

ВЕТЕРИНАРНЫЕ НАУКИ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ СПИННОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЕ У СВИНЕЙ

Амиров Дамир Рауфович

кандидат вет. наук, доцент

Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, г. Казань

Сергеев Михаил Анатольевич

кандидат вет. наук, доцент

Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, г. Казань

THE USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS TO STIMULATE THE REGENERATION OF SPINAL CORD TISSUES IN EXPERIMENTAL CONTUSION TRAUMA IN PIGS

Amirov Damir Raufovich

Candidate of Science, assistant professor

Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, Kazan

Sergeev Mikhail Anatolievich

Candidate of Science, assistant professor

Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, Kazan

DOI: 10.31618/nas.2413-5291.2020.3.62.349

АННОТАЦИЯ

В результате смодулированной контузионной травмы спинного мозга у свиней в остром посттравматическом периоде наблюдались симптомы спинального шока, которые проявились в виде синдрома Шиффа-Ширингтона и отсутствия вегетативных спинальных рефлексов.

Более полноценное устранение функциональной неврологической дисфункции после нанесения травмы спинного мозга, отмечалось у животных, которым производилась аппликация в зону поврежденного сегмента спинного мозга мезенхимальных стволовых клеток (МСК) адипогенного происхождения.

ABSTRACT

As a result of a modulated spinal cord contusion injury, the pigs in the acute post-traumatic period showed symptoms of spinal shock, which manifested as Schiff-Shirington syndrome and the absence of autonomic spinal reflexes.

More complete elimination of functional neurological dysfunction after spinal cord injury was observed in animals that were applied to the area of the damaged segment of the spinal cord with mesenchymal stem cells (MSCs) of adipogenic origin.

Ключевые слова: свиньи; травма спинного мозга; неврологическое исследование; стволовые клетки; миелография; ликвор.

Key words: pigs; spinal cord injury; neurological examination; stem cells; myelography; liquor.

В настоящее время интерес практикующих врачей вызывают исследования связанные с трансплантацией стволовых клеток, имеющих способность дифференцироваться в специфические типы клеток, которые могут способствовать регенерации травмированной нервной ткани. С этой точки зрения наиболее перспективными представляются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые обладают возможностью секреции различных нейротрофических факторов и цитокинов, возможностью дифференцировки в различных направлениях [2, 3, 5].

Наиболее распространенным источником МСК является костный мозг (КММСК). Однако, технические и медицинские трудности ограничивают их широкое и успешное

использование в клинике. МСК, полученные из жировой ткани и из пульпы зуба, являются хорошей альтернативой КММСК.

Материалы и методы. Исследования проведены на кафедре хирургии, акушерства и патологии мелких животных Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана в 2016-2018 гг.

Выделение, культивирование и фенотипирование мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и пульпы зуба проводили в лаборатории кафедры генетики Казанского Приволжского Федерального Университета (Институт фундаментальной медицины и биологии).

Объектом исследований послужили 9 свиной - самок вьетнамской вислорбрюхой породы в возрасте 5-6 месяцев, с массой тела 15–20 кг. Содержание и работу с животными проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS №123) и закона «О ветеринарии РФ» от 14.05.1993 N 4979-1 [1].

Иссеченные лоскуты кожи с подкожной жировой клетчаткой и экстрагированные зубы свиной доставляли в лабораторию в сумке-холодильнике при 4°C в растворе α -MEM с гентамицином в течение 1 часа.

Все манипуляции по выделению мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и пульпы зуба проводились в стерильных условиях при ламинарном токе воздуха. Стволовость полученных клеток подтверждали методом проточной цитофлуориметрии на аппарате BD Accuri C6 и лазерной конфокальной микроскопии при помощи микроскопа LSM 800 с модулем Airyscan показывающей экспрессию полученными клетками маркеров: CD29, CD44 и Thy-1. Клеточно-терапевтический препарат готовили непосредственно перед применением.

Модель контузионной травмы спинного мозга воспроизводили на уровне 11 грудного сегмента по методике Lee J. et al [4].

Через 6 недель после нанесения травмы у свиной удаляли спайки в области повреждения, проводили несколько продольных насечек твердой мозговой оболочки и наносили 1 мл суспензии содержащей 8 млн. аутогенных мезенхимальных стволовых в смеси с 150 мкл фибринового гидрогеля Тиссукол-Кит.

