

КОРРЕКЦИЯ МОТОРНОГО ДЕФИЦИТА МЕЗЕНХИМНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ У КРЫС С ТРАВМОЙ ДОМИНАНТНОГО ПОЛУШАРИЯ

*Авалиани Т.В. *, Федотова О.Р. *, Соколова И.Б. **, Цикунов С.Г. **

*НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН

** Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (С-Петербург).

tanaavaleeani@mail.ru

Локальное повреждение любой этиологии (ишемический и геморрагический инсульт, черепно-мозговая травма (ЧМТ), нейрохирургическое вмешательство) приводит к активации целого комплекса пато- и саногенетических механизмов всего мозга. Травма головного мозга сопровождается воспалением, некротической гибелью клеток ЦНС, что приводит к нарушению межнейронных связей. ЦНС как динамичная и пластичная формация способна к самовосстановлению. После ЧМТ происходит замещение поврежденного участка глиомезенхимальными элементами и реорганизация межнейронных взаимоотношений между сохранившимися нейронами различных отделов мозга. Реорганизация осуществляется за счет активации механизмов роста отростков (дендриты, дендритные шипики и аксоны) и синапсов нейронов. Пока недостаточно ясно, как происходит восстановление связей между очагом повреждения и соседними модулями коры большого мозга в посттравматическом периоде, и можно ли целенаправленно воздействовать на этот процесс.

В последнее время все большее внимание исследователей привлекает возможность управлять восстановительными и репаративными процессами в патологических измененных тканях. В обычном варианте развития патологического процесса в эпителиально-мезенхимальных тканях образуется соединительнотканый рубец, а в случае нервной ткани – глиальный [6]. Рубцовая ткань нарушает структуру соответствующей ткани и частично изменяет её функцию. Например, после инсульта или операции на мозге образование глиального рубца приводит к нарушению или даже утрате проводимости нервного импульса на данном участке. В этом аспекте особенно актуально применение стволовых клеток [7]. Было показано, что клеточная терапия ишемического инсульта головного мозга с помощью мезенхимных стволовых клеток (МСК) приводит к практически полному восстановлению поведения животных примерно через 4 нед и к частичному улучшению неврологического статуса к этому же сроку после травмы [3].

У крыс динамика регресса двигательного дефицита после повреждений сенсомоторной коры справа или слева различна, а выраженность и специфичность нейрогуморальных реакций животных зависит от исходного профиля функциональной асимметрии мозга [2,8].

Цель данной работы – показать идентичность или различия при восстановлении двигательных реакций у правшей и левшей с травмой двигательной коры доминантного полушария при трансплантации мезенхимных стволовых клеток.

Материалы и методы.

Исследование проводили на самцах линии Wistar Kyoto (n=50) массой 200 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище, исследования проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1986).

У интактных крыс после 48-ми часовой пищевой депривации определяли моторную преференцию по методу Дж. Петерсона [9], основанного на предпочтении использования одной конечности в связи с пищедобывающей деятельностью. Небольшой диаметр трубки (12мм) позволял животному использовать только одну конечность при каждой попытке получения подкрепления. Опыт продолжали до совершения животными 10 последовательных точных взятий подкрепления. Левшами и правшами считали тех крыс, которые совершали все 10 взятий только одной конечностью.

Удаление двигательной коры мозга доминантного по моторной преференции полушария проводилось под наркозом золетил (Zoletil 100, Франция) (30 мкл раствора), введенного интраперитонеально. С помощью бормашины в теменной кости черепа высверливали отверстие площадью 2x3 мм, удаляли твердую мозговую оболочку и всю двигательную кору (AP= -1-4 мм от брегмы; SD=1,0 мм латерально от сагиттального шва). Глубина повреждения не превышала 2 мм. Кожную рану на голове ушивали. У части крыс сразу после травмы мозга проводили трансплантацию 5 млн МСК в 100 мкл среды α MEM в хвостовую вену.

Выделение, культивирование, окрашивание МСК из костного мозга крыс проводили по стандартной методике [5]. Фенотипирование МСК крыс проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США). Клеточный материал был предоставлен ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург (Генеральный директор, к.б.н. Полинцев Д.Г.).

