

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України»

МОХАММАД АХМАД ДЖ. МСАЛЛАМ

УДК 616.858-089.843:611.013.395:611.018.46-092.9

**ЗАСТОСУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ КЛІТИН
КІСТКОВОГО МОЗКУ ПРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ
ПАРКІНСОНОПОДІБНОМУ СИНДРОМІ**

14.01.05 — нейрохірургія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Київ — 2015

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Харківському національному медичному університеті МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор,
П'ятикоп Володимир Олександрович,
Харківський національний медичний університет
МОЗ України, завідувач кафедри нейрохірургії.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, **Пічкур Леонід Дмитрович**,
ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова
НАМН України», провідний науковий співробітник відділу
відновлювальної та функціональної нейрохірургії;

доктор медичних наук, **Сірко Андрій Григорович**,
ДУ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»,
доцент кафедри нервових хвороб та нейрохірургії ФПО,
КЗ «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І.
Мечникова», завідувач відділенням церебральної
нейрохірургії №2.

Захист відбудеться «29» травня 2015 р. о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.557.01 при ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» за адресою: 04050, м. Київ, вул. П. Майбороди, 32.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» за адресою: 04050, м. Київ, вул. П. Майбороди, 32.

Автореферат розісланий «28» квітня 2015 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
д.мед.н., с.н.с.

Скобська О. Є.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. До теперішнього часу проблема поліпшення ефективності лікування пацієнтів з хворобою Паркінсона (ХП) не втрачає своєї актуальності (Пятикоп В.А., 2009; Connolly B.S., Lang A.E., 2014). Це захворювання вважають нейродегенеративним розладом з прогресуючою втратою дофамінергічних нейронів у чорній субстанції (substantia nigra, SN, pars compacta) та суттєвим зниженням рівня дофаміну (ДА) у смугастому тілі головного мозку. Втрата ДА-ергічних нейронів у SN приводить до порушень обробки інформації у базальних гангліях та розвитку характерного симптомокомплексу (Yang D. et al., 2008; Glass C.K. et al., 2010), усунення якого не можливе без сучасних методів терапії. Останні базуються на пероральному введенні L-допа, агоністів дофамінових рецепторів на тлі стимулювання ядер таламусу (Takáts A. et al., 2013; Cesaro P., Defebvre L., 2014). Фармакологічне лікування виявляється ефективним щодо симптомів ХП, однак, його ефективність мінімізується з часом, що сприяє ризику розвитку побічних ефектів (Ceballos-Baumann A., 2013).

З огляду на останнє, одним із перспективних напрямків лікування ХП вважають застосування стовбурових мезенхімальних клітин кісткового мозку (МСККМ). Встановлено, що у кістковому мозку ссавців існують похідні стовбурових клітин, які шляхом культивування, індукції, імунофенотипування здатні диференціюватись у нейрональному напрямку (Щегельская Е. А., 2002; Цимбалюк В.І., 2012; Торяник І.І., Колесник В.В., 2015).

Альтернативним засобом відновлення пошкодженої системи ДА є застосування стовбурових мезенхімальних клітин. Останні є надійним джерелом забезпечення клітинним матеріалом для подальших клінічних випробувань. Фахівцями з експериментальної медицини наголошується, що стовбурові клітини з надлишковою експресією нейротрофічних факторів, здатні індукувати нейропротекторні і нейростимулюючі ефекти (Cova L. et al., 2010; Venkataramana N.K. et al., 2010; Лісяний М.І. та співавт., 2012). Окремими дослідженнями показано, що лікування ХП нейроіндукованими МСККМ (НМСККМ) приводить до генерації потенційних нейронів ДА і функціонального відновлення у щурів з модельованим паркінсоноподібним станом (P. Akerud, 2002). На моделі паркінсоноподібного стану (через введення у SN гризунів нейротоксину 6-гідроксидофаміну, 6-OHDA) доведено можливість блокади синтезу дофаміну в ендогенних дофамінергічних нейронах та розвитку характерної для ХП симптоматики (Ma Y. et al., 2011). Показано, ефективність трансплантації ембріональних клітин з перспективою їхніх виживання, міграції та диференціювання у ДА-секретуючі клітини зон SN (Lindvall O., 2012).

Отже, застосування стовбурових мезенхімальних клітин кісткового мозку з метою корекції моторних розладів при експериментальному паркінсоноподібному синдромі (ПС) у щурів видається актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у рамках НДР Харківського національного медичного університету МОЗ України «Нейротрансплантація у лікуванні

екстрапірамідни розладів, спінальних і церебральних травм та інсультів», № держреєстрації 0105U002758.

Мета дослідження — дослідження ефективності корекції моторних розладів при експериментальному паркінсоноподібному синдромі шляхом використання мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини.

Завдання дослідження:

1. Удосконалити мікронейрохірургічну експериментальну модель ПС шляхом стереотаксичного введення нейротоксину 6-OHDA у SN.

2. Визначити особливості міграції МСККМ на моделі ПС в експерименті залежно від дози, термінів і способів їх введення.

3. Проаналізувати вплив МСККМ і мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини (МСКЖТ) на моторні розлади при модельованому ПС залежно від дози, термінів і способів їх введення.

4. Вивчити структурні зміни тканин головного мозку щурів при модельованому ПС та за умов використання МСККМ і МСКЖТ залежно від дози, термінів і способів їх введення.

5. Дослідити зміни біохімічних показників (рівня ДА у крові та головного мозку) у щурів при модельованому ПС та за умов використання МСККМ і МСКЖТ залежно від термінів їх введення.

Об'єкт дослідження: експериментальний паркінсоноподібний синдром.

Предмет дослідження: застосування мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини.

Методи дослідження: 1) *експериментальні:* моделювання паркінсоноподібного синдрому у щурів шляхом стереотаксичного введення 6-OHDA у SN, застосування МСККМ і МСКЖТ; 2) *культтивування:* виділення, культивування, встановлення життєздатності, імунофенотипування МСККМ і МСКЖТ та їх індукція диференціювання у нейрональному напрямку *in vitro*; 3) *морфологічні:* світлооптична (гісто-, імуноцитохімічні, морфометричні) мікроскопія з метою вивчення впливу стовбурових мезенхімальних клітин (залежно від дози, термінів і способів їх введення) на перебіг модельованого паркінсоноподібного синдрому; 4) *біохімічні:* хроматографічний, флуориметричний метод з метою вивчення рівня ДА у крові та структурах головного мозку; 5) *статистичні:* визначення статистично значущих відмінностей між експериментальними групами (непараметричні методи статистичного аналізу).

Експерименти на тваринах проведені з дотриманням вимог біомедицини та згідно з правилами Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях (Страсбург, 18.03.1986 р.), директиви Ради Європейського економічного товариства із захисту хребетних тварин (Страсбург, 24.11.1986 р.), закону України «Про лікарські засоби» (1996 р.), керівництва ICH GCP (2008 р.), GLP (2002 р.), «Порядку проведення клінічних досліджень лікарських засобів і експертизи матеріалів клінічних досліджень» і «Типового

положення про комісію з питань етики», затверджених наказами МОЗ України № 523 від 12.07.2012 р. і № 616 від 03.08.2012 р.

Наукова новизна одержаних результатів. В роботі поглиблене знання щодо особливостей трекінгу МСККМ у тканинах головного мозку, досліджено міграцію МСККМ залежно від дози, термінів та способів їх введення експериментальним тваринам.

Показано, що розподіл МСККМ на поверхні інтактного головного мозку у групі контрольних тварин не призводив до накопичення та диференціації МСККМ у нейрони.

Визначено, що найбільш ефективним є внутрішньомозкове (ВМ) стереотаксичне введення МСККМ в зону деструкції, яке забезпечує їх міграцію поза гематоенцефалічним бар'єром та прискорення відновних процесів у головному мозку. Доведено, що застосування МСККМ і МСКЖТ сприяє відновленню моторних реакцій у щурів в експерименті.

