

УДК 616.858-089.843:611.013.395:611.018.26]-092.9

*В.А. Пятиков, М.А. Мсаллам, Е.А. Щегельская,
Г.И. Губина-Вакулик, Т.В. Горбач*

Харьковский национальный медицинский университет

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПАРКИНСОПОДОБНОМ СИНДРОМЕ У КРЫС

Показано, что билатеральная деструкция SN с помощью введения 6-ОНДА вызывает у крыс развитие паркинсоноподобного синдрома с характерными двигательными проявлениями (монотонные движения головой, вертикально поднятый хвост, «горбоподобный» изгиб туловища и потеря массы) и снижение уровня дофамина в крови и во фронтальной коре. Внутривенное введение мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека при паркинсоноподобном синдроме у крыс способствует восстановлению движений на 9–15-е сутки, нормализует уровень дофамина в крови и во фронтальной коре на 10-й день, приводит к появлению вблизи зоны SN скопления пигментированных клеток.

Ключевые слова: паркинсоноподобный синдром, мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека, поведение крыс, морфологические изменения, уровень дофамина.

Болезнь Паркинсона (БП) – одна из самых частых форм первичных хронических нейродегенеративных заболеваний, поражающих главным образом людей пожилого и старческого возраста [1].

Возможность лечения БП с помощью клеточной терапии была продемонстрирована в экспериментах по нейротрансплантации на разных моделях БП у грызунов [2–6]. Модель, выбранная нами для исследования, основана на введении в структуры головного мозга грызунов нейротоксина 6-гидроксидафамина (6-ОНДА), блокирующего синтез дофамина в эндогенных дофаминергических нейронах, что приводит к развитию характерной для БП симптоматики. Данная модель паркинсоноподобного синдрома (ПС) является устойчивой и простой в использовании, что позволяет ей занимать важнейшее место в арсенале экспериментальной нейрохирургии [7].

В 1964 г. была описана популяция клеток, полученная из фрагментов жировой ткани придатка яичка крыс путем обработки ее протеолитическими ферментами и центрифугированием [8]. Она включала в себя различные

группы мононуклеарных клеток (моноциты, макрофаги, эндотелиоциты, фибробласты, перициты, гладкомышечные клетки, преадипоциты) и была названа стромальной васкулярной фракцией (Stromal Vascular Fraction). Впоследствии предшественники адипоцитов были выделены также из фрагментов жировой ткани человека [9].

Однако к углубленному изучению и практическому применению этого типа стволовых клеток пришли только в последние годы благодаря усовершенствованию технологий липосакции и клеточного культивирования, позволивших выделять клетки с мультипотентными свойствами из обработанного липоаспирата [10].

Сегодня в литературе можно встретить различные названия этой группы клеток. Например, термины «стволовые клетки жировой ткани» (Adipose Tissue Stem Cells), «стволовые клетки из жировой ткани взрослого организма» (Adipose-Derived Adult Stem Cells) и «клетки из обработанного липоаспирата» (Processed Lipoaspirate Cells) указывают на их источник [11, 12].

© В.А. Пятиков, М.А. Мсаллам, Е.А. Щегельская и др., 2014

В одной из работ значительное снижение выраженности моторной симптоматики, характерной для БП, было отмечено после трансплантации животным-реципиентам мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга (КМ). Некоторые экспрессирующие тирозингидроксилазу клетки, являющиеся производными МСК КМ, мигрировали к черной субстанции (*substantia nigra* – SN). Следует отметить, что гипотезу о том, что донорские МСК лучше выживают в месте, подвергнутом токсическому действию 6-ОНДА, чем в интактном, высказывали и ранее. Отмечалось также, что такие клетки способны мигрировать в пораженную действием 6-ОНДА половину головного мозга. Аналогичный эффект был достигнут при трансплантации модельным животным (крысам) МСК человека [13]. Благодаря простоте получения жировой ткани (ЖТ) человека, малоинвазивности таких операций и высокой способности к размножению *in vitro* МСК ЖТ могут также оказаться перспективным источником стволовых клеток для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Целью данной работы явилось изучение эффективности внутривенного введения МСК ЖТ человека при ПС на основе анализа динамики морфофункциональных и биохимических показателей.

