

ДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ И НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ СОСУДЫ, VEGF И МАРКЕРЫ ГИПОКСИИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ У КРЫС

¹Сушкевич Г.Н., ¹Рошаль Л.М., ²Цыб А.Ф., ²Южаков В.В., ³Пинелис В.Г.,
²Коноплянников А.Г., ²Павлова Л.Н., ²Бандурко Л.Н., ²Фомина Н.К., ³Сорокина Е.Г.,
¹Семенова Ж.Б., ²Шевчук А.С., ¹Карасева О.В., ¹Чернышова Т.А., ⁴Марей М.В., ⁴Сухих Г.Т.

¹Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы, 119180 Москва, Большая Полянка, 20

э-почта: souchkevitchg@mail.ru

²Медицинский радиологический научный центр Российской академии медицинских наук, 249036 Калужская область, Обнинск, ул. Королева, 4,

э-почта: mrrc@mrrc.obninsk.ru

³Научный центр здоровья детей Российской академии медицинских наук, 117296, Москва, Ломоносовский проспект, 2/62, э-почта: baranov@nczd.ru

⁴Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. Академика В.И.Кулакова Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи, 117997, Москва, ул.Академика Опарина, дом 4, э-почта: info@ncagip.ru

Аннотация

Ключевые слова:

ВВЕДЕНИЕ

Ежегодно в России черепно-мозговую травму (ЧМТ) получают около 600 тыс. человек (4:1000), 50тыс. из них погибают, а еще 50тыс. становятся официальными инвалидами. Черепно-мозговые повреждения занимают первое место среди всех травм в детском возрасте, требующих госпитализации, а также лидирующее место в структуре детской смертности. Различают два основных механизма травматического повреждения мозга при ЧМТ: 1) первичное повреждение мозга как результат непосредственного воздействия механической энергии и 2) вторичное повреждение мозга, возникающее вследствие развития эндогенных патологических процессов, запускаемых с момента получения травмы. Первичное повреждение головного мозга включает в себя повреждение сосудов, аксонов, нейронов и глии, которое приводит к диффузным аксональным повреждениям, ушибам и разможжениям отдельных участков мозга, внутрочерепным кровоизлияниям, множественным распространенным внутримозговым геморрагиям, контузии и разрыву ствола мозга [Оглезнев К.Я. и соавт., 1980; Потапов А.А. и соавт., 1990; Miller J.D., 1993; Crooks D., 1991]. Факторы вторичного повреждения мозга условно подразделяют на внутрочерепные - сдавление мозга внутрочерепными гематомами; нарушения гемо- и ликвороциркуляции, обусловленные субарахноидальными и желудочковыми кровоизлияниями; набухание мозга вследствие отека, гиперемии или венозного полнокровия; повышение внутрочерепного давления; развитие инфекции мозга, его оболочек; и внечерепные - гипоксемия и анемия; артериальная гипотензия; гипер-, гипокапния; гипо-, гипернатриемия; гипо-, гипергликемия, гипертермия, эндогенная интоксикация и др.

[(Лебедев В.В., и соавт., 1982; Мухаметжанов Х., 1987; Потапов А.А., и соавт., 1996; Changaris D.G., et al., 1987; Chesnut R.M., et al., 1993)].

Основным повреждающим фактором, сопровождающим неблагоприятные исходы ЧМТ, является гипоксия (Miller, 1985; Onuma et al., 1991). Клинические и экспериментальные исследования показали, что развитие повреждений нейронов при гипоксии/ишемии мозга связано с патологическими реакциями, возникающими уже с момента получения травмы и обусловленных как самой травмой, так и факторами вторичного повреждения. Среди такого рода патологических реакций центральное место занимают гиперстимуляция глутаматных (Глу) рецепторов, нарушение метаболизма Ca^{2+} , истощение энергетических ресурсов, образование свободных радикалов кислорода и оксида азота (NO), что в целом способствует развитию апоптотической гибели нейронов [(Choi,1998; Lipton,1999; White et al., 2000)].

Несмотря на то, что в нейротравматологии за последние три десятилетия произошли существенные сдвиги, связанные с внедрением методов нейровизуализации, нейромониторинга, использованием малоинвазивных методов хирургического лечения, внедрением рекомендаций и стандартов, основанных на принципах доказательной медицины, проблема лечения больных ЧМТ остается открытой. Ведущие специалисты в нейротравматологии перспективу решения этой проблемы в 21 столетии в значительной степени связывают с открытиями в области молекулярной биологии и клеточной терапии. В этом отношении большие надежды возлагаются на использование стволовых клеток (СК) для целей репаративной нейрохирургии. СК характеризуются двумя важными свойствами, а именно, способностью к длительному самоподдержанию и производству клеток, уходящих в дифференцировку. При этом они могут давать начало различным рядам клеток. Кроме того, в последние годы введено такое понятие как «пластичность» СК. Это свойство характеризуется способностью СК одних тканей продуцировать клетки других тканей. При этом пластичная плюрипотентность СК варьирует в зависимости от микроокружения, которое определяет направление дифференцировки СК. Клетки с нейрогенным потенциалом делятся на 3 группы: **1)** эмбриональные СК и предшественники нервных клеток, выделенные из эмбриональной или фетальной ткани (103, 104); **2)** СК, локализованные в нервной ткани зрелого организма (23, 72, 122); **3)** СК, выделенные из других тканей и органов (107, 142), в том числе, из костного мозга, фетальной печени, мобилизованной периферической крови и крови пуповинной вены []. Стратегией клеточной терапии при травматическом повреждении центральной нервной системы может быть замещение популяции поврежденных клеток, восполнение уровня нейроактивных молекул (нейромедиаторов, нейротрансмиттеров), ремиелинизация поврежденных аксонов, трофическая поддержка нейротрофинами и цитокинами (предотвращение нейродегенерации, стимуляция роста нейронов, аксонов, восстановление функции синапсов) [44], а также стимуляция ангиогенеза и минимизация степени гипоксии.

