На правах рукописи

КАРПЕНКО
ДМИТРИЙ ОЛЕГОВИЧ

РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ТРАВМИРОВАННОГО СПИННОГО МОЗГА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

(экспериментальное исследование)

14.00.22 – травматология и ортопедия
14.00.36 – аллергология и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2005

Работа выполнена в Государственном учреждении науки
Центральном научно-исследовательском институте травматологии
и ортопедии им. Н.Н.Приорова МЗ РФ

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор Степанов Георгий Агасиевич

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАМН Сухих Геннадий Тихонович

Официальные оппоненты:
доктор медицинских наук, профессор Шевелев Иван Николаевич
доктор биологических наук, профессор Лосева Елена Владимировна

Ведущая организация: Российский университет Дружбы Народов

Защита диссертации состоится «20» мая 2005 г. в 13.00.ч на заседании диссертационного совета К 208.112.01. в ГУН Центральном научно-исследовательском институте травматологии и ортопедии им. Н.Н.Приорова МЗ РФ по адресу 127299, .Москва, ул. Приорова д.10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЦИТО
по адресу: г. Москва, ул. Приорова д.10

Автореферат разослан «16» апреля 2005г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Родионова С.С.

2005-4
47789

2063398

Актуальность работы

Восстановление функций травмированного спинного мозга -- один из самых актуальных вопросов медицины и нейробиологии (Chen HY et all.,1997, Karacan I et all., 2000).

По данным зарубежной печати, на миллион жителей Земли в среднем приходится до 49 случаев травмы спинного мозга. В каждом таком случае больные остаются инвалидами на всю жизнь, что приносит страдания не только им, но и их родным и близким. Средства, затраченные на лечение и содержание одного такого больного в развитых странах Европы и Северной Америки составляют около 65 тыс. долл.

За рубежем существуют многочисленные национальные программы исследований проблемы травмы спинного мозга: Майамский Проект Лечения Паралича (США), Сотрудничество по Восстановительным Открытиям (Канада), лаборатории в Каролинском Институте (Швеция) и многие другие (Cheng H et all., 1996, Harper G.P. et all., 1996, Ramer MS et all., 2000). Координацией работы ученых всего мира занимается Международное Объединение Спинальных Исследований (International Spinal Research Trust),

Несмотря на существование различных методик хирургических операций на травмированном спинном мозге и их эффективного анестезиологического обеспечения, отдельные успехи в ведении и послеоперационной реабилитации спинальных больных, до сих пор отсутствует по настоящему эффективное воздействие на процессы восстановления структур поврежденного спинного мозга. Изучение механизмов повреждения спинного мозга и восстановления нервной ткани на молекулярном и клеточном уровне позволит найти наиболее адекватные способы вмешательства в этот процесс. Этими вопросами занимается нейробиология и смежные с ней разделы науки (Zlokovic BV, Apuzzo ML, 1997).

Травма спинного мозга отражается на функции всех органов и систем человека, что позволило применять термин «травматическая болезнь».

РОС. НАЦИОНАЛЬНАЯ
БИБЛИОТЕКА
С Петербург
2005 РК

Основные работы в исследованиях ведутся по пути поиска оптимальных условий регенерации нервных клеток и восстановления функций нервной ткани (Amar AP,Levy ML , 1999, Nicholls J.C., 1982, Privat. A , 1995).

Главная проблема в сохранении функции поврежденного спинного мозга является предотвращение вторичного повреждения его структур (апоптоза) и восстановление нервной ткани. С 80-х годов прошлого века, когда Aguoyo доказал возможность роста травмированных отростков нервных клеток (Aguayo A.J. et all., 1982) многие ученые с разных позиций изучают условия достижения стабильного и необратимого роста поврежденных волокон ЦНС. Появились многочисленные публикации об использовании в качестве трансплантатов различных биологических и искусственных материалов для замещения поврежденных нервных клеток или для создания условий регенерации и репарации нервной ткани. Используется клеточный материал (шванновские, оболочечные обонятельные, эмбриональные клетки) и другие органические материалы (коллаген, карбониловые нити, матригель, полигликоевая кислота).

Ведущая роль в изучении механизмов травмы спинного мозга и его регенерации безусловно принадлежит экспериментальным методам исследования на лабораторных животных, постольку получение таких данных в клинике у человека крайне проблематично. Не представляется возможным изучение динамики повреждения и на секционном материале в случаях острой спинномозговой травмы в связи с быстротечностью этих процессов и необходимостью забора ткани спинного мозга в ближайшее время после смерти.

Для достоверной качественной и количественной оценки процессов повреждения и регенерации необходимо использовать современные методы иммуногистохимии. Методики обнаружения маркеров регенерации позволяют точно идентифицировать процессы повреждения и регенерации,

растущие волокна как в нервной ткани, так и в сложном глиально – соединительнотканном рубце в области травмы.

Возможная корреляция результатов исследования механизмов повреждения и регенерации спинного мозга на экспериментальных животных и клинических данных является первоочередной задачей, от решения которой зависит дальнейшая возможность лечения больных с травматической болезнью спинного мозга. Кроме того, выявление общих процессов повреждения ткани спинного мозга может привести к появлению новых методов лечения практически безнадежных в настоящее время спинальных больных (Rajiv R. Ratan et all., 2001, Savitz SI, Rosenbaum DM, 1998).