Через 6 недель после травмы у спинализованных в грудном отделе крыс исследовали спонтанную и вызванную электрораздражением электромиографическую активность (ЭМГ) мышц задних конечностей (m.m. tibialis ant., m.m. gastrocnemius) справа и слева по ранее разработанной методике [1]. Рефлекторный ответ оценивали по количеству пересечений порога, установленному на уровне 25мкВ (при шуме около 10мкВ). Каждую мышцу стимулировали 10 раз. Мерой реакции (ΔP) служила усредненная разность между количеством ЭМГ-разрядов после стимуляции и таковыми до стимуляции (спонтанная ЭМГ активность). Устойчивость реакции определяли по изменению частотных характеристик ЭМГ-реакций через 40 мин (2-я регистрация) по сравнению с ЭМГ-показателями первой регистрации (через 20 мин, после перерезки спинного мозга в грудном отделе) и высчитывали по формуле:

$$\frac{\Delta P_{40} - \Delta P_{20}}{\Delta P_{20}} \times 100 \%$$

Достоверность отличий ЭМГ показателей вычисляли по непараметрическому ранговому критерию Mann-Whitney с уровнем надежности $p \leq 0.05$ (программа Statgraphics).

Результаты

У контрольных правой и левой ЭМГ показатели спонтанной и вызванной ЭМГ-активности мышц задних конечностей достоверно не отличались. Через 6 недель после травмы у крыс с моторным дефицитом регистрировались тонические нарушения в мышцах сгибателях контралатеральной стороны (табл.1). Нарушения рефлекторных реакций выявлены только у правой с левосторонней травмой (табл.2). При этом у правой в мышцах задних конечностей наблюдалась асимметрия как спонтанных, так и вызванных ЭМГ реакций.

Клеточная терапия способствовала улучшению показателей ЭМГ реакций в обеих группах. Но трансплантация МСК крысам при правосторонней травме (у левой) была более эффективна, чем у крыс с левосторонней травмой моторной коры (у правой).

**Таблица 1. Частота спонтанных ЭМГ- реакций мышц задних конечностей
Wistar kyoto за 5 сек анализа**

группы	1	2	3	4
Контроль правши	132.8±15.9	102.4±21.6	114.4±38.2	115.8±36.8
Контроль левши	174.3±75.0	153.3±61.4	153.6±58.0	186.8±69.1
Правши ЛТ	183.8±53.5	400.5±112.4***#	140.0±44.1	178.8±85.4
Правши ЛТ+МСК	196.6±54.7	178.2±47.9#	223.4±68.3 *	104.9±18.6
Левши ПТ	164.2±27.9	189.6±63.9	157.1±44.1	253.0±109.6*
Левши ПТ+МСК	184.3±43.0	191.0±81.9	182.0±23.4	124.2±29.1

Обозначения: 1,3- мышцы разгибатели, 2,4-мышцы сгибатели справа, слева; ПТ и ЛТ право- и левосторонняя травма мозга; МСК - мезенхимные стволовые клетки; *- P≤0.05, **-P≤0.01 по отношению к контролю, #- P≤0.05 асимметрия справа-слева

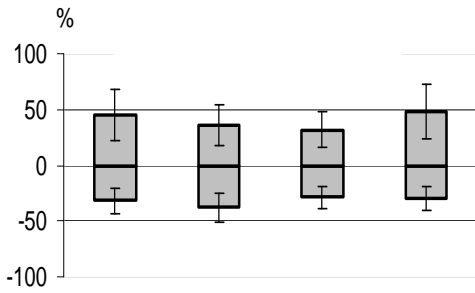
**Таблица 2. Частота вызванных ЭМГ- реакции
мышц задних конечностей Wistar kyoto за 5 сек анализа**

группы	1	2	3	4
Контроль правши	45.4±19.4	22.1±9.1	22.3±3.4	22.7±6.9
Контроль левши	39.4±10.5	34.4±12.4	25.4±4.2	30.4±6.8
Правши ЛТ	43.5±23.0#	9.75±10.2***#	18.5±3.1	35.8±17.6
Правши ЛТ+МСК	52.1±18.1#	29.6±17.5	21.1±11.7	14.5±7.6
Левши ПТ	18.9±6.5*	25.1±12.2	20.1±18.0	23.5±12.8
Левши ПТ+МСК	23.9±9.1	23.3±12.2	22.8±7.2	28.2±8.3

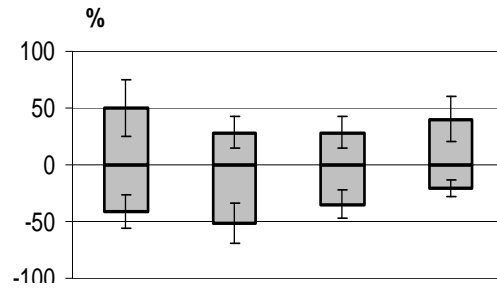
Обозначения те же, что и в таблице 1.