Исходя из вышеизложенного, целью нашего исследования явилось экспериментальное изучение действия стволовых клеток различного происхождения на ангиогенез, фактор роста сосудов (VEGF) и маркеры гипоксии у крыс, переживших ЧМТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе применяли три типа стволовых клеток – мезенхимальные стволовые клетки из костного мозга взрослого человека (МСК), фетальные мезенхимальные

стволовые клетки (ФМСК) и фетальные нейрональные стволовые клетки (НСК) из тканей 9-10-недельных эмбрионов человека после медицинских аборт. Получение первичной культуры МСК, ФМСК и НСК осуществляли по ранее описанным методам [1, 5].

Исследования выполнены на крысах-самцах Вистар массой 140-160 г, которым моделировали ЧМТ методом падающего груза весом 50 г с высоты 110 см на теменную область головы [6]. После нанесения травмы около 50% крыс погибало в течение первых 5 мин. Из выживших животных были сформированы группы сравнения, равноценные по степени тяжести травмы головного мозга, которую оценивали по комплексу симптомов и тестов в течение 30 мин после воздействия [3]. В 1-ю опытную группу вошли животные с травмой головного мозга, не получавшие лечения, во 2-ю — с травмой, получавшие метаболическую поддержку (базисную терапию), в 3-ю — крысы с травмой, которым вводили только МСК взрослого организма, в 4-6-ю — животные с травмой, получавшие комплексное лечение на основе базисной терапии и введения стволовых клеток (таблица 1). Иммуносупрессию экспериментальным животным не проводили. Контрольную группу составили ложнотравмированные крысы.

Таблица 1. Общая характеристика материала для изучения действия стволовых клеток человека после черепно-мозговой травмы.

| Группа | Количество животных в подгруппе через указанное время после нанесения травмы | |
|--|--|----------------------|
| | 3 сут (подгруппа А) | 14 сут (подгруппа Б) |
| Контрольная (ложнотравмированные) | 15 | 12 |
| 1-я (травма без лечения) | 15 | 15 |
| 2-я (травма и базисная терапия) | 12 | 12 |
| 3-я (травма и МСК взрослого организма) | 12 | 12 |
| 4-я (травма, базисная терапия и МСК взрослого организма) | 15 | 15 |
| 5-я (травма, базисная терапия и фетальные МСК) | 15 | 15 |
| 6-я (травма, базисная терапия и фетальные НСК) | 15 | 11 |

Для базовой терапии крыс с ЧМТ были использованы препараты, обладающие антиоксидантным, антигипоксическим, ноотропным и анксиолитическим действием. Лечение начинали спустя 1 сутки после нанесения травмы и продолжали в течение последующих 2 суток по схеме:

| | | | |
|-----------|-----------|--------------|--------------------|
| актовегин | 5.0 мг/кг | 2 раза/сутки | (всего 4 введения) |
| мексидол | 5.0 мг/кг | 2 раза/сутки | (всего 4 введения) |
| кавинтон | 5.0 мг/кг | 1 раз/сутки | (одно введение) |
| пирацетам | 200 мг/кг | 1 раз/сутки | (одно введение) |

Кавинтон и пирацетам применяли в виде исходных ампульных растворов, актовегин и мексидол — после разведения стерильным 0.9 % р-ром NaCl,

соответственно в 8 и 10 раз. Все препараты вводили внутривенно из расчета 0.1 мл/100 г. Животным 3-6-й групп через 1 сут после травмы однократно внутривенно вводили 2×10^6 стволовых клеток человека, суспендированных в 0,5 мл физиологического раствора. Нейросферы, полученные путем культивирования нейральных стволовых/прогениторных клеток из перивентрикулярной области головного мозга плодов человека, предварительно диссоциировали путем механического разбивания.

Животных выводили из опытов через 3 сут (подгруппы **А**) и через две недели (подгруппы **Б**) после ЧМТ. Головной мозг для исследования брали у декапитированных под нембуталовым наркозом крыс. В каждой подгруппе выделенный мозг погружали на 24 ч в 10%-ный нейтральный формалин (n=5-7), кислую жидкость Буэна (n = 2-3) или кислый спирт (96% этанол + ледяная уксусная кислота, 3:1) (n = 5). Из уплотненного мозга в области нанесения травмы вырезали фронтальный сегмент на уровне дорсального гиппокампа (-2,5 — -3,3 мм от брегмы).

Для гистологического исследования микротомные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы препаратов, фиксированных в кислом спирте и рефиксированные в кислом спирте после фиксации в жидкости Буэна, окрашивали 0,1% крезильным фиолетовым и тионином («Fluka») по Нисслю. Гистотопографическое картирование зон повреждений и точное определение уровней срезов производилось по стереотаксическому атласу головного мозга крыс [26].

Гистологический рисунок церебральных микрососудов визуализировали путем применения иммунопероксидазного набора («MP Biomedicals»), включавшего биотинилированные козы анти тела к мышинным IgG и стрептавидин-пероксидазный реагент. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) выявляли иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных мышинных антител (VEGF, C-1, «Santa Cruz», 1:50). До нанесения антител к VEGF депарафинированные срезы, погруженные в цитратный буфер pH 6,0, прогревали в микроволновой печи (5 мин, 720 Вт). В растворе первых антител препараты инкубировали в течение ночи во влажной камере при 4°C. После отмытки в фосфатно-солевом буфере материал обрабатывали вторичными антителами согласно рекомендациям фирмы изготовителя. Для моноклональных антител применяли биотинилированные лошадиные анти тела к мышинным IgG (BA-2000, «Vector Lab.», 1:250) и стрептавидин-пероксидазный комплекс (SA-5004, «Vector Lab.», 1:250).