Нейральная трансплантация -- многообещающий метод для лечения травматических повреждений спинного мозга, базирующийся на возможности замещения утраченных клеточных элементов и стимуляции компенсаторно-восстановительных процессов (Blesch A., Lu P., Tuszynski M.H., 2002, Bunge M.B., 2001, Lokatos A., Franklin R.J., 2002, Schwab M.E., 2002). Фетальные стволовые клетки, происходящие из мозга, наиболее пригодны для трансплантации, так как они являются потенциальным источником всех типов клеток центральной нервной системы человека, включая нейроны, астроциты и олигодендроциты (Gage F.H., 2000, Poltavtseva R.A. et all., Rossi F., Cattaneo E., 2002). Эмбриональные нейральные стволовые клетки сохраняют и размножают в культуре ткани *in vitro* и затем используют для трансплантации с целью восстановления поврежденных функций головного и спинного мозга (Aleksandrova M.A. et all., Wu S., Suzuki Y. 2002).

В настоящей работе исследовали поведение и дифференцировку культивированных фетальных стволовых/прогениторных клеток мозга человека после их трансплантации в травмированный спинной мозг у лабораторных животных.

Цель исследования:

Цель настоящего исследования -- экспериментальная разработка методики введения нейральных стволовых клеток (НСК) человека, изучение их развития и дифференцировки в спинном мозге при травме различной степени тяжести у взрослых крыс и анализ влияния НСК на посттравматические процессы.

Задачи исследования:

Для достижения цели исследования предполагалось решить следующие задачи:

1. Стандартизировать методику экспериментальной травмы спинного мозга.
2. Разработать методику введения культуры НСК в качестве биологических трансплантатов.
3. Изучить восстановление неврологических функций у животных после использования НСК в спинном мозге.
4. Провести морфологическое исследование спинного мозга при введении НСК в различные сроки после операции (до 9 месяцев).

Экспериментальную работу проводили на базе отдела экспериментальной травматологии и ортопедии [руководитель — д.м.н., Шальнев А.Н.] Государственного учреждения науки Центрального научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Н.Н.Приорова [директор — академик РАН и РАМН, профессор Миронов С.П.].

Культивирование нейральных стволовых клеток проводили в отделе клинической иммунологии [руководитель — член-корреспондент РАМН, профессор Сухих Г.Т.] Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии Российской академии медицинских наук [директор – академик РАМН, профессор Кулаков В.И.]

Морфологические исследования проводили в лаборатории экспериментальной нейробиологии [руководитель — д.б.н., Александрова М.А.] Института биологии развития им. Н.К.Кольцова Российской академии наук [директор – д.б.н., профессор Озернюк Н.Д.]

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые использованы нейральные стволовые клетки человека при исследовании экспериментальной травмы (ушиба) спинного мозга в опытах на животных.

Впервые разработана методика билатерального введения нейральных стволовых клеток в область повреждения спинного мозга в экспериментальных исследованиях с использованием стереотаксической установки и микрошприца (Hamilton), что позволяет вводить НСК в строго определенное место травмы спинного мозга и позволяет трансплантировать в зону повреждения строго определенное количество клеток. Экспериментально доказана малая травматичность прокола спинного мозга при введении клеток через микроиглу.

Морфологический анализ с применением имунногистохимических методов исследования показал жизнеспособность нейральных стволовых клеток, введенных в область травмы, в течении всего времени наблюдений, свойство клеток реципрокно мигрировать в область травмы спинного мозга, способность дифференцировки части клеток по нейрональному и глиальному типу.

Впервые в эксперименте получены данные, свидетельствующие о частичном восстановлении функции спинного мозга в результате использования НСК человека при травме спинного мозга.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАБОТЫ

Полученные в ходе работы результаты могут стать основой для дальнейшего совершенствования и разработки новых методик лечения

больных со спинномозговой травмой с использованием нейральных стволовых клеток.

Анализ результатов лечения травмы спинного мозга в эксперименте в раннем и позднем послеоперационном периоде, при максимальном сроке наблюдения до 199 суток позволил создать предпосылки для использования методики введения НСК и начала разработки показаний для применения методики при травмах спинного мозга в клинике.

Следствием применения стволовых клеток может стать возможность частичной компенсации осложнений и последствий повреждения спинного мозга. Результаты исследования показали, что в некоторых случаях возможно восстановление кожной чувствительности и улучшение двигательной активности животных. Все вышеперечисленное при разрешении использования нейральных стволовых клеток в клинике улучшит качество жизни больных со спинномозговыми травмами, и возможность самообслуживания.

Положения, выносимые на защиту

1. Нейральные стволовые клетки человека, введенные при острой экспериментальной травме спинного мозга, остаются жизнеспособными длительное время, тормозят глиальную реакцию, уменьшают возможность формирования глиального рубца, подавляют образование кист в месте травмы спинного мозга, тормозят процесс дегенерации нейронов. Часть НСК дифференцируется по нейрональному и глиальному типу.

2. Введение НСК снижает степень посттравматических осложнений у животных с травмой спинного мозга.

Апробация и реализация работы:

- на научно-практической конференции «От современной фундаментальной биологии к новым наукоемким технологиям» 11-14 ноября 2002г России, Москва.

- на конференции «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении» 22-23 мая 2003 Россия, Москва
- на симпозиуме Second Symposium on Therapeutic Applications of Human Stem and Precursor Cells. 6-8 ноября 2002г., Германия, Ганновер.
- на международном междисциплинарном семинаре «Новые технологии в медицине и экологии, интегративная медицина» январь 2003 Словения, г Высокие Татры.
- на 2-ом Московском международном Кнгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 10-14 ноября 2003 г. Россия, Москва.

Публикации

По изучаемой проблеме опубликовано 8 печатных работ.