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновано новий спосіб моделювання ПС у щурів шляхом білатеральної деструкції SN введенням 6-OHDA. Модель є адекватною для подальшого дослідження результатів корекції ПС в експерименті.

Запропоновано новий спосіб корекції ПС у щурів, який полягає у застосуванні МСККМ, МСКЖТ (у дозах 1×10^6 /щура, 2×10^6 /щура) різними способами (внутрішньовенним, внутрішньомозковим). Модель є адекватною для подальшого дослідження результатів корекції ПС в експерименті.

Результати дисертаційного дослідження включені в курс лекцій, в матеріали курсів стажування та інформації кафедри нейрохірургії Харківського національного медичного університету МОЗ України.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є власним дослідженням автора. Ним самостійно виконаний патентно-інформаційний пошук, вивчені літературні джерела за темою дисертаційного дослідження. Разом з науковим керівником — д.мед.н., професором П'ятикопом В.О. сформульовані мета і завдання роботи, обговорені наукові положення, висновки і практичні рекомендації. Автором самостійно виконана експериментальна частина дослідження, опрацьовані його результати. Дисертантом удосконалено експериментальну модель ПС, відпрацьовано методику застосування з лікувальною метою МСККМ і МСКЖТ (у дослідженні використано 79 тварин). Автор самостійно проаналізував результати роботи. Всі розділи роботи автором написані й оформлені особисто.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційного дослідження оприлюднені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Клітинні технології у акушерстві, гінекології, неонатології й дитячій неврології» (Київ, 2013 р.), V з'їзді нейрохірургів України (Ужгород, 2013 р.), засіданнях Харківського осередку асоціації нейрохірургів України (Харків, 2013 р.).

Апробація дисертації відбулася на засіданні апробаційної ради з попередньої експертизи дисертаційних робіт з питань хірургічних хвороб

Харківського національного медичного університету МОЗ України 11 вересня 2014 р., протокол № 11.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 7 наукових друкованих робіт: 5 статей, з них 4 — у фахових періодичних виданнях, рекомендованих МОН України та 1 — у іноземному виданні; 2 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, 2 розділів власних досліджень, обговорення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел. Робота викладена на 159 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 36 рисунками, містить 5 таблиць. Список використаних літературних джерел містить 341 посилання, з них 41 — кирилицею, 300 — латиною.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження виконано на 79 щурах лінії Wistar віком 3-х місяців, масою тіла 200–250 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію Харківського національного медичного університету МОЗ України. Тварини були розподілені на такі групи:

- а) контроль (n=7);
- б) з модельованим ПС (двостороннє введення 6-OHDA в SN, n=18);
- в) з модельованим ПС та ВВ введенням на 14 добу експерименту МСККМ щурів у дозах: 1×10^6 (n=9) та 2×10^6 (n=9);
- г) з модельованим ПС та ВВ введенням на 14 добу експерименту клітин МСКЖТ і МСККМ у дозах: $0,5 \times 10^6$ (n=9) та $0,5 \times 10^6$ (n=9) відповідно;
- д) з модельованим ПС та ВМ введенням у SN на 14 добу експерименту МСККМ, НМСККМ у дозах: $0,3 \times 10^6$ (n=9) та $0,3 \times 10^6$ (n=9) відповідно;

Усі маніпуляції з тваринами проводили під інтраперітонеальним тіопенталовим наркозом (з розрахунку 100 мг 1кг маси тіла тварини). У разі проведення операційного втручання на головному мозку щурів з метою моделювання ПС застосовували стереотаксичний апарат для мікроелектродних досліджень головного і спинного мозку тварин СЕЖ-3 (розробник: кафедра фізіології людини і тварин Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна МОНмолодьспорту України). Основною стереотаксичною мішенню експериментів була SN. Її стереотаксичні координати визначали за Е. Фіфковою та Дж. Маршаллом (1967). Руйнуючу речовину (6-OHDA, Almbion Ltd. Росія) у дозі 8 мкг/кг вводили у симетрично висвердлені отвори на глибину 8,2 мм. Трепанційний отвір заливали стерильним розплавленим воском. Рану зашивали вузловими швами та засипали стрептоцидом.

Виділення, культивування, морфологічне дослідження клітин здійснювали за стандартними методиками. Суспензію кісткового мозку ($V=1 \text{ см}^3$) отримували шляхом аспірації зі стегнових кісток; клітини жирової тканини ($V \geq 5 \text{ см}^3$) — за рахунок ліпосакції у стерильних умовах. Отримані клітини фенотипували із застосуванням панелей позитивних та негативних маркерів. Диференціювання у нейрональному напрямку здійснювалось із використанням індуктора —

ретіноєвої кислоти (Gudas L.G., Wagner J.A., 2011; Gudas L.G., 2013). Перед введенням тваринам перевіряли здатність клітин до експресії характерних поверхневих маркерів (згідно критеріїв Міжнародного співтовариства з клітинної терапії). Для цього ретельно аналізували культури клітин III-го пасажу методом проточної цитофлуориметрії з метою визначення експресії стандартної панелі маркерів. За кількістю позитивних та негативних маркерів визначали фенотип клітин. Диференціювання введених тваринам клітин та їхній трекінг оцінювали за стандартними імуноцитохімічними методиками. МСККМ мітили різними флуорохромами, розподіляли на 3 групи (n=6 в кожній):

а) порівняльний контроль, який складали тварини з ВВ та ВМ введеннями мічених не індукованих МСККМ;

б) з модельованим ПС та наступним (7-ма доба) ВВ введенням НМСККМ у дозі $0,3 \times 10^6$;

в) з модельованим ПС та наступним (7-ма доба) ВМ введенням НМСККМ у дозі 30×10^3 .

Трекінг флуоресцентних клітин вивчали у люмінесцентному мікроскопі Ахіостар Плюс (Carl Zeiss, Німеччина). Структурні зміни досліджували гістологічно за стандартною схемою (фіксування у 10 % формаліні на фосфатному буфері (рН=7,0-7,2), зневоднювали, заливали у смоли. Зрізи забарвлювали за Ніслем та гематоксиліном і еозином, аналізували у світлооптичному мікроскопі Ахіостар Плюс (Carl Zeiss, Німеччина), аналізували на збільшенні (x100; x200; x300; x 400).

З метою вивчення рівня ДА у структурах головного мозку застосовували хроматографічний метод з наступним флуориметричним аналізом (Спектрофлуориметр МРФ-4 "Hitachi", Японія).

Ступінь вираженості рухових розладів оцінювали за бальною системою (Пятикоп В.А., Григорова І.А., 2007), табл. 1.

Таблиця 1

Система оцінки рухових розладів

Вид рухових розладів	Ступінь вираженості рухових розладів
Тремор м'язів Ригідність м'язів «Манежний» біг	1 бал — легкі прояви або їх відсутність
Монотонні рухи головою Вертикальний хвіст	2 бали — помірні прояви
Горбоподібний вигин тулуба Малорухливість	3 бали — пік проявів

Статистичний аналіз отриманих даних здійснювали за допомогою пакету прикладних програм Statistica (Statsoft Inc., США), версія 8 (ліцензія № STA862D175437Q) та пакету електронних таблиць Microsoft Excel 2010. Статистична обробка даних дослідження здійснювалась згідно з правилами рядової і альтернативної статистики. Розраховували середнє арифметичне,

середнє квадратичне відхилення, використовували непараметричні критерії. Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення.