Выявление антигенов на гистологических срезах выполнено согласно основным требованиям для иммунопероксидазных методов. Иммуноокрашивание препаратов на VEGF (дофиксация в Буэне после формалина) и сосуды (фиксация в кислом спирте) проводилось на срезах толщиной 9 мкм. Растворы для иммуногистохимии готовили на фосфатно-солевом буфере, pH 7,4. Эндogenous пероксидазу блокировали в 3% перекиси водорода. В блокирующий буфер добавляли 2% нормальной сыворотки животных-доноров вторых антител, 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Тритона X-100. Для снижения уровня неспецифических реакций при выявлении моноклональных антител в раствор биотинилированных антител к мышинным Ig добавляли 2% нормальной крысиной сыворотки. Субстратный фермент (пероксидазу) проявляли диаминобензидином (Liquid DAB+, «DAKO»).

Гистологические препараты изучали в микроскопе «Olympus CX41» с микрофотосъемкой на цифровую камеру «Nikon CoolPix 4500». Количественные исследования выполнены с помощью системы компьютерного анализа

микроскопических изображений с применением прикладной лицензионной программы AnalySIS 5.0 ("Soft Imaging System GmbH", Германия) согласно основным принципам стереологии в морфометрии. В работе использовали следующие стереологические параметры: A_T – общая тестируемая площадь, объемная плотность (интегральный показатель содержания структур в ткани по отношению суммарной площади структур к A_T); средняя площадь сечения структуры; количественная плотность (число сечений структур на единицу площади среза); линейная плотность (общая длина структур на единицу площади); оптическая плотность интенсивности окрашивания структур на срезе. Для каждого животного подсчет соответствующих структур проводили в правом и левом полушариях в тестовых полях по трем срезам головного мозга.

На уровне гиппокампа области исследования включали сенсомоторную кору и дорсолатеральные области таламуса. Количественные характеристики сосудистого русла определяли при объективе $\times 10$ в I – V слоях коры и в области ядерных образований таламуса ($A_T = 3 \text{ мм}^2$ для каждой зоны). Для статистической обработки полученных результатов использовали непараметрический U критерий Манна-Уитни.

Маркеры гипоксии – белок S-100 и аутоантитела (aAT) к рецепторам глутамата типа NMDA изучали в сыворотке крови, полученной сразу после декапитации наркотизированных нембуталом крыс на 3 и 14 сутки после ЧМТ. Уровень aAT определяли с помощью метода, разработанного в Институте мозга человека РАН (Дамбинова С. А., Изыкенова Г. А., 1997) и основанного на иммуноферментном определении сорбированных aAT на синтетическом пептиде идентичном по аминокислотному составу концевому участку NR₂ субъединице рецепторов глутамата. Определение aAT проводили в сыворотке, хранящейся до проведения анализа при -40°C , разбавленной в 50 раз фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) с добавлением твин-20 непосредственно перед проведением иммуноферментного анализа. Иммуноферментный анализ уровня aAT проводили при комнатной температуре на иммунологических планшетах высокой сорбционной емкости "Costar". Содержание aAT оценивали по оптической плотности. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм, используя для окрашивания тетраметилбензидин (Sigma) на вертикальном спектрофотометре для иммунологических планшетов «Униплан» (Россия). Концентрацию S 100B белка определяли с помощью наборов фирмы CanAg S100B (Швеция), используя готовые стандартные растворы, содержащие 500 – 3500 нг/л белка S100B. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Graph Prism. Результаты считали значимыми при $p < 0,05$ между сравниваемыми группами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У ложнотравмированных животных капиллярная сеть относительно равномерно заполняет кору полушарий и дорсолатеральную область таламуса. Продукт иммунопозитивной реакции выявляется в просвете сосудов и контурирует их стенку (рис. 1, а). Количественные характеристики микроциркуляторного русла даны в таблице 2. Наиболее интенсивная реакция на VEGF определялась в цитоплазме нейронов пирамидных слоев гиппокампа (рис. 2, а). Положительную реакцию на фактор роста эндотелия сосудов дают также клетки наружного зернистого слоя, наружного и внутреннего пирамидных слоев сенсомоторной коры полушарий и отдельные ядерные образования промежуточного мозга.

Таблица 2. Количественная характеристика сосудистого русла в сенсомоторной коре головного мозга у животных контрольной и опытных групп без лечения и с базовой терапией (1 и 2 экспериментальные группы) на 3 сутки и через 2 недели после ЧМТ ($M \pm m$); $n = 4-5$ на экспериментальную группу