Область внедрения

Полученные данные могут быть использованы для дальнейшей разработки методов хирургического лечения травматической болезни спинного мозга.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 131 странице: из них 96 страниц собственно текст. Содержит 52 рисунка и 4 таблицы.

Состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка использованной литературы, содержащего 169 источников, из них 41 отечественный и 128 иностранных авторов.

Материалы и методы исследования

Работа является экспериментальным исследованием.Для ее проведения были использованы лабораторные крысы породы "Вистар" весом 200 – 260 г, возрастом до 1 года.

В ходе проведения работы было оперировано 102 животных, из которых 22 крысы были использованы для отработки методики ламинэктомии и техники ушиба спинного мозга. В эксперименте было использовано 80 животных.

Операции проводили в экспериментальной операционной, с использованием операционного микроскопа и микрохирургического инструментария.

Наркоз проводили внутрибрюшинным введением 2,0 –3,0 мл 2% раствора калипсола в зависимости от веса и индивидуальной реакции животного, из расчета 50 мг/кг веса крысы.

В течение нескольких недель до формирования автоматизма мочевого пузыря 2 раза в сутки выполняли ручной массаж мочевого пузыря через брюшную стенку.

С целью профилактики инфекционных осложнений в течение недели после операции животным внутримышечно вводили ампиокс из расчета 50 мг/кг веса.

Оперативный доступ к спинному мозгу осуществляли линейным разрезом кожи в нижнегрудном отделе позвоночника. Выполняли ламинэктомию на уровне Th8-Th9 позвоночника. Спинной мозг выделяли с помощью операционного микроскопа и микрохирургической техники.

В дальнейшем выполнялись те или иные манипуляции, в зависимости от цели серии экспериментов – производили ушиб спинного мозга без введения нейральных стволовых клеток, прокол спинного мозга без ушиба и введения НСК, ушиб спинного мозга с введением НСК. После тщательного

гемостаза, рану ушивали наглухо. Животное помещали в отдельную клетку для постоянного наблюдения.

В зависимости от задачи исследования проведены 3 серии экспериментов:

– ламинэктомия и ушиб спинного мозга без введения нейральных стволовых клеток (НСК) человека (44 животных);

– прокол ткани спинного мозга с введением физиологического раствора (6 животных);

– нанесение травмы спинного мозга различной степени тяжести с последующим введением НСК (30 животных).

Первая серия опытов проведена с целью отработки методики ушиба спинного мозга (СМ), подбора и стандартизации интенсивности травмы СМ. Кроме того, морфологическая картина препарированного СМ, клиническая картина поведения животных явились контролем для исследования процессов, происходящих в травмированном СМ до 166 суток с момента травмы.

Дозированный ушиб СМ производили при помощи устройства, состоящего из стеклянной трубки, устанавливаемой вертикально и тарированного груза.

Груз представлял собой металлический цилиндр с площадью сечения на 2 мм меньше диаметра трубки. Верхний конец груза фиксировался шелковой нитью, нижний представлял собой усеченный конус с площадью поверхности 0,3 см^2. Стекло трубки позволяло свободно скользить металлическому грузу, сила трения при этом практически отсутствовала.

Интенсивность удара дозировали в зависимости от массы груза и высоты его падения.

После проведения оперативного доступа к СМ животного (ламиннэктомии) стеклянную трубка устанавливали строго перпендикулярно

к поверхности выделенного СМ. В этом положении на той или иной высоте устанавливали металлический груз конусообразным концом вниз. В момент отпускания шелковой нити груз начинал свободно падать по трубке под действием собственной силы тяжести и производил удар той или иной степени интенсивности.

Вторую серию экспериментов проводили с целью изучения влияния прокола СМ и введения обьема жидкости (стерильного физраствора) в интактный СМ как дополнительного травмирующего фактора.

Эту серию опытов проводили с использованием стереотаксической установки, представляющую собой модернезированный штатив светового микроскопа с держателем для микрошприца фирмы Hamilton. Движения установочных винтов позволяли перемещать микрошприц в трехмерном пространстве и производить прокол наружних оболочек СМ с высокой степенью точности. Шприц Hamilton позволял набирать строго определенный объем жидкости с точностью до микролитров.

После проведения оперативного доступа к СМ над операционным полем устанавливали держатель стереотаксической установки с закрепленным в нем микрошприцом, в котором содержалось 3 мкл физраствора. Установочными винтами перпендикулярно к поверхности выделенного СМ подводили иглу микрошприца. Производили прокол мягкой мозговой оболочки с введением жидкости в медуллярную ткань на глубину 2 мм.

Третью серию опытов проводили с целью изучения поведения нейральных стволовых клеток, введенных в травмированный спинной мозг животного и их влияние на развитие травматической болезни. На основе методов нанесения тарированного ушиба СМ и введения физиологического раствора в СМ была разработана и применена методика введения НСК в травмированный участок СМ. Вводимые нейральные стволовые клетки культивировались по оригинальной методике в отделе клинической

иммунологии Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии Российской академии медицинских наук.

После проведения оперативного доступа к СМ под контролем операционного микроскопа производили дозированный ушиб медуллярной ткани спинного мозга по описанной выше методике. Трансплантацию культивированных нейральных стволовых клеток проводили с использованием стереотаксической установки в которую закрепляли микрошприц (Hamilton). Клетки вводили билатерально на расстоянии 5 мм от эпицентра травмы на глубину 2 мм, в количестве 600000 кл в объеме 3 мкл.

В работе применялись клинический, гистологический и иммуногистохимический методы исследования.