Материал и методы. Эксперименты были проведены на 21 крысе-самце линии Вистар–Альбино Глаксо массой от 200 до 250 г в возрасте от 3 до 4 месяцев. Животных содержали в стандартных условиях вивария (12-часовой световой день, свободный доступ к воде и пище, температура 23–25 °С).

Животные были разделены на следующие группы: I – интактная (n=7); II – с моделью ПС, двустороннее введение 6-ОНДА в SN (n=7); III – с моделью ПС и последующим (на 14-й день) внутривенным введением в хвостовую вену МСК ЖТ человека – $0,5 \cdot 10^6$ клеток в 0,5 мл раствор Хэнкса/крысу (n=7).

Модель ПС получали введением в черную субстанцию 6-ОНДА. Крысу массой 200–250 г вводили в наркоз инъекцией тиопентала натрия (50 мг/кг) внутривенно. Животное фиксировали в стереотаксическом аппарате, после обработки йодом по средней линии головы производили разрез длиной до 2 см и

скелетировали кость. Для точного попадания в SN использовали следующие стереотаксические координаты: AP=4,0; L=1,5; Г=8,2 мм вентрально к поверхности коры. С двух сторон симметрично наносили фрезевые отверстия диаметром 1 мм и через капилляр вводили 6-ОНДА (8 мкг/кг) на глубину 8,2 мм.

Степень выраженности двигательных расстройств оценивали по балльной системе, предложенной нами ранее [14]:

1 балл (легкие проявления или их отсутствии) – при треморе мышц, ригидности мышц и «манежном беге»;

2 балла (умеренные проявления) – при монотонных движениях головой, вертикальном хвосте;

3 балла (пик проявления) – при горбоподобном изгибе туловища, малоподвижности.

Выделяли и размножали в культуре МСК ЖТ человека. 10–50 мл жировой ткани, полученной в результате процедуры липосакции, переносили в центрифужные пробирки, в каждую из которых добавляли равный объем раствора Хэнкса с 1 % раствором антибиотика/антимикотика и отмывали суспензию от эритроцитов центрифугированием при 350 g в течение 5 минут. Надосадочную жидкость без эритроцитов переносили в другую пробирку и осаждали при 450 g в течение 10 минут. Осадок ресуспендировали в 0,1 % растворе коллагеназы II типа (SIGMA-ALDRICH) и инкубировали при 37 °С в течение 45 минут. Действие коллагеназы инактивировали добавлением культуральной среды с 10–20 % фетальной бычьей сывороткой. Ткань ресуспендировали, суспензию фильтровали через 100 мкм фильтр и осаждали клетки центрифугированием при 450 g в течение 10 минут. К осадку добавляли культуральную среду DMEM/F12 с 2 mM L-глутамина, 1 % раствором антибиотиков и 10 % фетальной бычьей сывороткой и рассеивали клетки в культуральные флаконы (75 см²) в концентрации 10^3 клеток/см². Через 48 часов культивирования флаконы дважды промывали раствором Хэнкса, добавляли свежую культуральную среду и продолжали культивировать МСК ЖТ в CO₂-инкубаторе (37 °С, 5 % CO₂). Среду в культуральных флаконах меняли каждые три дня. В течение культивирования оценивали морфологию кле-

ток с помощью инвертированного микроскопа Leica и регистрировали состояние культур через фотокамеру на компьютер. После образования клеточного монослоя клетки снимали со дна культуральных сосудов после кратковременной (5–10 минут) инкубации в растворах Версена и Трипсина (0,25 %).

