

УДК 613.644/.62:615.32

ВЛИЯНИЕ СКЕФФОЛДА С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВИБРАЦИОННО-ШУМОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ У КРЫС**Жукова О.Б., Зайцев К.В., Гостюхина А.А., Абдулкина Н.Г., Воробьев В.А.***ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства», Северск, e-mail: niikf@med.tomsk.ru*

Проведенное исследование было посвящено экспериментальному обоснованию возможности коррекции нарушений, вызванных длительным воздействием повышенных уровней общей вибрации и шума, с помощью имплантации нетканого биodeградируемого полилактидного скеффолда, несущего аутологичные мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из костного мозга. Процедуру вибрационно-шумового воздействия на крыс выполняли ежедневно в течение 1 часа на протяжении 30 суток с помощью виброплатформы, генерирующей общую вибрацию вертикальной направленности с частотой 35–40 Гц и шум в 94 дБ. Полученные результаты продемонстрировали нормализацию уровней кортикостерона и нейрон-специфической енолазы в сыворотке крови после введения мезенхимальных стволовых клеток на фоне длительного вибрационно-шумового воздействия у крыс. В структуре органов-мишеней (надпочечники, мозжечок, бедренная мышца) были зарегистрированы минимальные позитивные изменения.

Ключевые слова: производственная вибрация, производственный шум, мезенхимальные стволовые клетки, эксперимент, кортикостерон, нейронспецифическая енолаза, креатинин

INFLUENCE OF THE SCAFFOLD WITH MESENCHYMAL STEM CELLS ON RAT REPAIR AFTER PROLONGED EXPOSURE TO VIBRATION AND NOISE**Zhukova O.B., Zaytsev K.V., Gostyukhina A.A., Abdulkina N.G., Vorobev V.A.***Siberian Federal Science-Clinical Center of Federal medicobiological agency, Seversk, e-mail: niikf@med.tomsk.ru*

This study has been devoted to the experimental substantiation of possibility to correct violations caused by prolonged exposure to elevated levels of total vibration and noise with the help of implantation of nonwoven biodegradable polylactide scaffold carrying autologous mesenchymal stem cells of the bone marrow. The procedure of exposure of the rats to vibration and noise has been performed daily for 1 hour for 30 days with the help of the vibration platform generating total vibration of vertical direction with frequency of 35–40 Hz and noise of 94 dB. The received results have demonstrated normalization of the levels of corticosterone and neuron-specific enolase in serum after injection of mesenchymal stem cells in the rats on the background of exposure to prolonged vibration and noise. In the structure of the target organs (adrenal glands, cerebellum, femoral muscle) have been registered minimal positive changes.

Keywords: industrial vibration, industrial noise, mesenchymal stem cells, experiment, corticosterone, neuron-specific enolase, creatinine

Медико-социальное значение вибрационной болезни определяется относительно большим удельным весом в структуре потери трудоспособности вследствие профессиональных заболеваний, а также молодым возрастом лиц, утративших профессиональную трудоспособность [1]. Поскольку применяемая на данный момент терапия недостаточна для реабилитации пациентов с вибропатологией, то перспективным является поиск новых способов терапии нарушений, вызванных длительным воздействием стрессирующего производственного фактора. С позиции восстановления адаптационных систем организма применение клеточной терапии может рассматриваться как многообещающий метод коррекции негативных эффектов вибрационно-шумового воздействия [2].

Однако сложность применения биомедицинских клеточных продуктов в прак-

тической медицине обусловлена поиском способов их доставки в очаг повреждения. Именно длительность присутствия в организме стволовых клеток является важной для регенеративного эффекта секретлируемых ими ростовых, иммуномодулирующих, хемокиновых факторов. Для успешного функционирования трансплантированные клетки нуждаются в создании условий аналогичных их физиологическому состоянию, то есть необходимо наличие внеклеточного матрикса. При этом идеальной для организма считается возможность биodeградации искусственного материала по истечении времени после имплантации. Таким требованиям в настоящее время удовлетворяют трехмерные пористые или волокнистые матрицы (скеффолды), основная функция которых состоит в обеспечении механического каркаса для клеток.

В связи с вышеизложенным целью данного исследования явилась оценка изменений показателей сыворотки крови и гистологических параметров органов-мишеней у крыс с моделью длительного вибрационно-шумового воздействия после имплантации биодеградируемого полилактидного скеффолда, несущего аутологичные мезенхимальные стволовые клетки.

Материалы и методы исследования

В программу исследования было отобрано 30 половозрелых крыс-самцов линии Wistar массой 270–306 г, которые содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры с животными выполняли в соответствии с международными правилами и нормами (European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/EEC).

20 крыс по 1 ч в течение 30 дней с помощью виброплатформы Clear Fit CF-PLATE Compact подвергали воздействию общей вертикальной вибрации (частота 35–40 Гц) и шума (94 дБ), что превышало предельно допустимые величины на 40 % (СН 2.2.4/2.1.8.562-96). После формирования модели длительного вибрационно-шумового воздействия данные животные были случайным образом разделены на две группы. 10 животным первой опытной группы под наркозом подкожно в правую подмышечную область был имплантирован скеффолд с культивированными на нем аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками, выделенными из костного мозга. Группу сравнения составили 10 ложнооперированных крыс, которым выполняли разрез кожи, подкожно вводили пинцет, формировали боковой карман и зашивали рану без введения изделия. Контролем послужила группа из 10 крыс, находившихся на неработающей виброплатформе Clear Fit CF-PLATE Compact 101 в течение эквивалентного периода времени.