Первой группе животных (n=3) вводили клетки адипогенного происхождения (ЖМСК), второй группе животных (n=3) - из пульпы зуба (ПМСК), третья группа (n=3) оставалась контрольной - этим животным в аналогичных условиях накладывали Тиссукол-Кит без клеток.

После проведенных оперативных вмешательств на спинном мозге за животными ежедневно вели наблюдение, оценивали клинический статус.

Неврологическое исследование выполнялось до нанесения травмы, а затем каждые 7 дней в течение 14 недель. Оценку неврологического статуса свиной осуществляли по десятибалльной

поведенческой шкале локомоции (Porcine Thoracic Injury Behavior Scale - PTIBS) [4].

Миелографию у свиной проводили после введения в субарахноидальное пространство рентгеноконтрастного вещества Омнипак-300 в дозе 0,3 мл/кг.

Спустя 3 дня после аппликации мезенхимальных стволовых клеток в зону поврежденного сегмента спинного мозга, свиным всех трех групп назначили активную кинезиотерапию ежедневно по 30 минут в течение двух месяцев.

Результаты и обсуждение. Через сутки после воспроизведения контузионной травмы спинного мозга животные большую часть времени лежали на боку, с трудом опирались на грудные конечности, слабо реагировали на внешние раздражители. Температура тела была ниже нормы, отмечалась тахикардия и тахипное.

Наиболее выраженная неврологическая дисфункция отмечалась у большинства животных в течение первой недели после травмы. Восстановление как вегетативных, так и соматических рефлексов происходило к концу третьей недели.

При выполнении миелографии у свиной через 10 дней после нанесения контузионной травмы спинного мозга определялся блок ликворных путей, характеризующийся нарушением контрастирования субарахноидального пространства краниальнее 12 грудного позвонка. Кроме того, отмечалось истончение вентральных и дорсальных ликворных пространств со смещением их наружу, в сторону костных структур спинномозгового канала (Рисунок 1А).

На 30 день после воспроизведения травмы спинного мозга на рентгено-граммах контрастное вещество равномерно распределялось по всему ликворному пространству. Данные миелографии свидетельствовали о восстановлении проходимости ликворных путей (Рисунок 1Б).

В связи с блокировкой ликворного пространства в зоне поврежденного сегмента при люмбальной пункции через сутки после воспроизведения травмы ликвор удалось получить только у трех из девяти свиной, по каплям, в малом объеме: 0,5-0,6 мл. Ликвор был со значительной примесью крови. Относительная плотность спинномозговой жидкости была повышена, а концентрация белка в 3 раза превышала физиологическую норму.

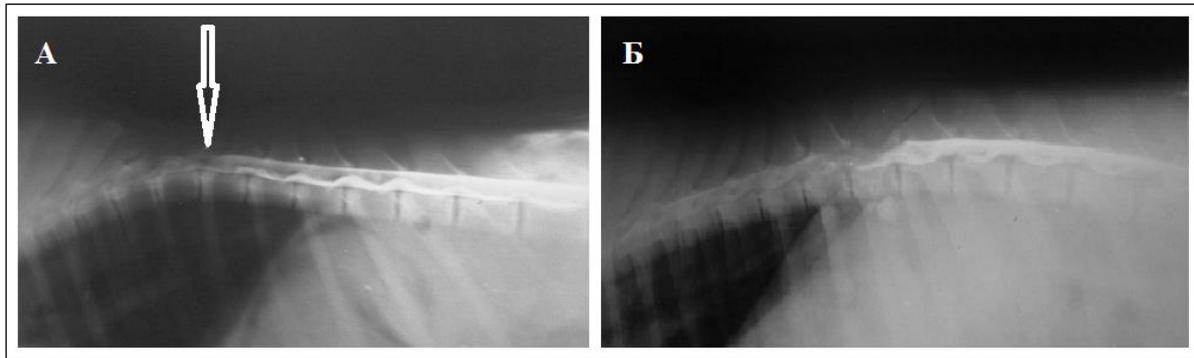


Рисунок 1. Рентгенограмма позвоночника свиньи:
 А) через 10 дн. после воспроизведения травмы спинного мозга;
 Б) через 30 дн. после воспроизведения травмы спинного мозга
 (Стрелкой показана область блока ликворных путей).