Для выполнения внутривенного введения суспензии МСК ЖТ животное помещали в клетку с отверстием для хвоста. Кончик хвоста крысы фиксировали левой рукой, а правой рукой с помощью инсулинового шприца вводили 0,5 мл клеточной суспензии в хвостовую вену.

Использовали гистологический метод исследования. Через 10, 20 и 30 суток после введения МСК КМ крысам с двухнедельной моделью ПС животных забивали, мозг фиксировали в 10 % растворе формалина и заключали в парафин. Серийные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Нисслю. Гистологический анализ препаратов проводили с помощью светового микроскопа AXIO VERT (Zeiss).

Уровень дофамина в структурах головного мозга и крови изучали методом колончатой хроматографии с последующим флуориметрическим анализом через 10, 20 и 30 суток после введения МСК КМ крысам с двухнедельной моделью ПС и выражали в нмоль/л.

Результаты и их обсуждение. Билатеральная деструкция SN вызывала у крыс группы II грубые двигательные нарушения в виде монотонных движений головой (по типу «да-да», «нет-нет»), «горбоподобного» изгиба туловища, вертикально поднятого хвоста. Описанные двигательные расстройства возникали у всех животных на 1-е сутки после деструкции. Двигательные нарушения сохра-

нялись в течение всего периода наблюдений (до 54 суток) после деструкции SN.

По данным динамики двигательных расстройств у крыс с ПС можно отметить, что к 7-м суткам эти расстройства выражены максимально (3 балла). Монотонные движения головой, вертикально поднятый хвост, «горбоподобный» изгиб туловища, малоподвижность развиваются до пика выраженности этих расстройств в сроки 7–15 суток и сохраняются практически без изменений весь период наблюдений.

В опытной группе III движения почти нормализовались на 9–15-е сутки после введения МСК ЖТ человека (рис. 1). На диаграмме хорошо видно, что степень выраженности двигательных расстройств заметно снижается (< 1 балла) уже на 10-е сутки (24-й день модели ПС) после внутривенного введения МСК ЖТ.

Результаты биохимических анализов. При анализе содержания дофамина в крови и во фронтальной коре экспериментальных животных отмечен ряд закономерностей (таблица).

Так, в группе II химическая деструкция зоны SN вызывала у крыс стойкое снижение уровня дофамина в крови и во фронтальной коре. В группе III увеличение уровня дофамина в крови и во фронтальной коре наблюдали на 10-е сутки после внутривенного введения МСК ЖТ человека.

Таким образом, при сопоставлении динамики моторных нарушений и уровня дофамина в крови и фронтальной коре можно отметить корреляционную связь между этими показателями.

Результаты патоморфологических исследований. У интактных животных (группа I) весь комплекс клеток SN имеет форму, на-

Степень выраженности двигательных расстройств, баллы

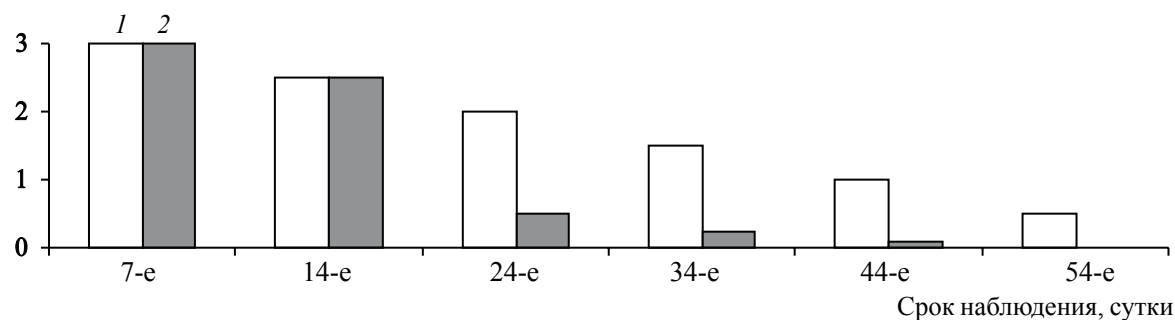


Рис. 1. Зависимость степени выраженности от сроков нормализации двигательных расстройств у крыс с ПС без лечения (1) и после внутривенного введения МСК ЖТ (2)