Для динамического контроля восстановления двигательных функций задних конечностей животных ежедневно тестировали, начиная со 2-ой недели после операции, на стенде, представляющем собой металлическую решетку с размерами ячеек 8x14 см.. Способность оперированных животных переступать с одной перекладины на последующую говорила о той или иной степени восстановления двигательных и нейральных функций мышц задних конечностей. Способность же захватывать пальцами задних конечностей перекладину свидетельствовало о восстановлении тонкой моторики.

Ежедневно проводили мониторинг восстановления функций мочевыделения. Фиксировали степень наполнения мочевого пузыря, количество и цвет выделяемой мочи.

С целью морфологических исследований оперированных крыс на 1-е, 5-е, 15-е, 30-е, 60-е сутки после эксперимента и в более поздние сроки (до 166 суток) наркотизировали хлоралгидратом, и перфузировали транскардиально 4% параформом на фосфатном буфере. Спинной мозг извлекали и помещали в фиксатор на 24 часа, а затем в 30% сахарозу при +4 С. На криостате делали срезы 20-40 мкм толщиной и натягивали на стекла. По люминисцентному свечению клеток, окрашенных бисбензимидом,

отбирали срезы с трансплантированными клетками. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином, суданом-3, крезилвиолетом, а также иммуногистохимическими методами с применением различных первичных антител.

После этого обрабатывали раствором биотинилированных вторичных антител и окрашивали раствором стрептавидина, меченого флуоресцентным красителем или авидин-биотин-пероксидазного комплекса с последующим проявлением пероксидазы диаминобензидином. При двойном иммуноцитохимическом окрашивании использовали вторичные антитела, меченые флюоресцентными красителями. Препараты просветляли 50 % раствором глицерина в фосфатном буфере и рассматривали срезы в свете люминисценции или при комбинированном освещении.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии опытов с нанесением тарированного удара без введения НСК было прооперированно 44 белых крыс. Спинной мозг 34-х крыс был подвергнут воздействию удара с высоты 6 см, 10-ти животным удар производился с высоты 12,5 см.

Непосредственно после травмы в области нанесения ушиба наблюдался отек мозговой ткани, мелкие кровоизлияния под мягкой мозговой оболочкой, иногда тромбоз, разрыв задней спинальной артерии. В 5 случаях произошел разрыв мягкой мозговой оболочки с пролабированием медуллярной ткани.

Из 34 животных, перенесших травму средней степени тяжести, погибло 14 животных (41,17%) на 8-19 сутки от спинального шока, прогрессирующей инфекции мочевыводящих путей и прогрессирующего паралича. Из 10 животных с тяжелой степенью ушиба СМ погибло 5 животных (50%) из них 3 крысы – на 1-е, 2-е, 6-е сутки без позитивной динамики неврологического статуса. 2 погибли на 13-е и 17-е сутки со слабовыраженными рефлекторными движениями задних конечностей. Причина их гибели – прогрессирующий паралич.

25 выживших животных (20 с травмой средней тяжести и 5 с тяжелой травмой) были зафиксированы в лаборатории экспериментальной нейробиологии Института биологии развития РАН (ЛЭН ИБР РАН) на сроках наблюдения от 1 до 166 сут. В качестве контрольных животных были выбраны животные со стандартизированной травмой средней степени тяжести, наносимой грузом весом 10 г и высотой падения 6,5 см.

У 4-х животных, зафиксированных в 1-е сутки наблюдений, восстановления функций мочеиспускания и движений задних конечностей не произошло. Морфологические исследования показали следующее. У животных со времени фиксации 5-6 часов после эксперимента наблюдается сходная морфологическая картина травматического повреждения спинного мозга. Зона области повреждения размером 2-2,5 мм. Обширная зона кровоизлияний по всей поверхности среза на уровне дорзальных рогов спинного мозга и до уровня вентральной комиссуры. Есть участки механического повреждения ткани спинного мозга. Деградации миелиновых оболочек у поврежденных проводящих волокон не выявлено. Наблюдается инфильтрация лимфоцитов в областях повреждения и кровоизлияний. Глиальной реакции нет. В зоне повреждения нейроны не окрашиваются крезилвиолетом и здесь видна зона «пустоты» с отдельными кровеными клетками и глиальными элементами. В пограничных областях (проксимальном и дистальном) видны механически поврежденные нейроны, дегенерирующие нейроны и клетки тени. Далее от места повреждения располагаются гиперхромные и вакуолизированные крупные нейроны, а для интернейронов характерно слабо окрашенное бледное ядро, которое слабо контурируется в цитоплазме. В зоне практически нет нормальных нейронов, встречаются клетки в стадии гиперхромии, часть клеток имеет округлые контуры, что характерно для начальных стадий дегенерации отростков .

У 3-х животных со сроком наблюдения 5 суток на 3-е и 4-е сутки восстановились только рефлекторные движения задних конечностей. У 2-х (зафиксированных на 6 сутки) на 2-е сутки появлялись рефлекторные

движения в ответ на болевой раздражитель на одной из задних лап. У этих животных область повреждения спинного мозга составила от 5 до 8 мм. Выраженный некроз участков ткани в зоне механического повреждения. Начальная фаза формирования кист. Мелкие полости уже отчетливо выражены и часть из них сливаются в более крупные. По периферии травматической зоны начинается глиоз и идет развитие рубцов. В месте травмы окрашенных крезилвиолетом нейронов нет, только лимфоидные и астроцитарные клетки. Значительная часть моторных нейронов в различных стадиях дегенерации. Много дегенерировавших нейронов, сморщенные нейроны, клетки в состоянии хроматолиза, клетки тени. Формирование кист наблюдается и в областях кровоизлияний. Сильнейшая инвазия лимфоцитарных клеток.