При микроскопии в камере Фукса-Розенталя выявлялась большое количество неокрашенных реактивом Самсона эритроцитов. При подсчете их количества было установлено, что в 1 мкл спинномозговой жидкости содержится более 18 тыс. эритроцитов. Количество лейкоцитов было также достаточно высоким: в 1 мкл ликвора составило в среднем 124 ± 36 , что более чем в 10 раз превышало верхнюю границу физиологической нормы.

Через 10 дней ликвор удалось получить у 8 животных из 9. Однако, вследствие сохранения нарушений проходимости ликворных путей, объем полученной спинномозговой жидкости не превышал 0,5 мл от каждого животного. У трех свиней ликвор был прозрачным и светло-желтого цвета, а у оставшихся пяти - розового цвета. Относительная плотность ликвора, концентрация белка и количество эритроцитов были ниже первоначального уровня, а количество лейкоцитов соответствовало физиологической норме.

Таким образом, клиническое, неврологическое, рентгенологическое исследования и состав спинномозговой жидкости указывали на развитие у свиней, в результате экспериментальной травмы, типичной для ушиба спинного мозга неврологической дисфункции, характеризовавшейся гипорефлексией и нарушением циркуляции ликвора.

При проведении оперативного доступа к поврежденному при предыдущей операции участку спинного мозга, с целью нанесения суспензии мезенхимальных стволовых клеток заключенных в фибриновый гидрогель Тиссукол-Кит, спустя 6 недель были обнаружены значительные соединительно-тканые разращения в области отсутствующей дужки Th-11 и вентро-медиальных участков остистых и полустистых мышц спины. Нанесение гидрогеля производилось на область продольных насечек твердой мозговой оболочки в количестве 1мл и площадью не менее 2 см^2 . Через 3-4 минуты Тиссукол-Кит превращался в упругую массу, равномерно покрывающую произведенные насечки и предотвращая вытекание ликвора. Край длиннейших мышц спины, остистых и полустистых мышц, были сшиты прерывистыми

узловатыми швами, таким образом, чтобы полностью закрывать нанесенную аппликацию. В послеоперационном периоде ни у одного из животных признаков гнойного воспаления в области нанесения мезенхимальных стволовых клеток и Тиссукол-Кит выявлено не было.

У свиней опытных и контрольной групп спустя сутки после аппликации мезенхимальных стволовых клеток не отмечалось ухудшения неврологической симптоматики по сравнению с уровнем до оперативного вмешательства. Тем не менее, двигательная активность животных была несколько сниженной, что, вероятно, было сопряжено с болезненностью в области шва.

При тестировании пателлярного рефлекса у животных первой и второй группы через 7 дней отмечалось незначительное улучшение качества его проявления по сравнению с контрольной группой. Через 3 недели рефлекс активно проявлялся у животных всех трех групп.

Наилучшие результаты отмечались у животных, которым применялись мезенхимальные стволовые клетки адипогенного происхождения: коленный рефлекс у них был выражен практически в полном объеме. Подобная картина была отмечена и при оценке шагательного рефлекса.

Свиньи первой опытной группы к четырнадцатой неделе эксперимента могли самостоятельно, без дополнительной стимуляции, опираться на тазовые конечности, у них полностью восстановилась проприорецепция, проявляющаяся тем, что животные опирались на подошвенную часть копытца и мякиш. При подъеме конечности, свиньи опускали её в правильное положение. К этому же сроку в полном объеме восстановилась поверхностная болевая чувствительность в области поясницы, крупа и тазовых конечностей.

Результаты функционального тестирования по шкале PITBS на конечном этапе эксперимента показали наивысший балл, равный 10, у двух животных первой опытной группы. Неврологическая дисфункция у них полностью отсутствовала. У третьей свиньи сохранялась незначительная дискоординация при движении тазовых конечностей.

У животных второй опытной группы экстрацептивная болевая чувствительность полностью восстановилась через 2 недели, а мышечное чувство на тазовых конечностях лишь спустя 6 недель после нанесения клеток. Через 8

недель свиньи самостоятельно принять стоячее положение не могли, однако, при дополнительной поддержке под живот, животные были в состоянии самостоятельно стоять на тазовых конечностях.

