильной субстанции цитоплазмы. Данное явление более характерно для нервных клеток с усиленной синтетической активностью. При окраске по Нисслю выявляется выраженная гипертрофия астроцитов, ядра которых становятся сопоставимыми по размерам с ядрами нейронов. Выявляется также набухание ядер олигодендроцитов. Астроциты имеют гигантские отростки, часто измененной формы, значительно утолщенные, что наиболее заметно в участках, непосредственно прилежащих к месту повреждения. Отростки олигодендроцитов имеют необычную форму, сильно разветвлены, чего не наблюдалось у контрольных животных. Количество олигодендроцитов вблизи зоны повреждения значительно больше по сравнению с контрольной группой.

Дополнительные исследования с введением меченных МСК в зону травмы и наблюдением за их судьбой в динамике репаративного процесса показ-

ли, что лишь незначительная часть стволовых клеток дифференцируются в нейроны спинного мозга (около 2%). С использованием моноклональных антител было обнаружено, что большая часть меченых клеток проявляют признаки эндотелиальных и глиальных клеток.

Таким образом, введение клеток не влияет на общую смертность. Основными причинами гибели при спинальной травме являются острые нарушения нервной регуляции работы внутренних органов, которые не могут быть купированы методами клеточной терапии, поскольку введенные клетки в течение 7 дней не способны успеть организовать новые структуры, дублирующие функции утраченных, т.е. не могут оказать за столь короткий срок восстанавливающего (или какого-либо другого) эффекта. Проведенный морфологический анализ препаратов указывает на стимулирующее влияние стволовых клеток на поврежденные в результате травмы нервные структуры спинного мозга. Вероятно, образуемые стволовыми клетками факторы могут давать прямые или опосредованные протекторные эффекты на нейроны, что выражается в меньшем уровне вакуолизации клеток, снижении проапоптотической активности нейронов. Происходит выраженная активация функций астроцитов, которые также способны вырабатывать факторы, сдерживающие апоптоз нейронов. Повышение функциональной активности олигодендроглии, увеличение ее плотности, как известно, является одним из важных механизмов, активирующих процессы прорастания аксонов. Васкулогенез также может быть одним из факторов, усиливающих репаративную активность поврежденных нейронов.

1. Siddiqui A.M., Khazaei M., Fehlings M.G. Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. *Progress in Brain Research*, 2015, vol. 218, pp. 15-54.
2. Vladimirskaia E.B., Maiorova O.A., Rumiantsev S.A. *Biologicheskie osnovy i perspektivy terapii stvolovymi kletkami* [Biological bases and prospects of stem cell therapy]. Moscow, "Medpraktika-M" Publ., 2005. 391 p.
3. Jarocha D., Milczarek O., Wedrychowicz A., Kwiatkowski S., Majka M. Continuous improvement after multiple mesenchymal stem cell transplantations in a patient with complete spinal cord injury. *Cell Transplantation*, 2015, vol. 24, no. 4, pp. 661-672.
4. Dasari V.R., Veeravalli K.K., Dinh D.H. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: a review. *World Journal of Stem Cells*, 2014, vol. 6, no. 2, pp. 120-133.
5. Yamamoto A., Matsubara K., Kano F., Sakai K. Analysis of the neuroregenerative activities of mesenchymal stem cells in functional recovery after rat spinal cord injury. *Methods in Molecular Biology*, 2014, vol. 1213, pp. 321-328.
6. de Almeida F.M., Marques S.A., Ramalho Bdos S., Massoto T.B., Martinez A.M. Chronic spinal cord lesions respond positively to transplants of mesenchymal stem cells. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 2015, vol. 33, no. 1, pp. 43-55.
7. Neirinckx V., Rogister B., Franzen R., Wislet-Gendebien S. Bone marrow stromal stem cells transplantation in mice with acute spinal cord injury. *Methods in Molecular Biology*, 2014, vol. 1213, pp. 257-264.
8. Schroeder G.D., Kepler C.K., Vaccaro A.R. The use of cell transplantation in spinal cord injuries. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2016, vol. 24, no. 4, pp. 266-275.