За результатами проведеного комплексного морфофункціонального дослідження було встановлено, що у тварин з експериментально заподіяним ПС, порушення рухових функцій зберігалось протягом всього періоду спостережень. Моторні розлади після введення 6-OHDA в SN проявлялись насильницькими монотонними рухами головою (за типом «так-так», «ні-ні»), «горбоподібним» вигином тулуба тварини, неприродним витягуванням кінцівок, вертикальним підйомом хвоста, «манежним» бігом. 60% особин виявляли моторні розлади, характерні для ХП (малорухливість, ригідність, дрижання м'язів). Найбільш стійкою патологією залишались горбоподібний вигин тулуба, малорухливість, монотонні рухи головою. Поступової регресії зазнавали ригідність м'язів, тремор кінцівок, вертикального положення хвоста. У відповідності до оціночної шкали рухових розладів у щурів з ПС ступінь виразності останніх стягав максимуму на 7–14 добу та складав 3 бали. На 10-ту добу потому виразність (3 бали) патологічних проявів (крім манежного бігу та вертикального положення хвоста, -2 бали) зберігала сталий, торпідний характер. На 20-ту добу існування експериментального ПС ступінь виразності розладів в 3 бали залишався властивим вигину тулуба, тоді, як тремор, ригідність досягали 2-х балів; манежний біг, вертикальне положення хвоста демонстрували легку ступінь-1-н бал. 30-та доба модельованого ПС демонструвала істотне зниження виразності розладів: 2–1 балів. 40-ва доба ПС позначалась виразним регресом патологічних проявів, досягнувши рівня у 1-н бал (схильність до манежного бігу, вертикального розташування хвоста у тварин не спостерігали), рис. 1.

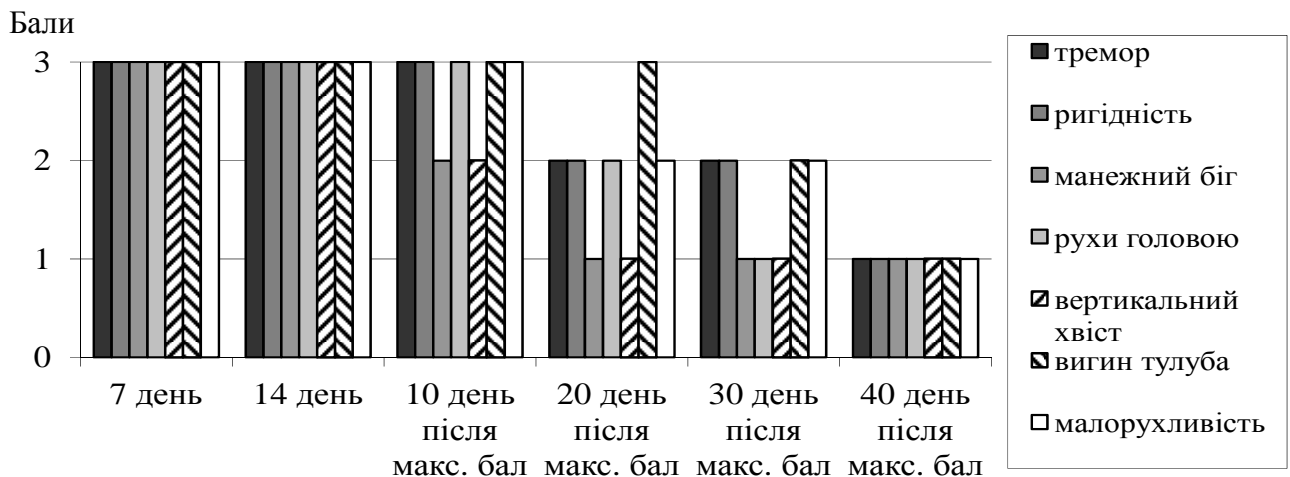


Рис. 1. Ступінь вираженості рухових розладів у експериментальних щурів з модельованим ПС за оцінювальною бальною системою.

В експериментальній групі щурів з модельованим ПС та ВВ введенням МСККМ (1×10^6) на 10 добу спостережень виразність рухових розладів таких, як

тремор, ригідність, вигин тулуба, малорухливість досягала 3 балів. Виразність інших моторних порушень: манежний біг по колу, монотонні рухи головою, вертикальним підйомом хвоста становила 2 бали. На 20 добу експерименту (ВВ введення МСККМ) когнітивна картина поліпшувалась. Виразність у 3 бали зберігав лише моторний розлад, що проявлявся вигином тулуба. Чотири рухові порушення (тремором, ригідністю, монотонні рухи головою, малорухливість) склали 2 бали, манежний біг по колу, вертикальний підйом хвоста оцінювались у 1 бал. Спостереження 30 доби експерименту виявили явний регрес моторних розладів (ригідність, манежний біг по колу, монотонні рухи головою, вертикальний підйом хвоста становили 1 бал; тремор, малорухливість, вигин тулуба оцінювались у 2 бали), рис. 2.

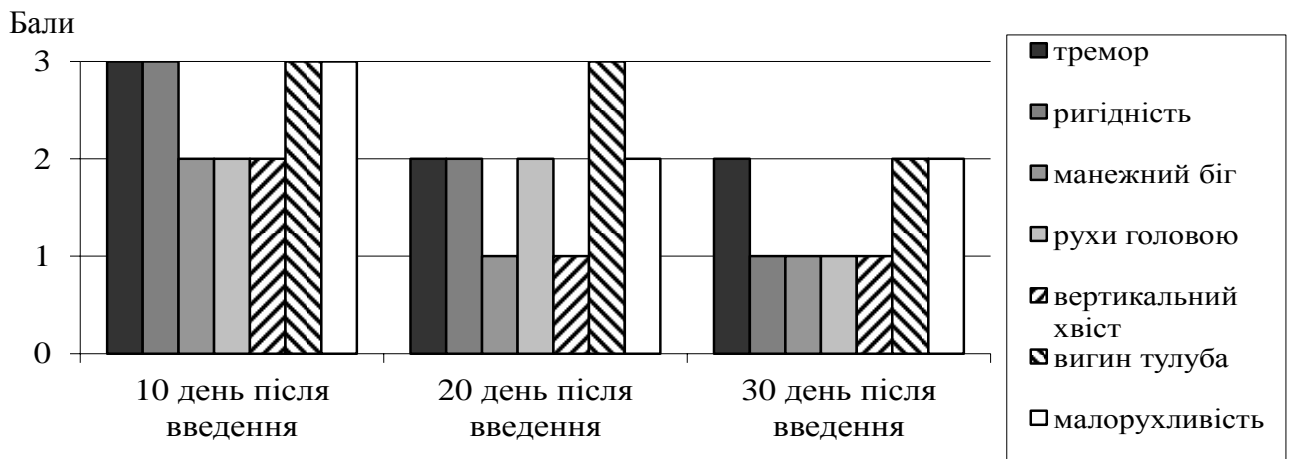


Рис. 2. Ступінь вираженості і терміни нормалізації рухових розладів у експериментальних щурів з модельованим ПС після ВВ введення МСККМ (1×10^6 / щура) за оцінювальною бальною системою.

У щурів з модельованим ПС на тлі ВВ введення МСККМ (2×10^6) на 10-ту добу спостережень вигин тулуба, малорухливість досягали 2 балів, інші моторні розлади оцінювались у 1 бал. 20 доба експерименту продемонструвала зниження виразності усіх видів розладів до рівня 1 балу. Вигин тулуба оцінювали у 2 бали. На 30 добу дослідження отримали явний регрес переважної більшості моторних розладів (1 бал) на тлі зникнення ригідності, манежного бігу по колу, вертикального підйому хвоста, монотонних рухів головою), рис. 3.

У щурів з модельованим ПС та ВВ введення МСКЖТ ($0,5 \times 10^6$), 10 доба спостережень, виразність рухових розладів в 1 бал характеризувала ригідність, манежний біг, вертикальний підйом хвоста, монотонні рухи головою. Решта моторних порушень за виразністю досягли 2 балів. На 20 добу ВВ введення МСКЖТ показники за усіма видами рухових розладів знижувались до рівня 1 балу. На 30-ту добу експерименту ригідність, манежний біг, вертикальний підйом хвоста повністю регресували. Решта симптомів за виразністю досягла 1 балу, рис. 4.