| Показатель | Срок | Контроль $n = 7$ | Травма | |
|---|-------|---------------------|--------------|-------------|
| | | | без лечения | +БТ |
| Кора | | | | |
| Оптическая плотность иммуноокрашивания (усл. ед) | 3 сут | 0,151±0,003 | 0,134±0,005* | 0,138±0,006 |
| | 2 нед | | 0,144±0,03 | 0,141±0,03 |
| Объемная плотность сосудов (%) | 3 сут | 2,24±0,20 | 1,32±0,19* | 1,80±0,34 |
| | 2 нед | | 1,65±0,16 | 1,88±0,24 |
| Линейная плотность сосудов (мкм/мм ²) | 3 сут | 5884±393 | 3765±466* | 4607±741 |
| | 2 нед | | 4359±306 | 4873±658 |
| Количество сечений сосудов на 1 мм ² | 3 сут | 776±11 | 564±50* | 618±54 |
| | 2 нед | | 625±15 | 646±43 |
| Таламус | | | | |
| Оптическая плотность иммуноокрашивания (усл. ед) | 3 сут | 0,152±0,003 | 0,155±0,004 | 0,143±0,010 |
| | 2 нед | | 0,151±0,005 | 0,155±0,007 |
| Объемная плотность сосудов (%) | 3 сут | 3,03±0,09 | 3,01±0,35 | 3,21±0,43 |
| | 2 нед | | 2,92±0,46 | 2,90±0,37 |
| Линейная плотность сосудов (мкм/мм ²) | 3 сут | 7465±241 | 7520±591 | 7678±590 |
| | 2 нед | | 7501±939 | 7023±714 |
| Количество сечений сосудов на 1 мм ² | 3 сут | 761±23 | 814±41 | 785±20 |
| | 2 нед | | 750±83 | 760±22 |

Закрытая ЧМТ вызывает у крыс сосудистые нарушения и диффузные ишемические повреждения нейронов коры и стволовой части мозга. При гистологическом исследовании срезов головного мозга через 3 сут после ЧМТ в сенсомоторной коре отмечали запустевание сосудов, появление как паретически расширенных, так и спавшихся профилей их сечения. В области ишемических повреждений уменьшалась интенсивность окрашивания сосудов на иммуноглобулины (рис. 1, б) и, соответственно, их выявляемость в 1,4 раза ($p < 0,05$). В таламусе выраженных качественных и количественных изменений со стороны сосудистой сети не выявлено. Интегральные количественные характеристики капиллярного русла в коре и таламусе приведены в таблице 2. В локусах травматического повреждения нервной ткани интенсивность иммуноокрашивания нейронов на VEGF, как правило, снижалась, но усиливалась перифокально и вне зон повреждения. Через 2 нед визуально наметилась тенденция к нормализации микроскопической организации церебральных сосудов. Однако существенных изменений в количественных характеристиках микроциркуляторного русла относительно предыдущего срока не выявлено. В пирамидных полях гиппокампа появлялись участки нейродегенеративных изменений с потерей иммуноокрашивания поврежденных нейронов на VEGF (рис. 2, б).

По данным гистопатологического исследования и морфометрии, у крыс, получавших базисную терапию, лечебный эффект по восстановлению капиллярной сети определялся на 3 сут после травмы. Визуально в коре полушарий и подкорковых центрах очаги отека и повреждений с гиперхромными нейронами имели меньшие размеры, чем у животных, не получавших лечения. В сенсомоторной коре восстанавливался гистологический рисунок микроциркуляторного русла (рис. 1, в). У некоторых животных повышалась экспрессия VEGF в эпителии сосудистых сплетений (рис. 2, в). Тенденция к активации репаративных процессов в коре и таламусе на фоне метаболической поддержки мозга сохранилась и через 2 нед.

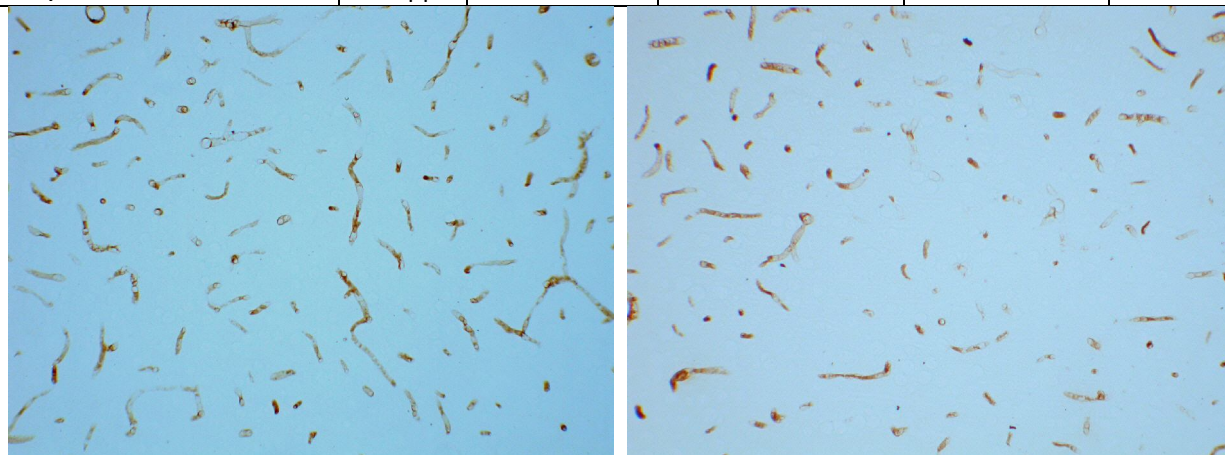
У животных 3-й группы, получавших только взрослые МСК, морфофункциональные признаки стимуляции репаративных процессов объективно определились через 2 нед. У крыс 4-6-й групп, получавших комплексное лечение, уже на 3-и сут после травмы отчетливо восстанавливалось заполнение ткани мозга микрососудами и повышалась интенсивность их окрашивания на иммуноглобулины. При сочетанном применении базисной терапии и взрослых МСК в поврежденных зонах коры быстро восстанавливалось содержание функционирующих сосудов, а через 2 нед у этих животных были зарегистрированы максимальные значения показателей васкуляризации не только в коре (рис. 1, г), но и в таламусе. Анализ препаратов показал, что, параллельно с восстановлением капиллярной сети, в ядерных образованиях промежуточного мозга повышалось содержание клеток с гиперэкспрессией фактора роста эндотелия сосудов. Принципиальных различий в действии стволовых клеток разного вида мы не обнаружили. Их влияние было однонаправленным и сопровождалось повышением содержания VEGF-продуцирующих нейронов (рис. 2, г). Количественные характеристики микроциркуляторного русла у животных с ЧМТ, которым вводили стволовые клетки без или совместно с базовой терапией (экспериментальные группы 3 – 6) даны в таблице 3.