Одной из характеристик функциональных систем является лабильность - функциональная подвижность. Патологическая лабильность одна из форм нарушения подвижности возбудительного или тормозного процессов.

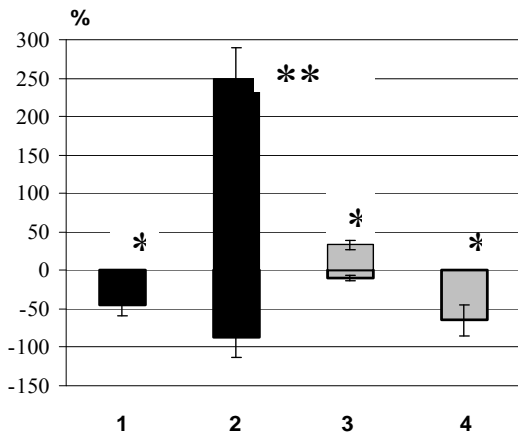
**Правши
контроль**



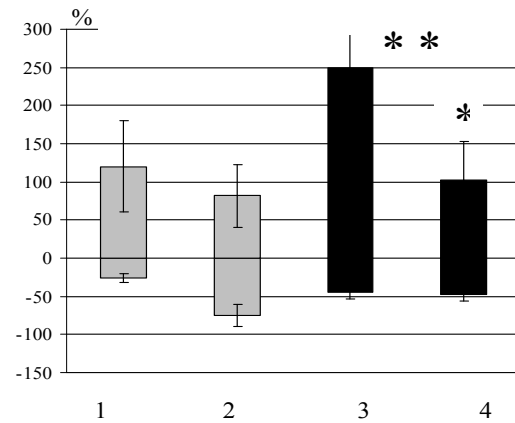
**Левши
контроль**



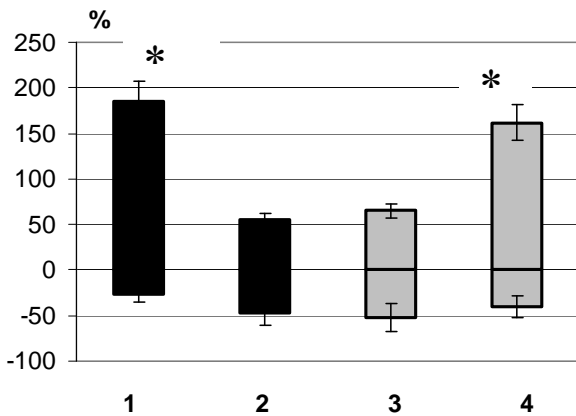
Левосторонняя травма



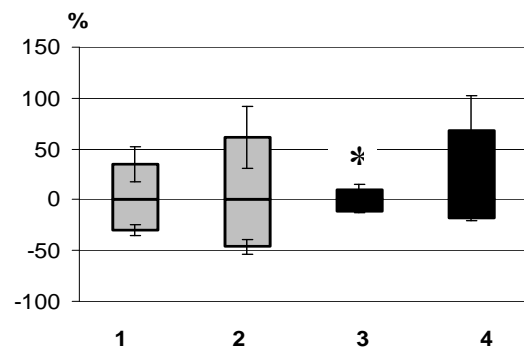
Правосторонняя травма



Левосторонняя травма +МСК



Правосторонняя травма +МСК



Устойчивость вызванных ЭМГ реакций мышц задних конечностей крыс

Обозначения: по оси ординат - устойчивость реакции - отношение разности показателей ЭМГ-реакций через 40 и 20 мин после перерезки спинного мозга к ЭМГ показателями 1-ой регистрации в процентах; 1,3-мышцы-разгибатели, 2,4-мышцы сгибатели справа, слева;

** - $p \leq 0.01$, * - $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем. Черным цветом выделены ЭМГ показатели мышц стороны поражения

У интактных крыс изменения вызванных ЭМГ реакций мышц задних конечностей в процессе эксперимента носили симметричный характер. Увеличение в среднем не превышало 50, а уменьшение -40 процентов по сравнению с показателями, регистрируемыми у крыс через 20 минут после перерезки спинного мозга (рисунок).