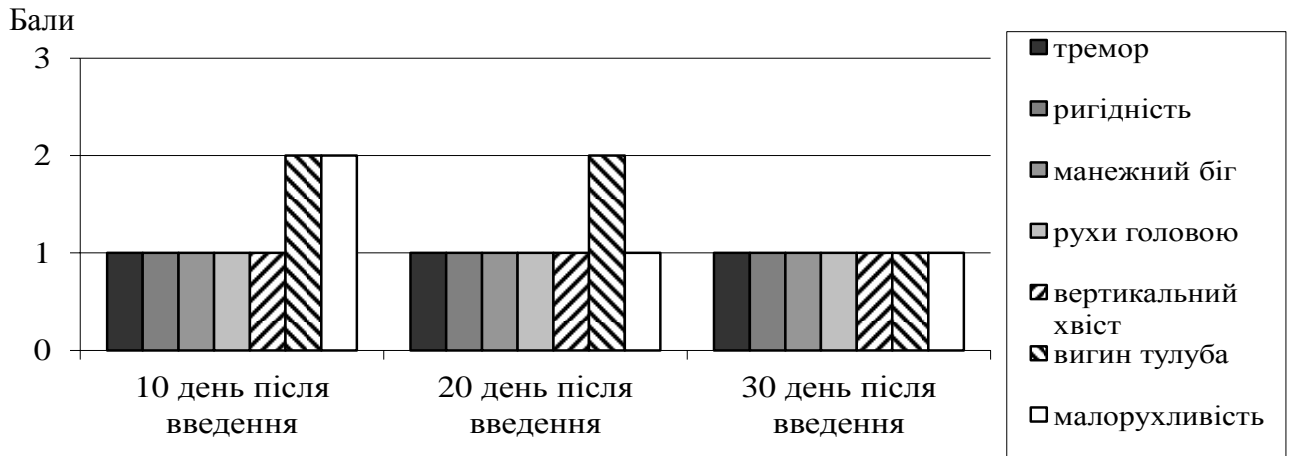


Рис. 3. Ступінь вираженості і терміни нормалізації рухових розладів у експериментальних щурів з модельованим ПС після ВВ введення МСККМ (2×10^6 / щура) за оцінювальною бальною системою.

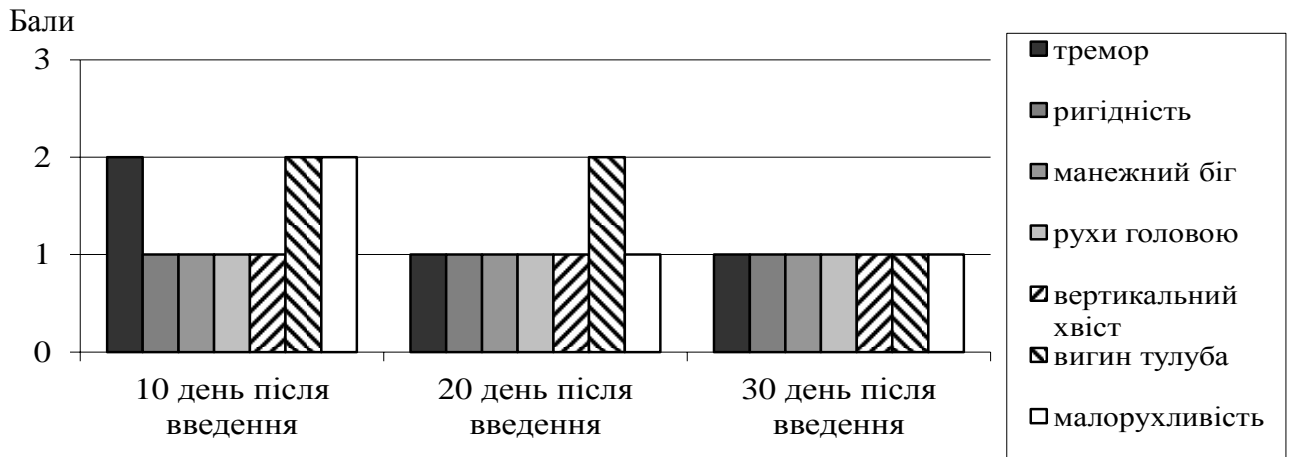


Рис. 4. Ступінь вираженості і терміни нормалізації рухових розладів у експериментальних щурів з модельованим ПС після ВВ введення МСКЖТ ($0,5 \times 10^6$) за оцінювальною бальною системою.

У тварин з ВВ введенням МСККМ ($0,5 \times 10^6$) на тлі модельованого ПС спостерігали поступове зниження виразності рухових розладів. Так на 10 добу дослідження ригідність, манежний біг по колу та вертикальний підйом хвоста досягли 1 балу; монотонні рухи головою, малорухливість становили 2 бали; вигин тулуба, тремор оцінювались 3-ма балами. На 20 добу ВВ введення МСККМ відбувалось зниження інтенсивності усіх видів моторних розладів (1 бал). Вигин тулуба, тремор кінцівок, малорухливість досягали 2 балів. 30 доба спостереження продемонструвала характерне зниження інтенсивності переважної більшості моторних розладів до 1 балу та остаточне їх зникнення (вертикальний підйом хвоста), рис. 5.

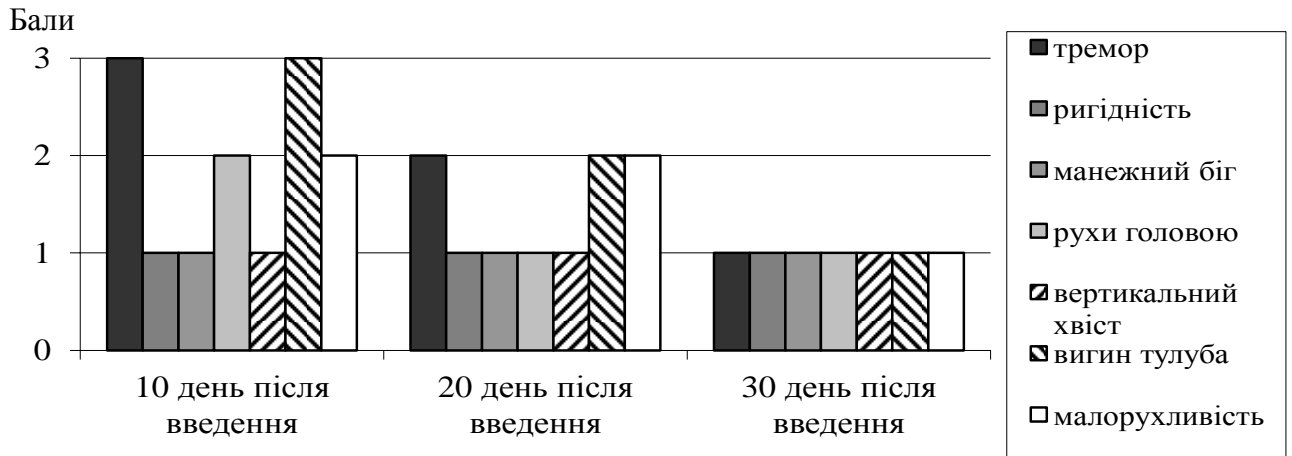


Рис. 5. Ступінь вираженості і терміни нормалізації рухових розладів у експериментальних щурів з модельованим ПС після ВВ введення МСККМ ($0,5 \times 10^6$) за оцінювальною бальною системою.

У тварин з модельованим ПС та ВМ введенням МСККМ у дозі $0,3 \times 10^6$ на 10 добу спостерігали виразну регресію рухових порушень (до 1–2 балів). 20 доба декларувала рівень моторних розладів до 1 балу та зникнення проявів ригідності, схильності до манежного бігу по колу, вертикального підйому хвоста, монотонних рухів головою). Спостереження 30-ї доби виявили збереження таких проявів, як вигин тулуба, тремор голови, зникнення ригідності, схильності до манежного бігу по колу, вертикального підйому хвоста, рис. 6.

