

Динамика изменений уровня дофамина в головном мозге и крови крыс с моделью паркинсонизма после трансплантации клеток стромы костного мозга, индуцированных в нейробласты

В.А. Пятикоп¹, Е.А. ШЕГЕЛЬСКАЯ², Т.В. ГОРБАЧ¹, Ю.Е. МИКУЛИНСКИЙ², В.В. КИРОШКА³

¹Харьковский государственный медицинский университет

²Лаборатория молекулярной диагностики и клеточных биотехнологий "Вирола", г. Харьков

³Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В настоящее время можно считать установленным, что основной причиной возникновения болезни Паркинсона (БП) является дегенерация дофаминэргических клеток черной субстанции (SN). Одним из высокоэффективных подходов в лечении больных БП является дофаминзаместительная терапия в виде дофаминсодержащих препаратов (наком, синемет, мадопар и др.). Кроме того, источником дофамина могут быть пересаженные дофаминпродуцирующие нервные клетки фетального происхождения [3, 4]. При этом, для эффективного лечения одного пациента, получают смесь фетальных нервных клеток от 4-6 плодов [1], причем 90-95% трансплантированных клеток обычно погибает в первые дни после операции [2]. Морально-этические запреты, гетерогенность популяции трансплантируемых клеток, опасность инфицирования и иммунологические проблемы, связанные с нейротрансплантацией фетальных тканей, делают актуальным поиск другого источника дофаминпродуцирующих клеток. Таким источником могут стать эмбриональные стволовые клетки, дифференцированные в нервные [7] или аутологичные нервные клетки, полученные из стволовых клеток взрослого организма, в частности, из клеток стромы костного мозга (КСКМ) [5, 6]

Цель работы – изучение процесса восстановления двигательных нарушений и изменения уровня дофамина в головном мозге и крови крыс с экспериментальной моделью паркинсонизма после трансплантации клеток стромы костного мозга крыс, индуцированных в нейробласты.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 54 половозрелых крысах-самцах линии Vistar массой 250-300г; 6 животных были интактными (1 группа); 24 составили контрольную группу с двусторонней деструкцией SN (модель паркинсонизма, 2 группа) и 24 – с двусторонней деструкцией SN и последующей НТ КСКМ, индуцированных в нейробласты (3 группа).

Адрес для корреспонденции: В.А. Пятикоп, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 705-67-48, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Моделирование паркинсонизма (МП). МП проводили с помощью стереотаксического аппарата с использованием атласа стереотаксических координат мозга крысы Е. Фифкова и Дж. Маршалла. Координаты SN соответствовали точке, находящейся на линии AP+ 4 мм, латерально – 2 мм, вглубь – 8,1 мм. Для наркоза использовали внутривенное введение тиопентала натрия в дозе 12 мг на 100 г массы тела. Деструкцию в области SN с двух сторон производили методом анодного электролиза. Анод изготавливали из стальной проволоки диаметром 0,3 мм, изолированной по всей длине бакелитовым лаком за исключением кончика длиной до 1 мм. Катод помещали в рот животного. Электролиз производили током с напряжением 12 В с силой тока 0,3 А экспозицией 6-8 сек.

Культивирование и индукция КСКМ в нейробласты. Клетки стромы костного мозга выделяли из костного мозга, который получали из бедренных костей крыс и рассеивали в культуральные флаконы площадью 80 см² в среде DMEM/F12 с 20% фетальной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина. Через 24 часа культивирования среду сливали и тщательно промывали клетки раствором Хэнкса. Добавляли свежую среду и культивировали стромальные клетки при 37°C и 5% CO₂ в течение 14 суток до образования клеточного монослоя, меняя среду каждые 3 суток.

Для индукции дифференцировки в нейробласты КСКМ инкубировали в растворе ретиноевой кислоты (10⁻⁶М) в течение 2 часов при 37°C. Животным опытной группы вводили по 30-50 тыс. клеток в зону деструкции через микрокапилляр.