Уровень дофамина в крови и во фронтальной доле мозга

Группа	Срок наблюдения, сутки	Дофамин	
		в крови, Нг/мг	во фронтальной доле мозга, Нм/л ткани
I	24-е	0,85±0,06	1,09±0,09
	34-е	0,85±0,06	1,09±0,09
	44-е	0,85±0,06	1,09±0,09
II	24-е	0,64±0,06	0,94±0,09
	34-е	0,70±0,06	0,97±0,09
	44-е	0,76±0,06	1,05±0,09
III	24-е	0,95±0,06	1,00±0,09
	34-е	0,92±0,06	1,00±0,09
	44-е	0,96±0,06	1,17±0,09

поминающую треугольник. Нейроны средней величины, угловатой и продолговатой формы, что указывает на наличие отростков, формирующих конусы в месте отхождения от тела нейрона. Цитоплазма базофильна, обычно в нейронах с гиперхромным, т. е. темным ядром. Данный факт можно объяснить наличием в SN здорового животного существенной части запасных нейронов. Нейропил на территории SN и вокруг нее мелкоячеистый, что свойственно нервной ткани с высокой степенью сохранности отростков нейронов (рис. 2).

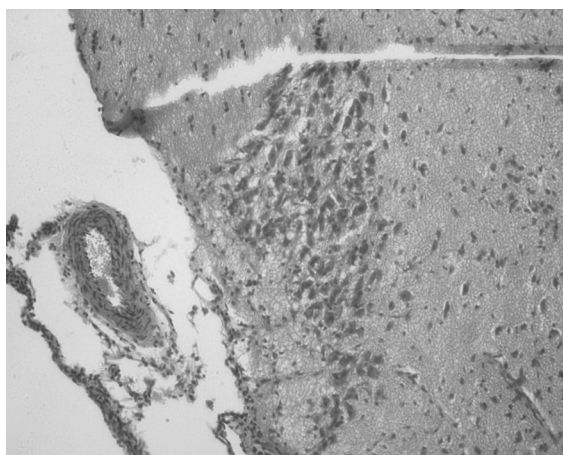


Рис. 2. Характерное скопление нейронов в зоне SN у интактной крысы. Окраска гематоксилин-эозином, × 100

У животных группы II (модель ПС) через 14 дней после операции и на момент введения клеток плотность нейропиля в зоне оперированной области SN выше, чем через 7 дней после операции. Возможно, это обусловлено

гиперплазией отростков сохранившихся нейронов, которых значительно меньше, чем у интактных животных. Располагаются нейроны SN в виде длинной узкой полосы вдоль нижней поверхности мозга (рис. 3).

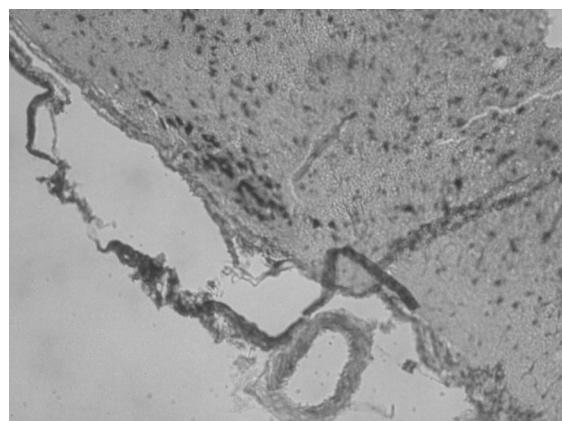


Рис. 3. Фронтальный срез головного мозга в участке SN через 14 суток после билатеральной деструкции SN. Окраска по Нислю, × 100

Через 34 дня после создания модели ПС количество нейронов в дефектной зоне SN увеличивается по сравнению с таковым в более ранние сроки. Ядро многих нейронов области SN светлое, форма клеток овальная, цитоплазма резко базофильна – такие клетки являются морфофункционально активными, а базофильность цитоплазмы, очевидно, обусловлена большим количеством рибосом в ней, т. е. высокоактивным прохождением процессов белкового синтеза (рис. 4).