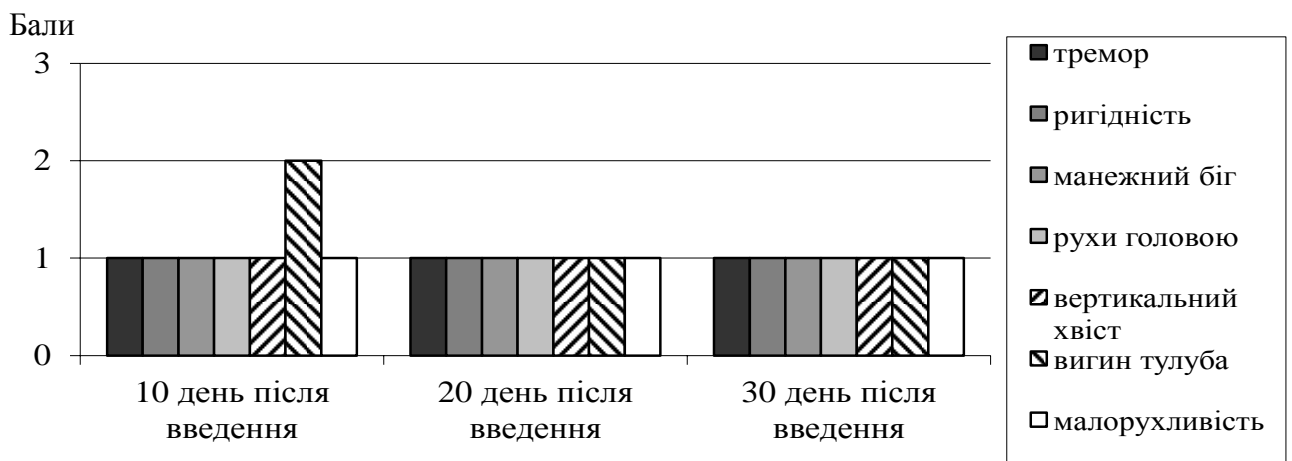


Рис. 6. Ступінь вираженості і терміни нормалізації рухових розладів у експериментальних щурів з модельованим ПС після ВМ введення МСККМ ($0,3 \times 10^6$) за оцінювальною бальною системою.

У тварин з модельованим ПС та ВМ введенням НМСККМ у дозі $0,3 \times 10^6$ на 10 добу вираженість рухових розладів знижується до 1 балу за усіма видами рухових розладів, а на 20 добу рухові розлади зникли (ригідність, маніжний біг,

вертикальний хвіст, рухи головою), в той час як відмічалися легкі прояви вигину тулуба й тремору. На 30 добу зникли усі рухові розлади, рис. 7.

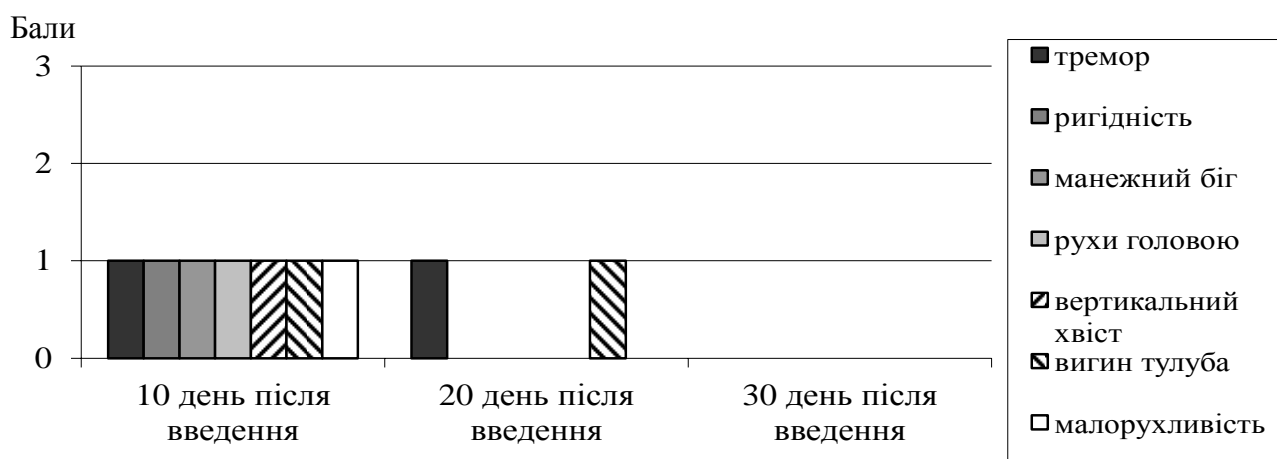


Рис. 7. Ступінь вираженості і терміни нормалізації рухових розладів у експериментальних щурів з модельованим ПС після ВМ введення НМСККМ ($0,3 \times 10^6$) за оцінювальною бальною системою.

Співставлення ефективності корекції ПС у всіх експериментальних групах надано у рис. 8.

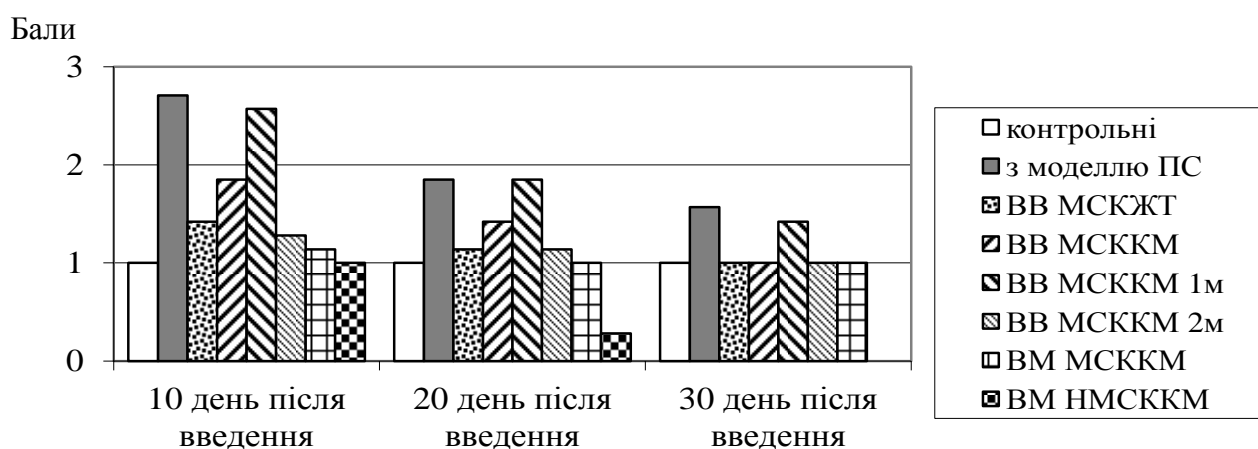


Рис. 8. Ступінь вираженості рухових розладів у експериментальних щурів різних груп за оцінювальною бальною системою.

Співставлення показників вмісту дофаміну у крові та корі лобової частки у кожній із експериментальній груп (за виключенням ВМ НМСККМ, ВВ МСКЖТ та ВВ МСККМ у дозі 2×10^6) показало достовірний характер відмінностей відносно контролю ($p < 0,05$). ВВ введення МСККМ у дозі 1×10^6 сприяло нормалізації рівня ДА на 30 добу дослідження. Доза МСККМ 2×10^6 за умов ВВ

введення рівень ДА нормалізувала на 10 добу. ВВ введення МСКЖТ приводило нормалізації рівня ДА вже через 10 діб спостереження, через 20–30 діб вміст ДА відповідав початковому рівню. За умов ВВ введення МСККМ нормалізація рівня ДА відбувалась на 20 добу експерименту. Відповідність показників початковому рівню спостерігали на 30 добу дослідів. ВМ введення МСККМ нормалізувало рівень ДА через 10 діб експерименту (кора лобової частки), у крові відповідність показників початковому рівню реєстрували на 30 добу. ВМ введення НМСККМ приводило до нормалізації рівня ДА через 10 діб після введення.