Результаты исследования маркеров гипоксии у крыс с ЧМТ и экспериментальной терапией приведены на рис. 3 и 4. Как видно из представленных данных, уровень белка S-100 значительно увеличился у крыс на 3 сутки и через две недели после ЧМТ. Базовая терапия, а также ее сочетание с применением МСК взрослого человека и ФМСК достоверно нивелировали эти изменения. В результате применения ФНСК на фоне базовой терапии отмечена лишь тенденция к сдерживанию повышения уровня белка S-100. Уровень аАТ к рецепторам глутамата у крыс после ЧМТ существенно не изменился (рис.4) по отношению к контролю. В то же время у крыс, получавших медикаментозную поддержку и клеточную терапию, отмечено существенное повышение уровня аАТ, особенно через две недели после ЧМТ. Этот эффект был более выражен в случае использования МСК взрослого человека.

Таблица 3. Количественные характеристики сосудистого русла в сенсомоторной коре головного мозга у животных после ЧМТ и клеточной терапии ($M \pm m$); $n = 4-5$ на экспериментальную группу

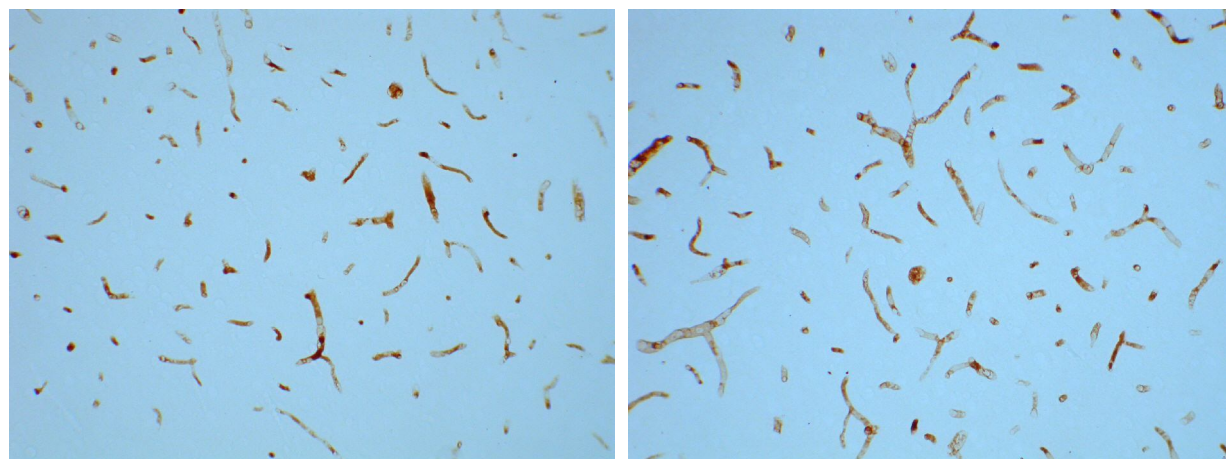
| Показатель | Срок | Травма | | | |
|--|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | +МСКЧ | +БТ+ МСКЧ | +БТ+ФМСК | +БТ+ФНСК |
| Кора | | | | | |
| Оптическая плотность иммуноокрашивания (усл. ед) | 3 сут | 0,141±0,002 | 0,137±0,002 | 0,146±0,003 | 0,140±0,004 |
| | 2 нед | 0,139±0,002 | 0,143±0,003 | 0,145±0,004 | 0,145±0,003 |

| | | | | | |
|---|-------|-------------|---------------------------|-------------|-------------|
| Объемная плотность сосудов (%) | 3 сут | 1,31±0,13 | 1,96±0,19 | 1,63±0,30 | 1,55±0,25 |
| | 2 нед | 1,96±0,19 | 2,97±0,28 ^{+,**} | 2.44±0,37 | 1,85±0,15 |
| Линейная плотность сосудов (мкм/мм ²) | 3 сут | 3955±244 | 5174±326 | 4569±923 | 3894±597 |
| | 2 нед | 5030±499 | 6937±448 ^{+,**} | 6145±701 | 4742±382 |
| Количество сечений сосудов на 1 мм ² | 3 сут | 561±33 | 677±53 | 628±111 | 581±52 |
| | 2 нед | 629±32 | 773±20 ^{+,**} | 697±33 | 623±12 |
| Таламус | | | | | |
| Оптическая плотность иммуноокрашивания (усл. ед) | 3 сут | 0,151±0,004 | 0,156±0,004 | 0,161±0,004 | 0,151±0,005 |
| | 2 нед | 0,152±0,006 | 0,165±0,010 | 0,157±0,006 | 0,149±0,005 |
| Объемная плотность сосудов (%) | 3 сут | 2,68±0,48 | 3,13±0,44 | 3,11±0,38 | 3,15±0,16 |
| | 2 нед | 3,81±0,54 | 5,37±0,83 ^{+,**} | 4.09±0,40 | 3,01±0,21 |
| Линейная плотность сосудов (мкм/мм ²) | 3 сут | 7700±948 | 8013±750 | 7841±669 | 8299±588 |
| | 2 нед | 8221±751 | 9033±552 | 8927±419 | 8160±453 |
| Количество сечений сосудов на 1 мм ² | 3 сут | 763±38 | 808±43 | 728±49 | 742±79 |
| | 2 нед | 677±25 | 736±30 | 713±19 | 757±43 |



а

б



в

г

Рис. 1. Гистологический рисунок сосудистого русла в сенсомоторной коре в контроле (а), на 3-и сутки после травмы (б), на 3-и сутки на фоне действия базисной терапии (в) и через 2 недели (г) после комплексного лечения с введением МСК взрослого организма. Окрашивание на иммуноглобулины. Метод биотин-стрептавидин-пероксидазного комплекса, диаминобензидин, ×140.