У некоторых животных группы III через 10 суток после внутривенного введения МСК ЖТ в толще белого вещества немного выше

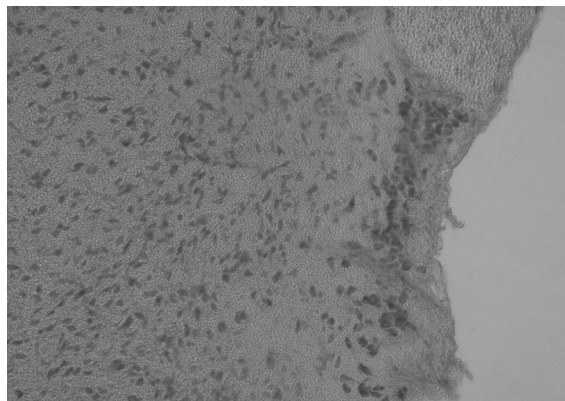


Рис. 4. Функционально активные нейроны в зоне SN у крыс через 34 дня после создания модели ПС. Окраска по Нисслю, $\times 100$

локуса нормальной локализации SN обнаружено многоклеточное образование, находящееся в плотном контакте с мелкими венами. Цитоплазма этих клеток содержит гранулы коричневого цвета, что указывает на возможную дифференцировку этих клеток в нейромеланоциты, что, по-видимому, связано с введением МСК ЖТ (рис. 5).

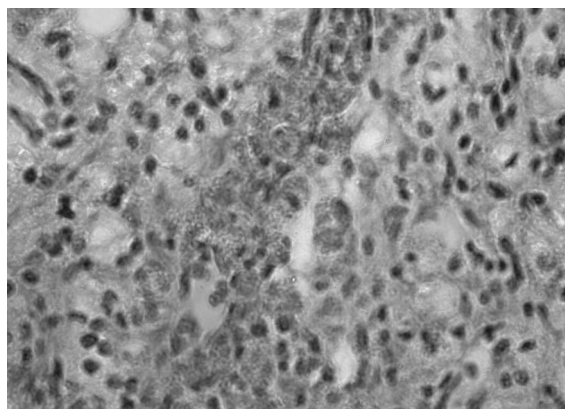


Рис. 5. Скопление клеток с коричневым пигментом в цитоплазме выше локуса нормальной локализации SN. Фронтальный срез мозга крысы группы III на 10-й день после введения МСК ЖТ. Окраска по Нисслю, $\times 400$

У животных той же группы через 20 дней после введения МСК ЖТ приблизительно в тех же участках головного мозга, как описано выше, т. е. в новом для SN месте, также обнаружено большое скопление клеток с коричневым пигментом в цитоплазме (рис. 6, 7). При этом в локусе нормального расположения SN наблюдалось увеличение количества нейронов, аналогичное описанному в группе интактных животных.