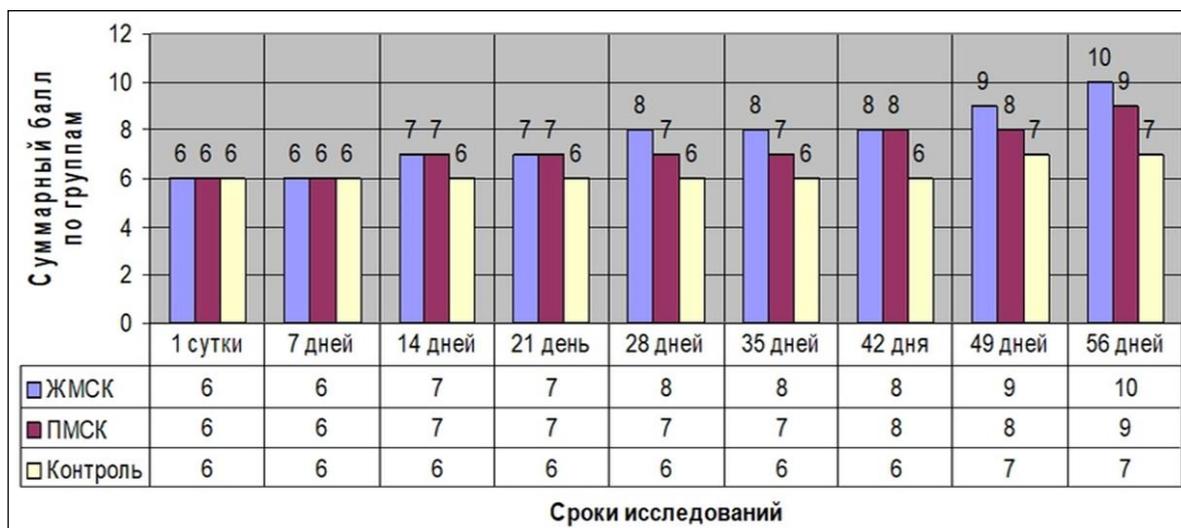


Рисунок 2. Результаты функционального тестирования неврологического статуса свиней по шкале PTBS после аппликации МСК в зону поврежденного сегмента спинного мозга.

При функциональной оценке неврологического статуса по шкале PTBS все животные второй опытной группы набрали по 9 баллов (Рисунок 2).

У свиней контрольной группы поверхностная болевая чувствительность кожи задней части тела появилась лишь через 7 недель после аппликации в зону повреждения спинного мозга гидрогеля Тиссукол-Кит, но к концу эксперимента восстановления проприорецепции и способности опираться на тазовые конечности не было. По шкале PTBS животные контрольной группы к концу эксперимента набрали 7 баллов.

Необходимо отметить, что улучшение неврологической симптоматики отмечалось у животных опытных групп уже через 14 дней после

внесения МСК, в то время как у контрольной группы положительная динамика была отмечена на более позднем сроке.

На рентгенограммах свиней всех трех групп выполненных через 10 и 30 дней после внесения в зону повреждения МСК и гидрогеля при контрастировании ликворного пространства обнаруживалось равномерное распределение Омнипак-300 в краниальном и каудальном направлении, в том числе и выше места контузии, при этом рентгеноконтрастное вещество не выходило за пределы спинномозгового канала.

На рентгенограммах полученных через месяц вышеуказанных изменений обнаружено не было (Рисунок 3).

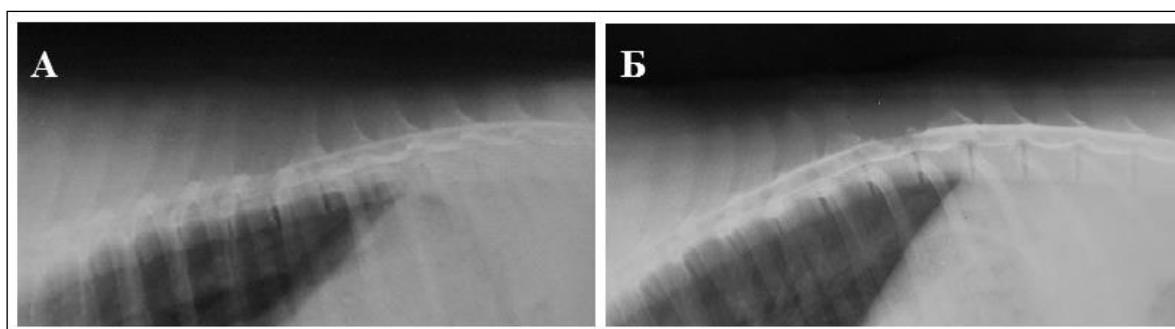


Рисунок 3. Рентгенограммы грудно-поясничного отдела позвоночника свиньи группы №1 после аппликации МСК: А) через 10 дн.; Б) через 30 дн.