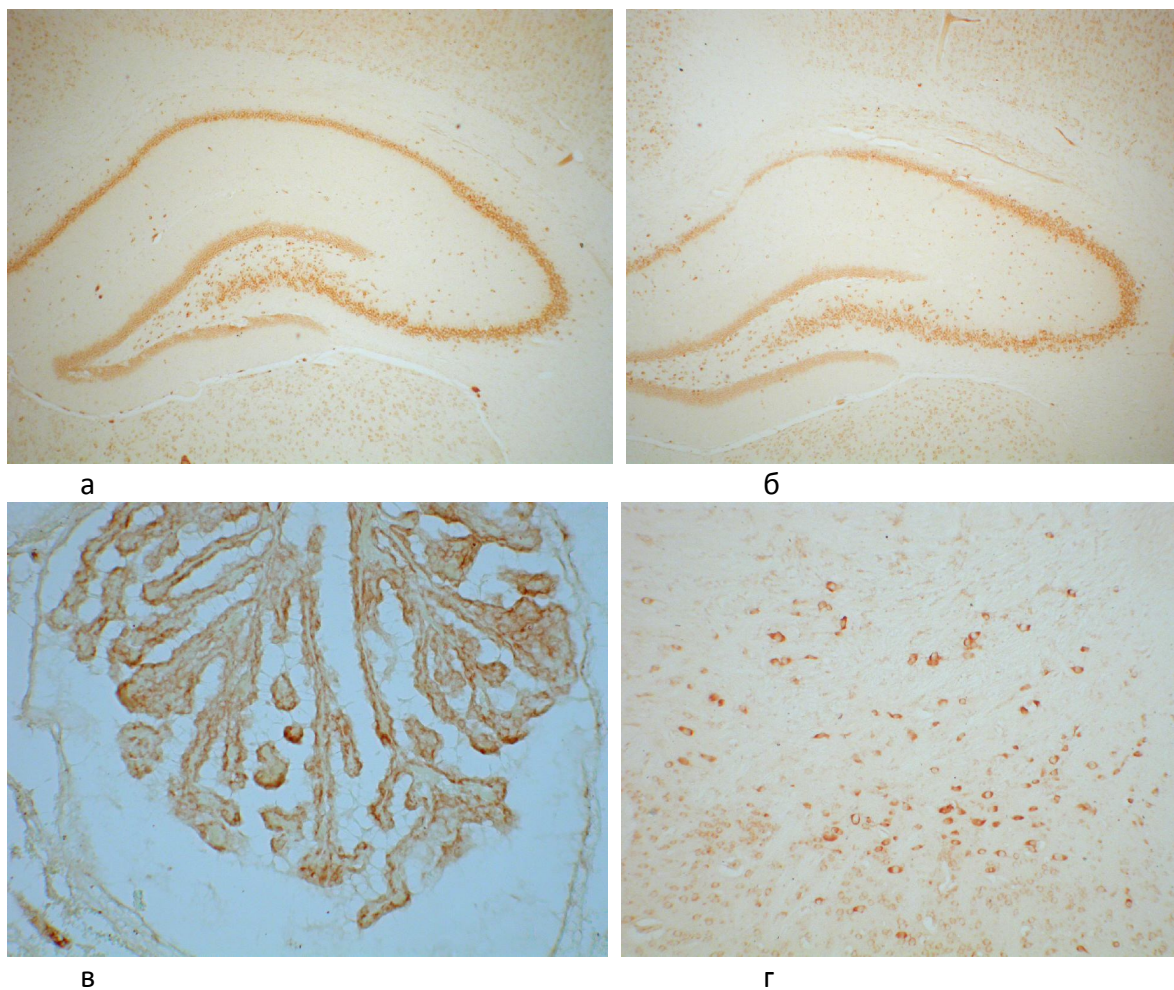


Рис. 2. Экспрессия фактора роста эндотелия сосудов в нейронах пирамидных слоев гиппокампа в контроле (*а*), через 2 недели после травмы (*б*), на 3-и сутки после базисной терапии в эпителии сосудистого сплетения 3-го желудочка (*в*) и на 3-и сутки после базисной терапии и введения фетальных МСК в ядерном образовании таламуса (*г*).
 Метод биотин-стрептавидин-пероксидазного комплекса, диаминобензидин, $\times 30$ (*а, б*), $\times 140$ (*в*), $\times 70$ (*г*).