У крысы со сроком наблюдения 15 суток частичное восстановление утраченных функций без дальнейшей динамики произошло на 3-е сутки Из двух крыс, зафиксированных на 16-е сутки, у одной из них функции мочеотделения частично вернулись к 5 суткам. У второй восстановления функций не произошло. На гистологических препаратах СМ тотальной деструкции ткани спинного мозга в области повреждения не наблюдается, хотя уже выявляются очаги деградации миелина. Видна область травмы с мелкими кистами и глиозом. Область повреждения СМ около 1,2 мм. В сером веществе, над областью вентральной комиссуры четко выражена зона глиоза. Обнаруживаются нервные клетки различных типов в различных стадиях патологических изменений. В другом случае видно повреждение ткани спинного мозга на протяжении 5 мм. В области повреждения идет формирование кист. Значительные зоны некроза. Отчетливая лимфоцитарная реакция, множество макрофагов в областях кровоизлияний. В областях поврежденных проводящих волокон наблюдается дегенерация, которая сопровождается деструкцией миелина с образованием жировых капель. В этих же зонах идет формирование глиального рубца. Сохраняется множество лимфоцитов и глиальных клеток в области травмы. Нейроны

вокруг зоны повреждения в разных фазах патологических изменений. Наиболее характерные изменения выражаются в хроматолизе или гиперхромии.

У животного со сроком наблюдения 31 сутки полное восстановление функции левой задней конечности произошло к 25 суткам, восстановление мочеиспускания – к 10 суткам, что связано с автоматизмом мочеотделения. Функция задней правой конечности не восстановилась.

У 8-и крыс с большими сроками наблюдений (138 --166 суток) полного восстановления двигательных функций задних конечностей и мочеиспускания не произошло. У этих животных травма мозга распространяется до 8 мм. Обширная зона некротической ткани, четко выражен глиальный рубец. Множественные кисты. Вокруг травмы области с макрофагами, что свидетельствует о незаконченном воспалительном процессе. Нейроны в проксимальном и дистальных отделах в состоянии дегенерации.

Определенный интерес вызывает картина повреждения при тяжелой степени травмы (вес 10 г, высота 12,5 см). Уже в первые сутки на гистологическом препарате наблюдается область травматического повреждения размером 5-6 мм. Механическое повреждение волокон и клеток выражено значительно больше, чем при травме средней тяжести. В зоне повреждения много очагов обильного кровоизлияния в области ткани мозга и под твердой мозговой оболочкой. Сильная инвазия лимфоцитов по всей области травмы. Наблюдается выраженный отек мозговой ткани. В дистальном и проксимальном отделах двигательные нейроны веретеновидные, сплюснутые, гиперхромные с нечеткими контурами ядер. Отдельные интернейроны в состоянии дегенерации (сморщенные ядра, вакуолизированная цитоплазма), встречаются клетки тени. В крупных нейронах по периферии области травмы встречаются пикнотические ядра.

Во второй серии контрольных опытов с проколом спинного мозга и

введением физиологического раствора без нанесения травмы и без введения НСК было оперировано 6 животных. У всех животных произошло полное восстановление утраченных функций уже на 3-5 сутки наблюдений.

Гистологический анализ выявил, что в спинном мозге всех животных практически не определяется область введения физиологического раствора. Не было отмечено глиальной реакции и развития кист. Ткань спинного мозга выглядит нормально. У двух животных выявлена незначительная лимфоцитарная реакция, в областях повреждения кровеносных сосудов.

В третьей серии с нанесением стандартизированного тарированного удара средней степени тяжести и с введением НСК было оперировано 30 крыс.

8 крыс (26,6% от общего числа животных с НСК) погибли в различные сроки после операции. Из них 1 погибла от передозировки наркоза на 1-е сутки, 4 – без признаков восстановления функций на 3-е, 9-е и 13-е сутки после операции от прогрессирующего паралича. У 3-х животных со сроками наблюдения 10-11 суток на 3-4-е сутки появились рефлекторные движения задних конечностей в ответ на раздражение.

Выжило 22 крысы с НСК, которые были зафиксированы в ЛЭН ИБР РАН для морфологического анализа.

У 2-х со сроками наблюдений 5 и 6 суток восстановления не произошло. У 1 животного со сроком наблюдения 5 суток к 3 суткам появились только слабые рефлекторные движения в правой задней конечности.

В этих случаях на препаратах спинного мозга были выявлены значительные участки повреждения ткани и обширные зоны кровоизлияния. Иногда наблюдался полный перерыв волокон, среди которых располагались геморрагические очаги. Во всех случаях по краям области механического повреждения ткани наблюдались очаги новообразования сосудов. Трансплантированные клетки, выявленные окраской Hoechst и антителами к

ядрам человека, располагались во всех структурах, расположенных по ходу прохождения инъекционной иглы. Плотность распределения трансплантированных клеток уменьшалась с удалением от места инъекции. Клетки мигрировали среди волоконных путей в дистальном и проксимальном направлениях, вдоль сосудов, частично располагались в клеточных зонах и в области повреждения среди клеток крови. Иммуногистохимическая окраска с использованием антител к Human Nestin показала, что среди трансплантированных клеток сохраняются истинно стволовые клетки. Нестин- позитивные клетки располагались единично или группами по краям области повреждения и имели длинные отростки.

Из 2-х животных со сроком наблюдения 15 суток у одного появились рефлекторные движения в правой и левой задних конечностях к 10-м и 8-м суткам соответственно. У второго – полное восстановление утраченных функций к 3 суткам наблюдения.