Правосторонняя травма коры мозга приводила к неустойчивости вызванных ЭМГ реакций в мышцах левой лапы, в большей степени в мышцах-разгибателях. У крыс экспериментальной группы введение МСК нормализовало функционирование мышц-сгибателей левой лапы по показателям устойчивости вызванных ЭМГ реакций, но при этом резко возрастали тормозные процессы в мышцах разгибателей.

Левосторонняя травма двигательной коры у правшей вызывала растормаживание в сгибателе правой лапы и усиление тормозных процессов в сгибателе левой и разгибателе правой конечности. Клеточная терапия нормализовала ЭМГ активность в мышцах, обуславливающих асимметрию позы, вызванную левосторонней травмой мозга, но приводила к растормаживанию в противоположных мышцах-антагонистах.

Обсуждение и выводы.

В зависимости от функционального состояния и/или характеристик воздействующего фактора, существующие церебральные и периферические системы асимметрии, взаимодействуя между собой, могут приводить к преобладанию эффекта воздействия в том или ином органе слева или справа [4].

В наших исследованиях через 6 недель после одностороннего удаления моторной коры у крыс степень выраженности двигательных нарушений зависела от латерализации травмы. Более значительные двигательные расстройства выявлены при травме доминантного полушария у правшей.

Трансплантация мезенхимных стволовых клеток особям с двигательными расстройствами, вызванных травмой двигательной коры, способствовала нормализации тонических и рефлекторных ЭМГ реакций и положительно влияла на восстановление устойчивости рефлекторных ЭМГ реакций. Но если у крыс левшей с правосторонней травмой вызванные ЭМГ реакции стали даже более стабильные, чем в контроле, то у правшей нормализация ЭМГ реакций на стороне поражения сопровождалась снижением устойчивости в мышцах-сгибателях условно-здоровой стороны и мышцах-разгибателях стороны поражения, т.е. наблюдалась реверсия асимметрии.

Эффективность применения МСК зависела от латерализации травмы мозга. Наиболее выраженная коррекция наблюдалась при правосторонней травме, что подтверждается как показателями спонтанных и вызванных ЭМГ реакций, так и

устойчивостью реакций. Нормализация процессов наблюдалась, прежде всего, в мышцах стороны поражения.

Изменения в мышцах–антагонистах противоположных конечностей, возможно, связаны с тем, что примерно вдвое у крыс с левосторонней травмой после клеточной терапии увеличивается количество сосудов в симметричных зонах правого полушария по сравнению с нормой [3]. Возможно эти процессы, способствующие восстановлению утраченных функций, и приводят к повышенной активности в структурах мозга, обеспечивающих работу соподчиненных мышечных групп.

Литература:

1. Богданов О.В., Михайленок Е.Л., Авалиани Т.В. Афферентная детерминация образования трансферного фактора в спинном мозге крыс Бюлл. эксперим. биол. и мед.. 1987. Т.95. №10. С.396-398.
2. Вартамян Г.А., Клементьев Б.И. Химическая симметрия и асимметрия мозга. Л.:Наука. 1991.151с.
3. Зинькова Н. Н., Гилерович Е. Г., Соколова И. Б., Вийде С. К., Шведова Е. В., Александров Г. В., Кругляков П. В., Кислякова Т. В., Полынцев Д. Г. Терапия ишемического инсульта головного мозга у крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток. Цитология, 2006. №5. С.24-27.
4. Коноваленко Р.И., Чернышова М.П., Штылик А.В., Ноздрачев А.Д. Асимметрия периферических эффектов унилатерального интраназального введения окситоцина у самцов белых крыс. Доклады АН 1995. Т.342, №2, С.269-272.
5. Соколова И.Б., Зинькова Н.Н., Билибина А.А., Кругляков П.В., Гилерович Е.Г., Полынцев Д.Г., Отеллин В.А. Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007. Т. 2. № 4. С. 54 – 62.
6. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. К вопросу о механизмах, лежащих в основе процессов восстановления и репарации в тканях. Ж. Клеточные технологии в биологии и медицине, 2010, №1, С.32.
7. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. //Biochemical physics frontal reseach / Eds. S.D. Varfolomeev et al. NY, 2007, P.21-33.
8. Neveu P.J.Brain lateralization and immunomodulation.Pain.1998.V.76.№3.P.297-307.
9. Peterson G.M. Transfers in handedness in the rat from forced practice. J.Comp. Physiol. Psychol. 1951.V.44.P.184-190.