Спинномозговая жидкость, полученная при люмбальной пункции через 24 часа после повторного оперативного вмешательства у свиней всех трех групп была прозрачная, однако у 6 из 9 животных содержала примесь крови, поэтому была

розоватого цвета. При пункции она вытекала из канюли иглы свободно, по каплям, поэтому сложностей при получении не было. Через 10 и 30 дней после аппликации мезенхимальных стволовых клеток и Тиссукол-Кит ликвор был

прозрачный, светло-желтого цвета и не имел примеси крови, свободно вытекал из канюли иглы сразу после прокола паутинной оболочки спинного мозга.

Относительная плотность и концентрация белка в ликворе, спустя сутки, у всех свиней соответствовали нормативным значениям, а количество лейкоцитов и эритроцитов было повышенным.

Через 10 дней после внесения в зону поврежденного сегмента спинного мозга МСК из жировой ткани или пульпы зуба у животных первой и второй групп содержание белка в спинномозговой жидкости увеличилось в 1,6 раза, при этом возрос и удельный вес. Цитологический состав был представлен умеренным количеством эритроцитов и лейкоцитов.

Таблица 1

Изменения состава ликвора у свиней после аппликации мезенхимальных стволовых клеток в зону поврежденного сегмента спинного мозга

Показатели	Сроки исследований после аппликации МСК								
	1-я группа			2-я группа			Контрольная группа		
	24 часа	10 дней	30 дней	24 часа	10 дней	30 дней	24 часа	10 дней	30 дней
Относительная плотность	1,0062 ±0,002	1,0082 ±0,001	1,0054 ±0,001	1,008 ±0,0021	1,0097 ±0,001	1,0064 ±0,001	1,0078 ±0,002	1,0066 ±0,001	1,0067 ±0,001
Концентрация белка, г/л	0,26 ±0,07	0,42 ±0,12	0,15 ±0,08	0,28 ±0,08	0,33 ±0,10	0,16 ±0,04	0,26 ±0,03	0,2 ±0,02	0,2 ±0,06
Количество эритроцитов в 1 мкл	156 ±24	21 ±5	10 ±2	189 ±29	28 ±11	6 ±2	149 ±36	22 ±4	8 ±2
Количество лейкоцитов в 1 мкл	18±8	4±2	2±0	22±5	3±0	3±0	21±5	4±0	4±1

Через месяц у свиней первой и второй опытных групп концентрация белка в ликворе снизилась, а клеточный состав соответствовал референсным значениям. У контрольной группы животных подобных изменений в составе спинномозговой жидкости не наблюдалось. Концентрация белка оставалась на уровне референсных значений на протяжении месяца после повторного оперативного вмешательства (Таблица 1).

Основываясь на полученных в результате исследований данных, можно сделать заключение, что аутогенные мезенхимальные стволовые клетки, как адипогенного происхождения, так и из пульпы зуба, при внесении их в область поврежденного сегмента спинного мозга, спустя 6 недель после контузионной травмы, стимулируют регенерацию нервной ткани у свиней, что обуславливает клиническое улучшение/полное устранение неврологической дисфункции, не вызывая воспаления в мозговых оболочках.

Литература:

1. Федеральный закон от 14.05.1993 N 4979-1 (ред. от 13.07.2015) «О ветеринарии». [Электронный источник] - URL: <https://ipvetst.ru/normativnye-dokumenty/federalnoe-zakonodatelstvo-4979-1.pdf> / (дата обращения 10.12.2020).
2. Применение аллогенного остеопластического материала «Лиопласт» и аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в ветеринарной травматологии / Е.Ю. Закирова, [и др.] // Актуальные вопросы ветеринарной биологии.- СПб.: «Институт ветеринарной биологии», 2017. - Т.33(1). - С.46-52.
3. Лисяный, Н.И. Мезенхимальные стволовые клетки и канцерогенез / Н.И. Лисяный // Онкология. - 2013. - Т. 15(1). - С. 4-8.
4. A novel porcine model of traumatic thoracic spinal cord injury / Lee, J. H. T. [et al] // Neurotrauma. - 2013. - V. 30(3). - P.142-159.
5. Genetic modification of mesenchymal stem cells in spinalcord injury repair strategies / Cui, X. [et al] // Bioscience Trends. - 2013. - V. 7(5). - P.202-208.