На препаратах СМ окраска антителами на Human Nuclei показала группы и единично расположенные клетки трансплантатов. Окраска антителами к Human Nestin выявила среди трансплантированных клеток стволовые клетки. Часто наблюдалась картина группирования нестин-позитивных стволовых клеток с длинными отростками вокруг сосудов. Часть нестин- позитивных клеток мигрировала от места введения по ткани мозга реципиента. Глиальная реакция была незначительной и не наблюдалось формирования кист.

У 2-х животных со сроками 30 суток полное восстановление наступило на 10-е и 15-е сутки. У 2-х крыс со сроками наблюдений 33 суток полное восстановление функций произошло к 8-м и 20-м суткам.

Гистологический анализ препаратов окрашенных крезилвиолетом показал, что в этих случаях зона повреждения была от 3-4 мм до 6-7 мм. Во всех случаях не наблюдалась отечность ткани и формирование кист. В зоне травмы отсутствовали нейроны и была выражена глиальная реакция, однако не было обнаружено очагов формирования глиальных рубцов. В зонах

повреждения располагалось большое число мелких новообразованных сосудов. В дистальных и проксимальных отделах нейроны (двигательные, интернейроны) имели нормальную морфологическую структуру. На всех препаратах спинного мозга реципиентов были выявлены трансплантированные культивированные клетки, окрашенные Hoechst. Двойная иммуногистохимическая окраска антителами на Human Nuclei и нестин показала, что вокруг области травмы располагались трансплантированные клетки. При окраске антителами к GFAP или антителами к Vimentin было показано, что часть пересаженных клеток дифференцировались по глиальному типу. Значительное число имплантированных клеток сохранялось в недифференцированной форме, что было показано с использованием антител к Human Nestin. Скопления стволовых клеток располагались около сосудов и практически не обнаруживали миграции в окружающую ткань, что было четко выражено в случае, где повреждение было слабым.

Из 9-ти крыс со сроками наблюдения 60 дней полное восстановление всех функций произошло лишь у 2-х животных – на 9-е и 17-е сутки. У 2-х животных частичное восстановление движений задних конечностей без восстановления мочеиспускания наступило к 6-м и 7-м суткам наблюдения. У остальных 5 крыс наблюдалось восстановление функции мочевыделения и неполное восстановление функций задних конечностей в различной степени в сроки от 8 до 20 суток .

Иммуногистохимические исследования с антителами на ядра клеток человека показали, что клетки трансплантатов располагались единично и группами. Клетки мигрировали среди волокнистых путей в дистальном и проксимальном направлениях, вдоль сосудов канала спинного мозга, частично распределялись в клеточных зонах и в области повреждения среди клеток крови. В некротических очагах многие трансплантированные клетки дегенерировали. Окраска антителами к нестину человека показала, что среди трансплантированных клеток сохранялись стволовые клетки. Отдельные

нестин- позитивные клетки широко мигрировали от места введения по ткани мозга реципиента, другие группировались вокруг сосудов. Часть трансплантированных клеток начинала дифференцировку, о чем можно было судить по экспрессии виментина и глиального белка. Во всех случаях при трансплантации культивированных стволовых клеток в области травмы наблюдалась активная реваскуляризация и не происходило формирования кист .

Из 2-х животных со сроками наблюдений 105 суток у одной произошло полное восстановление утраченных функций ко 2-м суткам. Поведенческий контроль: активна на лесенке, опирается на обе ноги и нормально держится пальчиками. Область травмы составила 1,5-2 мм, повреждены волокна с левой стороны спинного мозга. Небольшая зона глиоза, без глиального рубца. Кист в области травмы нет. Трансплантированные клетки определяются в обоих местах введения – проксимально и дистально к области травмы. В области введения много трансплантированных клеток окрашенных Human Nuclei, где не формируется глиальный рубец.

У второй крысы самостоятельное мочеиспускание восстановилось на 10-е, а неполная опора левой задней лапы – на 15-е сутки. Отмечается горб на спине, что связано, очевидно с нестабильностью позвоночного столба. Поведенческий контроль: на лесенке - правая задняя лапка практически не работает, левая атоничная, но пальчиками прихватывает, быстро утомляется. На веревке и на палочке не держится правой ногой, только левой задней. При морфологическом исследовании область травмы 11,5 мм. С правой стороны полной перерыв волоконного пути, почти на весь поперечник спинного мозга. Значительные расширения спино- мозгового канала в области травмы. Трансплантированные клетки определяются с обеих сторон травмы. Часть клеток дифференцируется по нейронному типу, что определено антителами к III-beta-tubulin. В области травмы значительный глиоз и достаточно плотный слой глиальных волокон. Часть глиальных клеток происходят из

трансплантированных клеток, что показано двойной меткой на GFAP и Hoechst.

У крысы со сроком наблюдения 114 суток восстановление опорности правой задней конечности происходило в сроки от 6-х до 10-х суток, левой задней – от 10-х до 15-х суток, самостоятельное мочеиспускание восстановилось к 15 суткам. Поведенческий контроль: на лесенке тащит левую заднюю лапу, не опирается. Пальчиками не работает на обеих ногах. При положении вниз не держится ногами. В этом случае произошло нарушение техники введения НСК, клетки были введены только в проксимальный отдел травмированного участка СМ.