Аналіз мікротопографії чорної субстанції та прилеглої до неї тканини головного мозку у групі тварин інтактного контролю показав повну відповідність показникам статевовікової норми. У групі щурів з модельованим ПС SN характеризувалась трикутною формою. Її нейрони видовжені, бі-, монополярні, середньої величини, (вказівки на наявність відростків, формування конусів росту аксонів у місці відходження від тіла нейрона). Цитоплазма клітин базофільна, ядра — гіперхромні. Нейропіль у зонах SN та прилеглих до неї ділянках дрібно комірковий, з високим ступенем збереженості відростків нейронів.

На 7-му добу модельованого ПС у зоні SN глія чітко диференційована, нейрони поодинокі. На 14-у добу спостережень чорній субстанції виявлено морфологічні зміни, ідентичні попередньому періоду. 24 доба знаменувала завершення деструктивно-дегенеративних процесів. Відтерміновані періоди спостережень (44-та, 54-та доби) свідчили на користь активізації репаративно-регенеративних змін.

Аналіз різних способів клітинної трансплантації довів ефективність застосування останніх на тлі модельованого ПС. ВВ введення тваринам з модельованим ПС МСККМ у дозі 1×10^6 як на 10-ту добу спостережень, так і у подальші відпрацьовані терміни (20-та, 30-та доби) сприяло оптимізації морфологічного стану чорної субстанції, активації та подальшому розвитку репараційних процесів (збільшення мікрогліального пулу, чисельності нейронів, мікросудин на одиниці площі речовини підкоркового центру, забарвлення за Ніслем, збільшення: $\times 400$). МСККМ у дозі 2×10^6 за умов ВВ введення щурам з ПС сприяла підвищенню синтетичних процесів у речовині обстежених зон ушкодження та подальший прогрес репаративно-регенеративних реакцій.

ВВ введення МСКЖТ особинам з модельованим ПС (10 доба спостереження) призводила до помірного відновлення ушкоджених ділянок SN з супутнім мікроангіогенезом ($n=2$). 20-та доба спостереження свідчила на користь ідентичності мікроморфологічних змін попереднім термінам експерименту (збереження ознак деструкції речовини, сталий характер репаративно-регенеративних реакцій). На 30-ту добу спостережень (ВВ трансплантація МСКЖТ щурам з модельованим ПС) наявність відновних процесів залишалась очевидною, проте, носила гальмівний характер (рештки вогнищ деструкції, скупчення окремо розташованих дистрофічно змінених нейронів).

В експериментальній групі тварин з двотижневим модельованим ПС (ВВ спосіб введення МСККМ) на 10-ту добу спостережень реєстрували лише початкові морфологічні відновні зміни (форма нейроцитів, зміни у будові

мікросудин SN). 20 доба дослідів характеризувалась ідентичністю змін у відповідності до попереднього терміну. Морфологічні зміни, що реєстрували на 30-у добу експериментального періоду, характеризувались односпрямованістю та подальшим уповільненням відновних процесів.

ВМ введення МСККМ у зону SN особинам з модельованим ПС (10 доба спостереження) пригальмовує морфологічний регрес (деструктивні зміни у SN); на 20-ту добу посилює відновні процеси (поява у колишніх зонах деструкції скупчень нейронів різних форми та морфо-функціональної активності), 30-та доба спостережень свідчить на користь розвитку мікроангіогенезу.

Безпосереднє введення у зону чорної субстанції НМСККМ щурам з модельованим ПС призводило до поступального (10-та, 20-та, 30-та доби експериментів) підвищення відновних процесів у SN, з активацією мікроангіогенезу, зростанням чисельності нейронів та відновленням її будови, організацією деструктивних вогнищ.

Морфометрична оцінка змін у зоні SN щурів з модельованим ПС та заподіяними на його тлі ВВ, ВМ способами клітинної трансплантації довела статистично ймовірний характер відмінностей (кількість та площа тіла нейронів) у кожній із експериментальних груп. Співставлення показників щодо чисельності нейронів, локалізованих на рівні SN продемонструвало достовірний характер відмінностей кожного об'єкту вибірки, за виключенням ВМ НМСККМ У відповідності до отриманих результатів, очевидними стали зниження кількісних показників нейроцитів за умов розвитку модельованого ПС (рис. 9); незмінною є чисельність нейронів за умов ВВ введення МСККМ у дозі 1×10^6 та підвищення кількості нервових клітин у зоні SN при застосування ВВ способу введення МСККМ у дозі 2×10^6 на 10-20-ту доби спостережень. Цікавими видалися дані, що стосувались спостережень на 30-у добу, коли чисельність нейроцитів у зоні ушкодження головного мозку тварин кожної із зазначених груп майже досягла контрольного рівня.

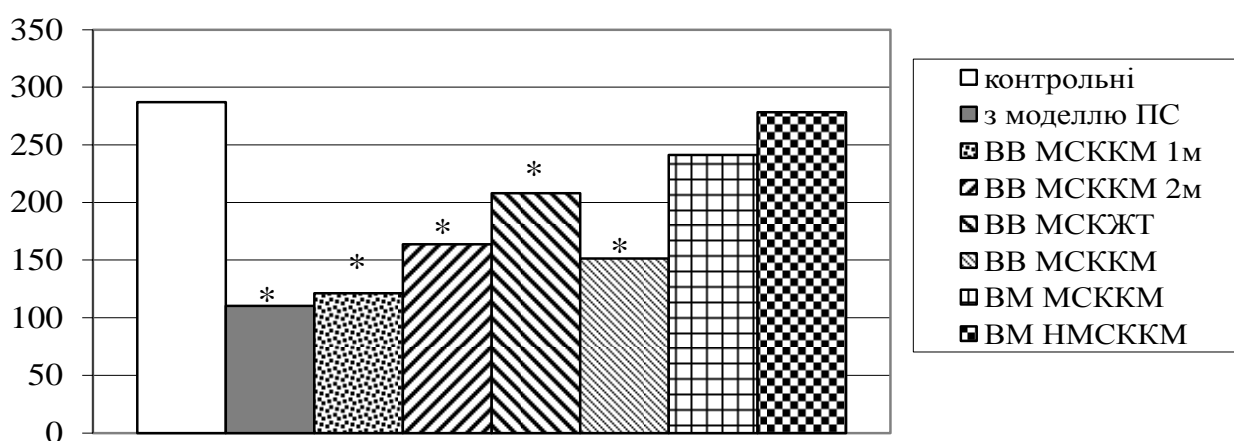


Рис. 9. Середня кількість нейронів SN головного мозку експериментальних щурів.

Примітка. * — відмінність відносно контролю вірогідна за $p < 0,05$.

Відновні процеси у групах особин з модельованим ПС та подальшим ВВ введення МСКЖТ/ МСККМ характеризувалась схожістю значень показників репопуляції нейронів від 10-20-ї діб до кінцевих термінів спостереження (30-та доба), коли чисельність нейронів наближалась до вихідного рівня. ВМ введення МСККМ та НМСККМ щурам з модельованим ПС справляло протекторну дію на речовину чорної субстанції (10–20-та доби) з посиленням репаративно-регенеративних процесів (30 доба).

Співставлення показників площі тіла нейронів на зрізах (зона SN) у кожній із експериментальних груп, за виключенням ВМ МСККМ, довело достовірний характер відмінностей (рис. 10).