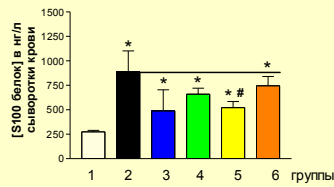


Рис. 1. Через 3 дня после экспериментальной ЧМТ

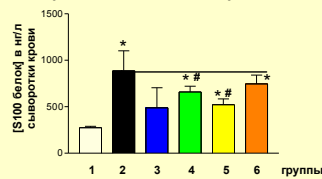


Рис. 2. Через 2 недели после экспериментальной ЧМТ

- 1- контроль
 - 2- ЧМТ
 - 3- ЧМТ+БТ
 - 4- ЧМТ+БТ+МСК
 - 5- ЧМТ+БТ+ФМСК
 - 6- ЧМТ+БТ+ФНСК
- * - достоверно с контролем
 - # - достоверно с ЧМТ

Рис.3. Содержание белка S100 в сыворотке крови крыс после экспериментальной ЧМТ

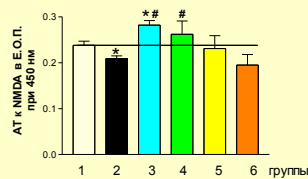


Рис. 1. Через 3 дня после экспериментальной ЧМТ

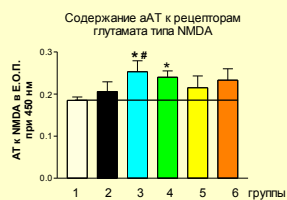


Рис. 2. Через 2 недели после экспериментальной ЧМТ

- 1- контроль
 - 2- ЧМТ
 - 3- ЧМТ+БТ
 - 4- ЧМТ+БТ+МСК
 - 5- ЧМТ+БТ+ФМСК
 - 6- ЧМТ+БТ+ФНСК
- * - достоверно с контролем
 - # - достоверно с ЧМТ

Рис.4. Содержание aAT к рецепторам глутамата типа NMDA в сыворотке крови крыс после экспериментальной ЧМТ

Таким образом, результаты патоморфологического, морфофункционального и количественного анализа свидетельствуют, что при сочетанном действии с базовой терапией все три типа стволовых клеток человека (МСК из взрослого организма, фетальные МСК и фетальные нейральные стволовые клетки) обладают ангиогенным действием. В период регенерации нервной ткани стволовые клетки человека усиливают экспрессию фактора роста эндотелия сосудов. Наряду с этим, терапевтическое введение крысам с ЧМТ препаратов, улучшающих гемодинамику и гемореологию, а также обладающих противоотечным и антигипоксическим действием, как в виде отдельного комплекса, так и в сочетании с введением стволовых клеток различного происхождения, снижает повреждающее действие травмы на клетки мозга, что выражается в менее выраженном увеличении содержания в сыворотке крови белка S-100 и повышенном уровне содержания аАТ к рецепторам глутамата типа NMDA в ранний посттравматический период. На основании полученных данных можно полагать, что снижение степени гипоксии мозга при ЧМТ за счет стимуляции ангиогенеза стволовыми клетками в сочетании с медикаментозной терапией, сопровождается менее выраженным повреждением нервных клеток, о чем свидетельствует не столь выраженное повышение уровня белка S-100. Кроме того есть основание считать, что системное введение стволовых клеток при ЧМТ активизирует защитные механизмы, направленные на нейтрализацию глутамата, как инициатора апоптозной гибели нейронов. Такое суждение базируется на полученных нами данных, указывающих на увеличение уровня аАТ к глутаматным рецепторам под влиянием сочетанного применения медикаментозной поддержки и клеточной терапии.

В моделях повреждений головного мозга показано, что мезенхимальные и нейральные стволовые клетки, которые вводят внутривенно (системно) или интрацеребрально, мигрируют предпочтительно в травмированную область мозга [10, 11, 16-18, 20-23]. Предполагают, что в условиях ишемии среда микроокружения может экспрессировать сигналы/факторы хемотаксиса, которые направляют и способствуют вхождению циркулирующих стволовых клеток в область повреждения [31]. Однако до настоящего времени нет убедительных доказательств, что донорские клетки могут встраиваться в предсуществующие нейрональные цепи, либо образовывать новые. Есть основания полагать, что терапевтический потенциал стволовых клеток разного происхождения обусловлен широким спектром продуцируемых ими физиологически активных веществ, обладающих ангиогенным, антиапоптотическим, антиоксидантным и митогенным эффектами. Их роль в стимуляции регенеративных процессов широко обсуждается [2, 3, 6, 9, 16, 18, 21, 22, 25, 27, 31, 32]. По мнению [29], представляется более вероятным, что механизмы восстановления обусловлены не дифференцированием клеток в нейрональные фенотипы и интеграцией имплантата в поврежденный участок нервной ткани реципиента, а высвобождением трофических факторов, которые промотируют эндогенные механизмы репарации, снижают клеточную гибель и стимулируют ангио- и нейрогенез.

Черепно-мозговые травмы практически всегда сопровождаются повреждением отдельных структур мозга. После травмы, как правило, повреждаются синаптические пузырьки, входящие в пресинаптические нейроны, а их содержимое – возбуждающий нейромедиатор глутамат начинает высвобождаться в токсических дозах и воздействовать на рецепторы глутамата. В работах на культивируемых нейронах мозжечка крыс было показано, что токсические дозы глутамата вызывают ранние