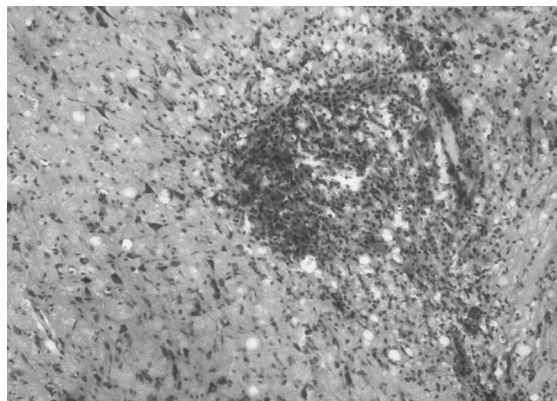


Рис. 6. Скопление нейронов и клеток с коричневым пигментом вблизи зоны SN через 20 суток после введения МСК ЖТ. Фронтальный срез головного мозга крыс группы III. Окраска по Нисслю, $\times 100$

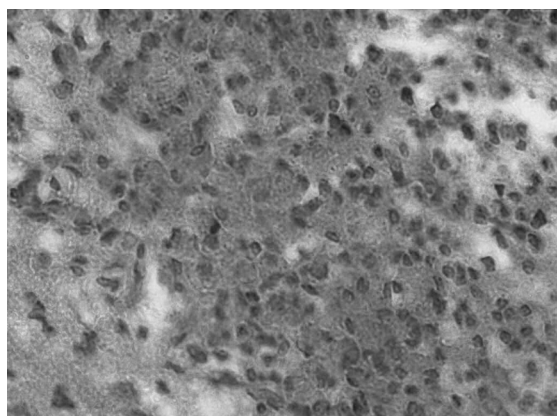


Рис. 7. Нейромеланоциты с гранулами коричневого пигмента в цитоплазме. Фронтальный срез головного мозга крысы группы III выше локуса нормальной локализации SN. Окраска по Нисслю, $\times 400$

Таким образом, в контрольной группе (II) химическая деструкция SN вызывала у крыс грубые двигательные нарушения в виде монотонных движений головой (по типу «да-да», «нет-нет»), появление «горбоподобного» изгиба туловища, вертикально поднятого хвоста. Описанные двигательные расстройства возникали у всех животных на 1-е сутки после деструкции, развивались до пика выраженности этих расстройств в сроки 7–15 суток и сохранялись в течение всего периода наблюдений (до 54 суток).

В группе III движения нормализовались на 9–15-е сутки, увеличение уровня дофамина в крови и во фронтальной коре отмечено на 10-е сутки, а морфологически на 10-й и 20-й день выше зоны нормальной локализации SN обна-

ружены скопления клеток с коричневым пигментом в цитоплазме. Можно предположить, что МСКЖТ мигрировали в ткань головного мозга и дифференцировались в нейромеланоциты.

Положительное воздействие внутривенного введения МСК ЖТ на проявление паркинсоноподобного синдрома может быть вызвано также и с паракринным влиянием этих клеток на течение репаративных и воспалительных процессов в организме.