Уровень дофамина (ДА) во фронтальной коре, хвостатом ядре и крови крыс определяли через 5, 15 и 30 суток после МП методом колоночной хроматографии с последующим флуориметрическим анализом и выражали в нмоль/литр [8].

Результаты и обсуждение

Билатеральная деструкция SN вызывала у крыс грубые двигательные нарушения в виде насильственных монотонных движений головой, "горбоподобного" изгиба туловища, причем у некоторых

животных были неестественно вытянуты конечности и вертикально поднят хвост. Описанные двигательные расстройства возникали у всех животных на 1-2 сутки после деструкции. Одним из характерных проявлений МП у животных были двигательные акты в виде манежного бега. Регресс двигательных нарушений был выражен в обеих группах опытных животных.

В контрольной группе (2) восстановление двигательных функций наступало спонтанно на 45-50 сутки после деструкции SN. В группе животных (3) после деструкции SN и одновременной НТ нормализация движений наступала на 12-14 сутки после НТ.

Результаты исследования уровня ДА в разные сроки после операции представлены в таблицах 1-4. Нормальные показатели уровня ДА по данным для 6 интактных животных являются общими для всех таблиц.

Из данных таблицы 1 видно, что на 5 сутки в результате МП происходит резкое снижение уровня ДА в хвостатом ядре и фронтальной коре, менее выраженная реакция наблюдается в крови. Однако уже в эти сроки происходит определенная компенсация дефицита ДА в группе животных с одновременной деструкцией и НТ.

Через 15 суток после операции описанные нарушения двигательных функций постепенно регрессируют, особенно заметно это происходит у животных с НТ, причем регресс двигательных нарушений у этой группы животных несколько опережает нормализацию показателей уровня ДА в структурах мозга. По-видимому, в процессе восстановления двигательных функций важную роль играют не только нормализации уровня ДА, но и другие репаративные и компенсаторные механизмы головного мозга (табл. 2).

Полное восстановление уровня ДА в структурах мозга наступает через 30 суток, когда у животных 3 группы практически отсутствуют какие-либо двигательные нарушения (табл. 3).

При дальнейшем наблюдении за животными мы отмечали практически полный регресс симптоматики МП в обеих экспериментальных группах. Через 50 дней после операции наблюдается нормализация уровня ДА в хвостатом ядре у животных 2 и 3 групп и незначительное его снижение во фронтальной коре (табл.4).

Оценка динамики концентраций ДА в крови показывает, что в обеих экспериментальных группах наблюдается досто-

Таблица 1. Уровень дофамина (нмоль/литр) в структурах головного мозга и в крови крыс через 5 суток после деструкции и деструкции с НТ нейробластов, индуцированных из КСКМ

Ткань или структура	Группы животных		
	Интактные, N=6	Деструкция SN, N=6	Деструкция SN + трансплантация N=6
Фронтальная кора	0,75±0,12	0,18±0,03*	0,69±0,01*
Хвостатое ядро	3,11±0,73	1,1±0,15*	2,81±0,53*
Кровь	9,56± 0,63	6,9±1,3*	8,01±0,57

Примечание: * – отличия достоверны относительно интактных крыс (P< 0,05)

Таблица 2. Уровень дофамина (нмоль/литр) в структурах головного мозга и в крови крыс через 15 суток после деструкции и деструкции с НТ нейробластов, индуцированных из КСКМ

Ткань или структура	Группы животных		
	Интактные, N=6	Деструкция SN, N=6	Деструкция SN + трансплантация N=6
Фронтальная кора	0,75±0,12	0,18±0,08*	0,73±0,04*
Хвостатое ядро	3,11±0,73	1,75±0,43*	2,74±0,12*
Кровь	9,56± 0,63	6,8±1,1*	7,76±0,73*

Примечание: * – отличия достоверны относительно интактных крыс (P< 0,05)