повреждения нейрональной мембраны (Сорокина Е.Г. и соавт, 1999). На основании этого было сделано предположение, что подобные повреждения липидного и белкового слоев нейрональных мембран при гипоксии могут инициировать развитие аутоиммунного процесса вследствие попадания в кровяное русло через поврежденный ГЭБ структурных элементов рецепторов глутамата. Эта гипотеза нашла подтверждение в работах, в которых было показано, что при судорожных состояниях и гипоксии мозга у детей, а также при экспериментальной эпилепсии и гипоксии мозга крыс в крови увеличивается содержание аутоантител (АТ) к рецепторам глутамата (Сорокина Е.Г. и соавт., 2003; Глоба О.В. и соавт., 2003). Некоторые авторы считают, что в основе посттравматической болезни мозга могут лежать иммунологические механизмы, которые в одних случаях облегчают течение травмы мозга, а в других - вызывают дополнительное повреждение ткани мозга, способствуя развитию отека мозга (Ганнушкина И.В., 1974; Archelos, Hartung, 2000). Наиболее важное значение в посттравматических повреждениях мозга по мнению автора имеет потеря способности организма вовремя восстанавливать целостность гемато-энцефалического барьера (ГЭБ). При этом происходит повреждение структурных компонентов рецепторов глутамата, попадание их в кровь через поврежденный ГЭБ, что в свою очередь способствует активации аутоиммунных процессов. Исследования развития аутоиммунных процессов у детей, перенесших черепно-мозговую травму (ЧМТ), показали, что острый период ЧМТ у всех пациентов сопровождается гиперстимуляцией глутаматных рецепторов, преимущественно NMDA- типа (Сорокина Е.Г. и соавт.. 2008). Активация NMDA- рецепторов начинается с первых суток и, по всей вероятности, запускается повышением содержания в синаптических щелях возбуждающей аминокислоты глутамата во время сопровождающей ЧМТ гипоксии мозга. Нельзя также исключить, что раннее повышение содержания АТ в крови связано с активацией лимфоцитов, в которых также, как и в нейронах обнаружены NMDA рецепторы (Boldyrev et al., 2004; Miglio, Varsaldi, Lombardi, 2005).

Анализ данных литературы и наши собственные данные позволяют предположить, что само увеличение концентрации АТ к антигенам мозга может иметь двойственный характер - с одной стороны быть реакцией на повреждение соответствующих структур мозга, с другой стороны, АТ способны выполнять защитные функции. Последнее основывается на том, что у детей с хорошим исходом и более легкой ЧМТ уровень АТ к NMDA рецепторам значительно увеличен уже в первые сутки (Сорокина Е.Г. и соавт.. 2008). Можно предположить, что подобное раннее повышение имеет компенсаторный характер, направленный на блокаду рецептора и снижение его гиперстимуляции. Антитела могут «прикрывать» поверхностные структуры нейронов от лигандов, разрушающих структуру рецепторов или способствовать активации систем внутриклеточной сигнализации, связанных с развитием компенсаторно-приспособительных реакций. В таком контексте рассматриваются и экспериментальные данные, свидетельствующие о способности АТ к рецепторам глутамата оказывать защитное действие при инсульте и эпилепсии (During et al., 2000). В то же время более низкий уровень АТ у детей с тяжелой ЧМТ и, особенно в группе с неблагоприятным исходом, может указывать на срыв компенсаторных процессов и гибель нейронов (Сорокина Е.Г. и соавт.. 2008).

Сопоставляя результаты нашего исследования с данными литературы мы приходим к выводу о том, что клеточная терапия может рассматриваться как

перспективный компонент комплексного лечения ЧМТ. При этом одним из механизмов ее положительного влияния является стимуляция ангиогенеза, способствующая минимизации гипоксии мозга.

Цитируемая литература

1. Дамбинова С.А., Изыкенова Г.А. Аутоантитела к подтипам глутаматных рецепторов – маркеры функционального поражения головного мозга: их диагностическое значение для выявления пароксизмальной активности и ишемии. Ж. высшей нервной деятельности., 1997, т. 47, вып. 2, с. 439-446.
1. Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Пинелис В.Г., Винская Н.П., Вергун О.В., Ходоров Б.И. Механизм потенцирующего действия альбумина при токсическом воздействии глутамата: возможная роль окиси азота // Биологические мембраны. 1999. Т.16. №3. С. 318-323.
2. Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Гранстрем О.К., Косицын Н.С., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Кошелев В.Б., Фадюкова О.Е., Дамбинова С.А., Пинелис В.Г. Изучение механизмов образования аутоантител при эпилепсии и гипоксии // Нейроиммунология. 2003. Т.1. №2. С. 137-138.
3. Глоба О.В., Сорокина Е.Г., Семенова Н.Ю., Маслова О.И., Пинелис В.Г. Тест пароксизмальной активности в детской неврологии // В сб. статей «Успехи функциональной нейрхимии». С.-Петербург. 2003. С. 389-402.
4. Ганнушкина И.В. Иммунологические аспекты травмы и сосудистых поражений мозга. М.: Медицина 1974: 200 с.
5. Archelos J.J., Hartung H-P. Pathogenic role of autoantibodies in neurological diseases. Trends Neurosci. 2000: 23; 317-327.
6. Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Базарная Н.В., Мещеряков С.В., Реутов В.П., Горюнова А.В., Пинелис В.Г., Рошаль Л.М. Аутоантитела к рецепторам глутамата и продукты метаболизма оксида азота в сыворотке крови детей в остром периоде черепно-мозговой травмы. Ж. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2008. Т. 108. № 3. С.67-72.
7. Boldyrev A.A., Kazey V.I., Leinsoo T.A., Mashkina A.P. et al. Rodent lymphocytes express functionally active glunamate receptors. Biochemical and Biophysical Research Communication 2004: 324; 133-139.
8. Miglio G., Varsaldi F., Lombardi G. Human T lymphocytes express N-methyl-D-aspartate receptors functionally active in controlling T cell activation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005: 338; 4; 1875-1883.
9. During M.J., Symes C.W., Lawlor P.A., Lin J. et al. An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. Science 2000: 287; 1453-1460.

10. Dambinova S.A., Khounteev G.A., Izykenova G.A., Zavolokov I.G., Ilyukhina A.Y., Skoromets A.A. Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. Clin.Chem. 2003; 49; 10; 1752-1762.