У животного со сроком наблюдения 119 суток восстановление опорности правой задней конечности происходило в сроки от 2-х до 3-х суток, левой задней – от 2-х до 8-х суток, самостоятельное мочеиспускание восстановилось к 8 суткам. Поведенческий контроль: На лесенке хорошо опирается на лапы и держится всеми пальчиками. Морфологический анализ показал, что область повреждения 5 мм, у поверхностных слоев перерыв волокон на левой стороне спинного мозга. В области травмы умеренная глиальная реакция без образования грубого рубца. Нервные клетки по сторонам от травмы морфологически нормальные. Кист в области травмы практически нет (отдельные мелкие). Трансплантированные клетки обнаружены в обоих местах введения. По люминисцентному свечению видна миграция клеток от области введения. Антитела к Human Nuclei выявили в области введения клетки, экспрессирующие этот белок. Клетки с экспрессией нестина не обнаружены.

При анализе исходов экспериментальных операций учитывалась выживаемость животных, длительность восстановления или появление функций мочевыводящей системы и движений задних конечностей, наличие осложнений и связанная с ними гибель животных. Ведущим критерием

наших исследований служила морфологическая картина травмированного спинного мозга, изменяющаяся под воздействием вводимых НСК.

В первые несколько суток у животных без введения и с введением НСК сходны. Везде наблюдается картина катастрофической травмы с участками механического повреждения ткани спинного мозга, зон кровоизлияния, инфильтрации лимфоцитов в областях повреждения, поврежденные, раздробленные и дегенерирующие нейроны и клетки ткани, а также признаки начальных стадий дегенерации аксонов. Однако, начиная с 5 суток, морфологическая картина начинает отличаться.

Уже на 5-е сутки в СМ без НСК появляется выраженный некроз медулярной ткани, начинается формирование мелких кист, часть из которых уже сливается в более крупные. Наблюдается обильная инвазия лимфоцитарных клеток. По периферии травмированного участка начинается формироваться вал глиальных клеток. Продолжается дегенерация моторных нейронов. В отличии от них с НСК по краям области некроза наблюдались очаги новообразования сосудов.

К 15-м суткам у животных без НСК начинают выявляться очаги деградации, сопровождающейся деструкцией миелина и образованием жировых капель миелина, мелкие кисты все более сливаются в более крупные. В очаге травмы нейроны в различных фазах патологических изменений. Зона глиоза становится более четко выраженной. Зона некроза расширяется. Лимфоцитарная реакция более выражена. У животных с НСК глиальная реакция незначительная, кисты не формируются. Наблюдалась группирование введенных стволовых клеток с длинными отростками вокруг сосудов СМ. К 30-м суткам отечности и кист не наблюдалось. Глиальная реакция выраженная, но рубца не образовывалось. Наблюдалось большое число мелких новообразованных сосудов, не происходило дальнейшей дегенерации нейронов. Часть пересаженных клеток начинала дифференцироваться по нейрональному и глиальному типу. В случаях со

слабым ударом стволовые клетки концентрировались вокруг сосудов. НСК мигрировали вдоль сосудов и волоконных трактов.

К 166 суткам без НСК функции задних конечностей не восстановились. Волоконный путь в месте травмы полностью прерван глиальным рубцом. В случае с более сильной травмой к 167-м суткам функции мочевыделения и задних конечностей не восстановились, что связано с формированием грубого соединительно-тканного глиального рубца. В другом случае, на 162 сутки восстановились лишь рефлекторные движения задних конечностей. В обоих случаях наблюдались обширная зона некроза, четко выраженный глиальный рубец, множество кист, незавершенный воспалительный процесс.

У животных с НСК на поздних сроках наблюдения более 100 суток наблюдалось значительное восстановление функций задних конечностей и полное восстановление мочеиспускания. Зона глиоза без формирования рубца. Кисты в области травм не обнаруживались или обнаруживались единичные, малых размеров. НСК дифференцировались в нейроны и глию. В одном случае, где клетки были введены только в одном месте, наблюдалось образование кисты. В другом из-за нестабильности позвоночного столба, нарушилась его фронтальная ось, клетки не дошли до места травмы и сформировался глиальный рубец.

Укол в СМ с введением физиологического раствора показал, что он не является заметной травмой для СМ. Функции СМ восстанавливаются в течении до 5 суток. Факт прокола СМ не влияет на динамику клинической картины течения травматической болезни. Гистологическая картина при уколе характеризовалась лишь умеренной лимфоцитарной реакцией в местах повреждений кровеносных сосудов.

Таким образом, можно заключить, что культивированные стволовые клетки мозга человека трансплантированные в спинной мозг крыс после нанесения механической травмы, переживали и сохраняли способность к миграции и дифференцировке. Трансплантированные клетки мигрировали вдоль волокон, сосудов и обнаруживались в зонах некроза. Среди

имплантированных клеток сохранялись нестин-положительные стволовые клетки не начавшие дифференцировку. Интересно, что нестин-положительные стволовые клетки могли формировать плотные группы и мигрировать по ткани мозга реципиента. Было обнаружено, что плотные скопления стволовых клеток характерны для случаев, где наблюдалась слабая травма спинного мозга. Это могло быть связано с недостатком факторов "травмы", которые стимулируют миграцию и дифференцировку.

Скопления стволовых клеток, как правило, наблюдались вокруг кровеносных сосудов.

Часть трансплантированных клеток начинала дифференцировку в нейроны и глию, о чем можно было судить по экспрессии виментина, бета-тубулина-3 и ГКФБ.

Во всех случаях, при трансплантации культивированных стволовых клеток наблюдалась активная реваскуляризация и не происходило формирования кист в области травмы, что было характерно для животных контрольной группы. Это свидетельствовало о том, что нейральные стволовые клетки человека оказывали положительное влияние на посттравматические процессы в спинном мозгу взрослых крыс.