Таблица 3. Уровень дофамина (нмоль/литр) в структурах головного мозга и в крови крыс через 30 суток после деструкции и деструкции с НТ нейробластов, индуцированных из КСКМ

Ткань или структура	Группы животных		
	Интактные, N=6	Деструкция SN, N=6	Деструкция SN + трансплантация N=6
Фронтальная кора	0,75±0,12	0,12±0,03*	0,75±0,04*
Хвостатое ядро	3,11±0,73	2,8±0,06*	4,11±0,41*
Кровь	9,56± 0,63	5,8±0,12*	8,56±0,73

Примечание: * – отличия достоверны относительно интактных крыс (P< 0,05)

верное снижение уровня ДА в крови и последующая тенденция к его нормализации.

Выводы

1. Билатеральная деструкция SN с помощью анодного электролиза вызывает у животных развитие МП с характерными двигательными проявлениями и снижением уровня дофамина в структурах мозга и крови крыс.

2. Трансплантация КСКМ крыс, индуцированных в нейробласты, крысам с МП приводит к ускорению нормализации движений и достоверному увеличению уровня дофамина в структурах головного мозга.

3. Показано, что нормализация уровня ДА наступает позже полного регресса двигательных нарушений.

Таблица 4. Уровень дофамина (нмоль/литр) в структурах головного мозга и в крови крыс через 50 суток после деструкции и деструкции с НТ нейробластов, индуцированных из КСКМ

Ткань или структура	Группы животных		
	Интактные, N=6	Деструкция SN, N=6	Деструкция SN + трансплантация N=6
Фронтальная кора	0,75±0,12	0,21±0,14*	0,68±0,14
Хвостатое ядро	3,11±0,73	2,9±0,12*	2,71±0,37*
Кровь	9,56± 0,63	5,94±0,03*	8,33±0,57*

Примечание: * – отличия достоверны относительно интактных крыс (P< 0,05)

Литература

1. Угрюмов М.В., Шабалов В.А., Федорова Н.В. и др. Использование нейротрансплантации в лечении болезни Паркинсона. // Вопросы нейрохирургии. – 1998. – Т. 20, №1.– С.40-51
2. Цымбалюк В.И., Медведев В.В. Нейрогенные стволовые клетки.– Киев, 2005.– 596 с.
3. Цымбалюк В.И., Васильева И.Г., Чопик Н.Г. и др. Влияние экстракта из эмбриональной нервной ткани на содержание дофамина и норадреналина в эксплантах среднего и продолговатого мозга новорожденных крыс // Нейрофизиология.– 1998.– №2.– С. 98-103.
4. Чехонин В.П., Лебедев С.В., Дмитриева Т.Б. и др. Критерии эффективности трансплантации препаратов эмбриональной нервной ткани у крыс с повреждением дофаминэргической nigrostriарной системы 6-гидрооксидофамином (6-OHDA) // Патол. физиол. и эксперим. терапия.– 2002.– №3.– С. 19-22.
5. Щегельская Е.А., Пятикоп В.А., Микулинский Ю.Е. Индукция стромальных клеток костного мозга в нейробласты и их использование в лечении пациентов с болезнью Паркинсона // Трансплантология.– 2004.– Т. 7, №4.– С. 381-384.
6. Ahn T.B., Kim J.M., Kwon K.M. et al. Survival and migration of transplanted neural stem cells-derived dopamine cells in brain of parkinsonian rat // Int. J. Neurosci.– 2004.– Vol. 114, N5.– P. 575-585.
7. Bjorklund L.M., Sanchez-Pernaute R., Chung S. et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model // PNAS USA.– 2002.– Vol. 99.– P. 2344-2349
8. Colin A., Tor M. A procedure for the isolation of noradrenalin (together with adrenalin), dopamine, 5-hydroxytryptamine and histamine from the same sample using a single column of strongly acid cation exchange resin // Acta Pharmacol. Toxicol.– 1978.– Vol. 42.– P. 35-57.