Список литературы

1. Литвиненко И. В. Болезнь Паркинсона и синдромы паркинсонизма / И. В. Литвиненко, М. М. Одинак, А. Г. Труфанов. – СПб. : ЭЛБИ-СПб., 2012. – 80 с.
2. MEF2C enhances dopaminergic neuron differentiation of human embryonic stem cells in a parkinsonian rat model / E. G. Cho, J. D. Zaremba, S. R. McKercher [et al.] // PLoS One. – 2011. – № 8. – P. 24–27.
3. Dopamine cell transplantation in Parkinson's disease: challenge and perspective / Y. Ma, S. Peng, V. Dhawan, D. Eidelberg // Br. Med. Bull. – 2011. – № 100. – P. 173–189.
4. Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α -synuclein locus / M. J. Devine, M. Ryten, P. Vodicka [et al.] // Nat. Commun. – 2011. – № 2. – P. 440.
5. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations / F. Soldner, J. Laganière, A. W. Cheng [et al.] // Cell. – 2011. – № 2. – P. 318–331.
6. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts / M. Caiazzo, M. T. Dell'Anno, E. Dvoretzkova [et al.] // Nature. – 2011. – № 476. – P. 224–227.
7. Анисимов С. В. Клеточная терапия болезни Паркинсона: I. Трансплантация эмбриональной и взрослой ткани / С. В. Анисимов // Успехи геронтологии. – 2008. – № 4. – С. 575–592.
8. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis / M. Rodbell // J. Biol. Chem. – 1964. – V. 239, № 2. – P. 375–380.
9. In vitro and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells / G. Astori, F. Vignati, S. Bardell [et al.] // J. Transl. Med. – 2007. – V. 5. – P. 55.
10. Zuk P. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno // Tissue Eng. – 2001. – V. 7, № 2. – P. 211–228.
11. Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering / F. Guilak, H. Awad, B. Fermor [et al.] // Biorheology. – 2004. – V. 41, № 3–4. – P. 389–399.
12. Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction / G. Jack, F. Almeida, R. Zhang [et al.] // J. Urol. – 2005. – V. 174, № 5. – P. 2041–2045.
13. Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease / Y. S. Levy, M. Bahat-Stroomza, R. Barzilay [et al.] // Cytotherapy. – 2008. – № 4. – P. 340–352.
14. Пятикоп В. А. Сравнительная характеристика динамики двигательных нарушений и их сопоставления с морфофункциональными особенностями при экспериментальном паркинсонизме после введения криоконсервированных эмбриональных нервных клеток и нейроиндуцированных in vitro стромальных клеток / В. А. Пятикоп, И. А. Григорова // Укр. вісник психоневрології. – 2007. – Т. 15, вип. 1. – С. 51–53.

Выводы

Внутривенное введение мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека при паркинсоноподобном синдроме у крыс способствует восстановлению движений на 9–15-е сутки, нормализует уровень дофамина в крови и во фронтальной коре на 10-й день, приводит к появлению вблизи зоны черной субстанции скопления пигментированных клеток.

В.О. П'ятикоп, М.А. Мсаллам, О.А. Щегельська, Г.І. Губіна-Вакулик, Т.В. Горбач
ЕФЕКТИВНІСТЬ ВНУТРІШНЬОВЕННОГО ВВЕДЕННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ
КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЛЮДИНИ ПРИ ПАРКІНСОПОДІБНОМУ СИНДРОМІ

Показано, що білатеральна деструкція SN за допомогою введення 6-OHDA викликає у щурів розвиток паркінсоподібного синдрому з характерними руховими проявами (монотонні рухи головою, вертикально піднятий хвіст, «горбоподібний» вигин тулуба і втрата маси) і зниження рівня дофаміну в крові і у фронтальній корі. Внутрішньовенне введення мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини людини при паркінсоподібному синдромі у щурів сприяє відновленню рухів на 9–15-ту добу, нормалізує рівень дофаміну в крові і у фронтальній корі на 10-й день, приводить до появи поблизу зони SN скупчення пігментованих клітин.

Ключові слова: паркінсоподібний синдром, мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини людини, поведінка щурів, морфологічні зміни, рівень дофаміну.

V.A. Pyatikop, M.A. Msallam, E.A. Shchegelskaya, G.I. Gubina-Vakulik, T.V. Gorbach
EFFECT OF INTRAVENOUS INTRODUCTION OF MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED
FROM HUMAN ADIPOSE TISSUE ON PARKINSON-LIKE SYNDROME

It is shown, that bilateral destruction of SN by introducing 6-OHDA causes the development of Parkinson-like syndrome animals with characteristic motor manifestations (monotonous movements of the head, «vertical tail», «hump like» bending the body and weight loss and reduced dopamine levels in the blood and in the frontal cortex. Intravenous introducing of mesenchymal stem cells from human adipose tissue at Parkinson-like syndrome helps restore movements for 9–15th days, normalizes dopamine levels in the blood and in the frontal cortex on day 10 and leads to the appearance of pigmented cells near zone SN of brain.

Key words: Parkinson-like syndrome, mesenchymal stem cells from human adipose tissue, the behavior of rats, morphological changes, level of dopamine.

Поступила 08.04.14