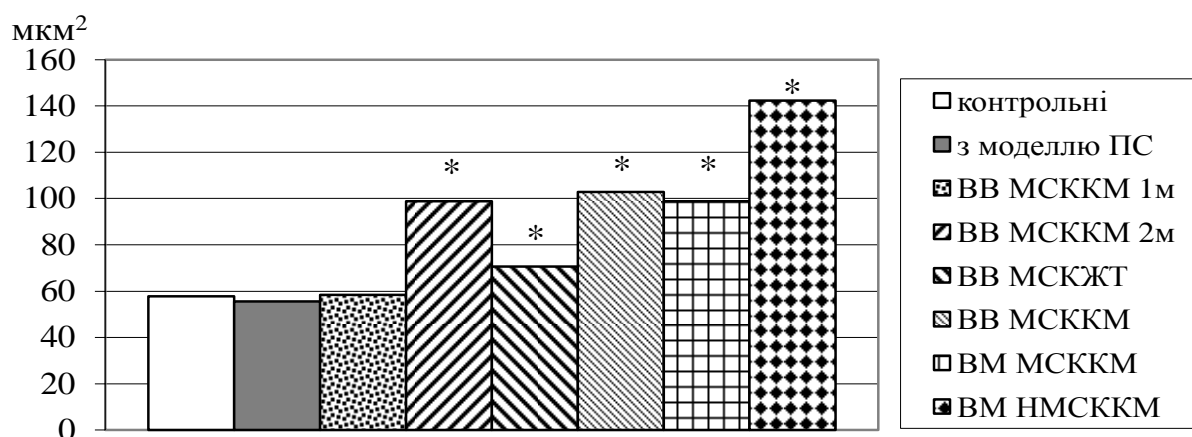


Рис. 10. Площа тіл нейронів (мкм²) SN головного мозку експериментальних щурів.

Примітка. * — відмінність відносно контролю вірогідна за $p < 0,05$.

У відповідності до статистичних даних площа тіл збережених нейронів зони SN головного мозку особин з модельованим ПС (порівняно з інтактним контролем) зменшувалась. Застосування ВВ введення МСККМ як у дозі 1×10^6 , так і 2×10^6 , суттєвим чином не впливало на вищезазначені величини. На відміну до цього ВВ введення МСКЖТ та МСККМ призводило (порівняно з групою модельованого ПС) до збільшення площі тіл нейронів. ВМ введення МСККМ та НМСККМ щурам з ПС сприяло помітному підвищенню показників площі тіл нейронів.

Аналіз препаратів інтактного головного мозку щурів, до яких застосовували ВВ, ВМ введення флуоресцентно мічених клітин, довів відсутність останніх у базальних ядрах та мінімізовану чисельність у інших органах (печінка, нирки, $\Sigma=2$ на 10 препаратів). З іншого боку, спостереження за міченими флуоресцентним барвником клітинами у групах експериментальних тварин наявно продемонстрували здатність останніх до міграції. На 4-ту, 9-ту доби ВВ

введення клітинного субстрату характерну флуоресценцію спостерігали у препаратах головного мозку, печінки, нирок тварин з попередньо модельованим ПС. ВМ введення мічених клітин особинам із модельованим ПС, як на 4-ту, так і на 9-ту добу сприяло появі флуоресценції навколо пошкодженої зони SN. Незалежно від способів введення, флуоресцентні клітини переважно розосереджувались у зоні деструкції (SN), субталамічних ділянках. ВМ спосіб трансплантації призводив до появи щільних та більш чисельних (за умов ПС виключно у зоні введення) скупчень мічених клітин, ніж за умови ВВ введення. Відтермінованість спостережень сприяла втратам кількості мічених клітин: 4 доба- n=6-7, 9-та n=2-3.

ВИСНОВКИ

У дисертації представлене теоретичне узагальнення та вирішення наукової задачі нейрохірургії — експериментальне обґрунтування нейрохірургічного лікування паркінсоподібного синдрому шляхом застосування мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини.

1. Мікронейрохірургічна стереотаксична білатеральна деструкція зони SN шляхом введення 6-OHDA (8 мкг/кг) викликає у щурів за умов експерименту розвиток паркінсоподібного синдрому з появою характерних для нього моторних розладів та супроводжується змінами форми клітин, появою базофільної зернистості у їх цитоплазмі, гіперхроматозу, розвитком деструкції, дистрофії.

2. Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку введені інтактним щурам внутрішньовенним та внутрішньомозковим способами на 4-ту- 9-ту добу спостережень, відсутні у чорній речовині головного мозку, мінімізовано представлені у критичних органах (печінка, нирки).

3. Відновлення моторних функцій у експериментальних щурів з модельованим паркінсоподібним синдромом досягається шляхом внутрішньовенного введення мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини на 10–15 добу.

4. Введення у SN щурів з модельованим ПС нейроіндукованих мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку є більш ефективним, ніж застосування не індукованих клітин.

5. У тварин з модельованим ПС найбільш ефективним є внутрішньомозкове введення мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку, яке забезпечує їх безпосередню доставку до зон ушкодження та активує процеси відновлення (4-та доба) у чорній субстанції і пристосувально-компенсаторні зміни; їх виразність корелює з термінами дослідження.

6. Структурні зміни у речовині головного мозку, що відповідають відновним процесам у разі застосування внутрішньовенного введення мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини щурам з модельованим ПС носять дозозалежний (2×10^6) характер, проявляються на 10–15-ту доби спостереження.

7. Найбільш ефективним з точки зору нормалізації (10-та доба) та вихідного рівня (30-та доба) показників вмісту дофаміну у крові та корі лобової частки є внутрішньомозкове введення нейроіндукованих мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Удосконалено спосіб моделювання ПС у щурів шляхом білатеральної деструкції SN введенням 6-OHDA. Модель є адекватною для подальшого дослідження результатів корекції ПС в експерименті.

2. Удосконалено спосіб корекції ПС у щурів, який полягає у застосуванні МСККМ, МСКЖТ (у дозах 1×10^6 , 2×10^6) різними способами (внутрішньовенним, внутрішньомозковим). Модель є адекватною для подальшого дослідження результатів корекції ПС в експерименті.

3. Застосування МСККМ, МСКЖТ для корекції експериментального ПС створює перспективи для їх подальшого використання у клінічній практиці (усунення моторних розладів).

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Особенности миграции меченых мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, введенных крысам с паркинсоноподобным синдромом / В.А. Пятикоп, М.А. Мсаллам, Е.А. Щегельская [и др.] // Український нейрохірургічний журнал. — 2014. — № 3 (67) — С. 42–48.

(Особистий внесок здобувача полягає у моделюванні паркинсоноподібного синдрому, визначенні хірургічних шляхів введення мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку).

2. Сравнительная эффективность внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крысам, у которых моделировали паркинсоноподобный синдром / В.А. Пятикоп, М.А. Мсаллам, Е.А. Щегельская [и др.] // Український нейрохірургічний журнал. — 2014. — № 2 (66) — С. 55–61.

(Особистий внесок здобувача полягає у розробці внутрішньовенного способу введення мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку, порівняльному аналізі його ефективності).

3. Сравнительная эффективность введения в чёрную субстанцию мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека и индуцированных клеток по нейрональному пути в модели паркинсоноподобного синдрома / В.А. Пятикоп, М.А. Мсаллам, Е.А. Щегельская [и др.] // Експериментальна і клінічна медицина. — 2014. — № 2 (63) — С. 131–138.

(Особистий внесок здобувача полягає у розробці та хірургічному опрацюванні способів введення мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку у чорну субстанцію, співставленні показників їх ефективності).

4. Влияние введений 6-гидроксидаофамина в чёрную субстанцию на поведение крыс / В.А. Пятикоп, М.А. Мсаллам, А.В. Цыганков [и др.] // Медицина сьогодні і завтра. — 2014. — № 1 (62) — С. 23–29.

(Особистий внесок здобувача полягає в оцінці динаміки рухової поведінки піддослідних тварин, проведенні статистичного аналізу отриманих результатів).