На основании результатов проведенной экспериментальной работы, доказывающей факт сохранения и дифференцировки введенных стволовых клеток, положительных клинических результатов в эксперименте, а также исходя из типов и характера позвоночно-спинномозговой травмой (ПСМТ); вида, уровня и степени повреждения спинного мозга; периода течения ПСМТ; характера осложнений и последствий ПСМТ можно предложить возможность использования методики введения НСК в клинической практике.

ВЫВОДЫ

1. Динамика восстановления функции спинного мозга животных после травмы зависит от степени повреждения ткани спинного мозга. Смертность при ушибе спинного мозга прямо пропорциональна силе механического воздействия.
2. Механическая травма спинного мозга тяжелой степени вызывает сильнейшее травматическое поражение спинного мозга с формированием кист, грубоволокнистого глиального рубца и распадом миелиновых оболочек поврежденных волокон спинного и длительно текущей (до 130 суток) воспалительной реакцией.
3. При механической травме средней степени стадия воспаления длится в течение 14-20 дней, после чего область травмы освобождается от кровяных элементов и миелинового детрита и замещается реактивными астроцитами. Кисты и глиоз в разной степени у разных животных сохраняются в течении 4-5 месяцев после травмы.
4. Нейральные стволовые клетки человека, трансплантированные билатерально в области нанесения механической травмы, сохраняют жизнеспособность до 115 суток после пересадки, способны мигрировать вдоль волокон и сосудов и обнаруживаются в зонах некроза.
5. Дифференцировка части трансплантированных клеток в нейроны и глию, подтверждается экспрессией виментина, III-бета тубулина и глиального белка.
6. Трансплантация культивированных стволовых клеток в область травмы приводит к активной реваскуляризации и практически блокирует формирование кист.

Публикации:

1.Ксенотрансплантация культивированных стволовых клеток человека на модели поврежденного спинного мозга у крыс. // Бюллетень экспериментальной биологи и медицины 2003г.,т.135,№4, ст. 466-470. (соавт. Г.А.Степанов, М.В. Марей, М.А. Александрова, О.В. Подгорный Р.А. Полтавцева, А.В. Ревищин, Г.Т. Сухих.)

2.Xenotransplantation of Human Embrionic neural Stem Cels into Cerebrum and Spinal Cord of Adult Rats. // Experimental hematology. n 31 №7 Sopp 1, 2003 (mit Aleksandrova M., Poltavtseva R., Ayvazyan A., Revishin A., Podgorny O., Stepanov G., Aprikyan A., Sukhikh G.)

3.Иммуногистохимическое исследование фетальных стволовых/прогениторных клеток мозга человека трансплантированых в травмированный спинной мозг взрослых крыс. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.2004 г. том 137, №3 ст.471-475. (соавт. О.В. Подгорный, М.В. Марей, Г.А. Степанов, М.А. Александрова, Р.А. Полтавцева, А.В. Ревищин, Г.Т. Сухих.

4.Возможности использования комбинированных биологических трансплантатов при острой травме спинного мозга (экспериментальное исследование). // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н.Приорова 2004г. №1, ст 4-8. (соавт. С.П.Миронов, Г.А.Степанов, Г.Т.Сухих, И.Г.Гришин, В.В.Троценко, А.И.Крупаткин, А.Ю.Моргунов, М.А.Александрова, М.Марей, Р.А.Полтавцева, А.В.Ревищин, О.В.Подгорный).

5.Трансплантация нейральных стволовых/прогениторных клеток человека в головной и спинной мозг взрослых крыс. // Материалы

конференции «От современной фундаментальной биологии к новым наукоемким технологиям» 11-14 ноября 2002 г, г. Пущино. ст.46 (соавт. Александрова М.А., Полтавцева Р.А., Ревищин А.В., Подгорный А.В., Черкасова Л.В., Клещинов В.Н., Степанов Г.А., Корочкин Л.И., Сухих Г.Т.)

6. Трансплантация нейральных стволовых/прогениторных клеток человека в головной и спинной мозг взрослых крыс. // Материалы Международного междисциплинарного семинара «Новые технологии в медицине и экологии, интегративная медицина» январь 2003 Словения, г Высокие Татры. ст.100 (соавт. Александрова М.А., Полтавцева Р.А., Ревищин А.В., Подгорный О.В., Черкасова Л.В., Степанов Г.А., Сухих Г.Т.)

7. Transplantation of Neural Stem/Progesteron Cels into Forebrain and Spinal Cord of Adult Rats // Second Symposium on Therapeutic Applications of Human Stem and Precursor Cells. 6-8 November Hannover, Germany (mit Aleksandrova M.A, Poltavtseva R.A., Revishchin A.V., Podgorniy O.V., Stepanov G.A., Korochkin L.I., Sukhikh G.T., Viktorov I.L.).

8. Трансплантация культивированных фетальных клеток мозга человека в поврежденный спинной мозг взрослых крыс. // Материалы 2-го Московского международного Конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 10-14 ноября 2003 г. Россия, часть 1, ст. 129 (соавт. Александрова М.А., Подгорный О.В., Ревищин А.В., Полтавцева Р.А., Марей М.В., Степанов Г.А., Корочкин Л.И., Сухих Г.Т.).

Типография ООО «Телер»
127299 Москва, ул. Космонавта Волкова, 12
Лицензия на полиграфическую деятельность ПД № 00595
Подписано в печать 4.04.2005 г. Формат 60x90 1/16. Тираж 100 экз.
Бумага «Снегурочка» 1,5 печ.л. Заказ № П 225

РНБ Русский фонд

2005-4
47789

2561

22 АПР 2005