5. Efficacy of human bone marrow mesenchymal stem cells injection into the substantia nigra at Parkinson-like syndrome / V.A. Pyatikor, M.A. Msallam, E.A. Shchegelskaya, I.A. Kutovoy // Science and Education in Australia, America and Eurasia: Fundamental and Applied Science: The 1-st International Academic Conference (Australia, Melbourne, 25 June 2014): Papers and commentaries. — Melbourne, 2014. — Vol. 1. — P. 549–553.

(Особистий внесок здобувача полягає у розробці критеріїв ефективності введення стовбурових клітин кісткового мозку у чорну речовину).

6. Коррекция двигательных нарушений у крыс с паркинсоноподобным синдромом с помощью внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани человека / В.А. Пятикоп, М.А. Мсаллам, Е.А. Щегельская, Т.В. Горбач // Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неонатології та дитячій неврології : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, Київ, 2013 р. — С. 17.

(Особистий внесок здобувача полягає у розробці способів корекції моторних розладів у експериментальних шурів шляхом введення мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку, жирової тканини).

7. Миграция мезенхимальных стволовых клеток костного мозга у крыс с моделью паркинсоноподобного синдрома при различных способах их введения / В.А. Пятикоп, М.А. Мсаллам, Е.А. Щегельская [и др.] // V з'їзд нейрохірургів України, Ужгород, 2013. — С. 256.

(Особистий внесок здобувача полягає дослідженні міграції мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку при застосуванні різних способів їх введення).

АНОТАЦІЯ

Мсаллам М.А. Застосування мезенхімальних клітин кісткового мозку при експериментальному паркінсоноподібному синдромі. — Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук зі спеціальності 14.01.05 — нейрохірургія. ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», Київ, 2015.

Дисертація присвячена вивченню впливу застосування мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (МСККМ) і жирової тканини на морфофункціональні зміни при експериментальному паркінсоноподібному синдромі (ПС).

Дослідження проведене на 79 щурах лінії Wistar обоє статі 3-х місячного віку масою тіла 200–250 г. ПС моделювали шляхом двобічного введення 6-гідроксидаофаміну (6-OHDA) в substantia nigra (SN). Застосування стовбурових клітин відбувалась шляхом внутрішньовенного (ВВ) та внутрішньомозкового

(ВМ) способів. Концентрацію дофаміна (ДА) визначали у периферичній крові та речовині кори головного мозку (лобна частка). Результати оцінювали на 10-у, 20-у, 30-у доби трансплантації. У результаті дослідження було встановлено, що внутрішньомозковий спосіб введення МСККМ більш ефективний, ніж альтернативний внутрішньовенний (низькоінвазивний та менш ускладнений). Доза 2×10^6 МСККМ при ПС (внутрішньовенний спосіб введення) більш дієва, ніж 1×10^6 . Трансплантація МСККМ у зону чорної субстанції прискорює відновні процеси у locus morbi та скорочує перебіг ПС.

Ключові слова: експеримент, паркінсоноподібний синдром, дофамін, чорна субстанція, мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку та жирової тканини, морфологія, когнітивні показники.

АННОТАЦІЯ

Мсаллам М.А. Применение мезенхимальных клеток костного мозга при экспериментальном паркинсоноподобном синдроме. — Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.05 — нейрохирургия. ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины», Киев, 2015.

Диссертация посвящена изучению влияния применения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСККМ) и жировой ткани на морфофункциональные изменения при экспериментальном паркинсоноподобном синдроме (ПС).

Исследование проведено на 79 крысах линии Wistar обоего пола 3-х месячного возраста массой тела 200–250 г. ПС моделировали путем двухстороннего введения 6-гидроксидофамина (6-OHDA) в substantia nigra (SN). Применение стволовых клеток осуществлялась путем внутривенного (ВВ) и внутримозгового (ВМ) способов. Концентрацию дофамина (ДА) определяли в периферической крови и веществе коры головного мозга (лобная доля).

Билатеральная деструкция SN с помощью введения 6-OHDA вызывает у животных развитие ПС с характерными двигательными проявлениями (монотонными движениями головой, вертикальным положением хвоста, горбообразным изгибом туловища, потерей веса, тремором мышц, ригидностью мышц и малоподвижностью), морфологическими изменениями в SN и снижением уровня ДА в крови и в лобной доле головного мозга крыс. Морфометрическая оценка микропрепаратов проведена по двум показателям: количеству нейронов, средней площади тела нейронов.

Флюоресцентные прижизненные красители DiO C 18 (зеленый) и Rhod Chol (красный) могут быть эффективно использованы для изучения свойств МСК в культуре и миграции введенных меченых МСК костного мозга к зонам повреждения головного мозга при моделировании паркинсоноподобного синдрома у крыс.

Результаты оценивали на 10-е, 20-е, 30-е сутки трансплантации. В результате исследования было установлено, что внутримозговой способ введения МСККМ более эффективный, чем альтернативный внутривенный

(низкоинвазивный и менее усложненный). Доза 2×10^6 МСККМ при ПС (внутривенный способ введения) более действенна, чем 1×10^6 . Трансплантация МСККМ в зону черной субстанции ускоряет восстановительные процессы в locus *torbi* и сокращает течение ПС.

Одним из патогенетически обоснованных направлений в лечении паркинсонизма может быть клеточная терапия, направленная на восстановление дофаминэргических нейронов, предотвращение апоптоза, оксидантного стресса и митохондриальной дисфункции. Альтернативным методом клеточной терапии двигательных нарушений у больных паркинсонизмом является применение МСККМ, индуцированных по нейрональному пути. Для наибольшего эффекта можно использовать стереотаксический аппарат и визуализацию с помощью компьютерной томографии головного мозга для точного попадания в SN.

Ключевые слова: эксперимент, паркинсоноподобный синдром, дофамин, черное вещество, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга и жировой ткани, морфология, когнитивные показатели.

SUMMARY

Msallam M.A. Use of mesenchymal bone marrow cells in experimental Parkinson-like syndrome. — The manuscript.

Thesis for maintaining of scientific degree of candidate of medical sciences on speciality 14.01.05 — neurosurgery. SI “Institute of neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov NAMS Ukraine”, Kyiv, 2015.

Thesis deals with research on action of mesenchymal stem cells derived from bone marrow (BMMSC) and lipid tissue (LTMSC) on behavioral movemental reactions, biochemical and morphological changes in experimental Parkinson-like syndrome (PS).

The research was conducted on 79 rats of Wistar line with 200–250 g of mass aged 3–4 months (54 male, 25 female). PS modeling was performed with both-sided stereotactic introduction of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into substantia nigra (SN). Stem cells were introduced intravenously (IV) and intracerebrally (IC). The concentration of dopamine (DA) was estimated in blood and in brain frontal lobe. Results were evaluated on 10th, 20th, 30th days after MSC introduction. Efficacy of IC introduction of BMMSC is higher comparing with IV, while IV way is less invasive, less complicable and may be an alternative to IC. Intravenous introduction of rats BMMSC in dosage of 2×10^6 in PS is more effective than in dosage of 1×10^6 . Intravenous introduction LTMSC in parkinsonian rats is more effective than IV introduction BMMSC. Introduction of neuroinduced BMMSC into SN causes more intensive effect on PS cours than use on non-induced BMMSC.

Key words: experiment, Parkinson-like syndrome, dopamine, substantia nigra, bone marrow and lipid tissue mesenchimal stem cells, morphology, behavior data.

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДА	Дофамін
ВВ	Внутрішньовенний
ВМ	Внутрішньомозковий
МСК	мезенхімальні стовбурові клітини
МСККМ	мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку
ПС	паркінсоноподібний синдром
ХВ	хвостова вена
МСКЖТ	мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини
ХП	хвороба Паркінсона
6-OHDA	6-гідроксидофамін
НМСККМ	нейроіндуковані МСККМ
SN	чорна субстанція (substantia nigra)