Процедура создания биоинженерной конструкции включала несколько этапов. Первоначально из костного мозга крыс была получена культура мезенхимальных стволовых клеток. Для этого мононуклеарную фракцию, выделенную при центрифугировании из взвеси клеток костного мозга, переносили в культуральные флаконы, приливая 5–7 мл полной среды, и культивировали в атмосфере 5 % углекислого газа в течение 7 суток при температуре 37 °C и 100 % влажности. Микроскопию проводили на микроскопе Optika XDS-2SFL (Италия) в режиме 20- и 40-кратного увеличения. В результате культивирования на дне флакона формировались колонии адгезированных мезенхимальных клеток. Смену среды проводили каждые 3-е суток для элиминации не прикрепившихся клеток. В результате на 6–7 сутки образовывалось примерно 60–70 % клеточного монослоя. На 12–14 сутки культивирования формировался 95–100 % монослой мезенхимальных стволовых клеток. После завершения культивирования монослой клеток снимали с адгезионной поверхности флаконов, инкубируя в течение 7–10 мин при 37 °C в присутствии 5–7 мл 0,25 % раствора трипсина с ЭДТА («ПанЭко», РФ). Полученную клеточную суспензию переносили в стерильные пробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 500 г. Затем оценивали жизнеспособ-

ность, используя метод окрашивания трипановым синим (ISO 10993-5).

Далее полученные мезенхимальные стволовые клетки в концентрации 4×10^4 жизнеспособных клеток культивировали со стерильным гибридным синтетическим биодеградируемым матриксом из полимолочной кислоты с линейными размерами 10×10 мм и толщиной не более 1 мм в полной культуральной среде при 37 °C и 5 % CO_2 в течение 120 ч. Образцы трехмерных нетканых полилактидных матриксов (скеффолды) были изготовлены на базе кафедры теоретической и экспериментальной физики Национального исследовательского Томского политехнического университета с помощью аэродинамического формирования в турбулентном газовом потоке [3]. В ходе выполнения предыдущих работ они были проверены на цитотоксичность, апиогенность и биологическую совместимость [4]. По истечении 5 суток культивирования происходило заселение мезенхимальных стволовых клеток на скеффолд.

Через 14 суток после введения скеффолда с мезенхимальными стволовыми клетками всех животных выводили из эксперимента путем одномоментной декапитации под CO_2 -наркозом. В сыворотке крови крыс определяли содержания креатинина стандартным биохимическим методом, уровни нейрон-специфической енолазы и кортикостерона с использованием твердофазного неконкурентного иммуноферментного анализа согласно инструкции, предлагаемой производителями тест-систем («Fujirebio Diagnostics AB», Швеция и «IBL», Германия соответственно). Приготовление гистологических препаратов надпочечников, мозжечка и бедренной мышцы осуществляли стандартным способом: фиксация материала в 10 % формалине, дегидратация в изопропиловом спирте, заливка в готовую среду Histomix® (Гистомикс), срезы были приготовлены с помощью санного микротомы MC-2. Полученные препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Иммерсионную микроскопию проводили на микроскопе Optika XDS-2SFL (Италия).

При обработке полученных данных были использованы методы статистического описания, включающие проверку на нормальность распределения исследуемого признака по критерию Шапиро – Вилка, расчет медианы (M), верхнего и нижнего квартилей (Q_1 ; Q_3), а также методы проверки статистических гипотез при межгрупповом сравнении показателей с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные ранее экспериментальные исследования параметров поведенческой активности животных в «открытом поле» показали, что вибрация с частотой 30–40 Гц и шум в 94 дБ совместно оказывают стрессиндуцирующее действие на крыс [5]. Этот факт подтверждает зарегистрированное почти двухкратное увеличение уровня гормона стресса кортикостерона у крыс, подвергавшихся в течение 30 дней воздействию повышенных уровней общей вибрации и шума (таблица).

Показатели сыворотки крови у крыс после имплантации биоинженерной конструкции на фоне моделирования вибрационно-шумового воздействия, Ме (Q_1 ; Q_3)

Исследуемые сывороточные показатели	Контрольная группа животных (n = 10)	Животные с моделью вибрационно-шумового воздействия		Р-уровень значимости межгрупповых различий
		Ложнооперированные крысы (n = 10)	Крысы, которым имплантировали скеффолд, несущий мезенхимальные стволовые клетки (n = 10)	
	1	2	3	
Содержание кортикостерона, нг/мл	69,25 (46,70; 95,50)	148,60 (126,30; 199,20)	64,95 (27,10; 108,65)	$p_{1-2} = 0,007$ $p_{1-3} = 0,859$ $p_{2-3} = 0,019$
Содержание нейрон-специфической енолазы, мкг/л	0,00 (0,00; 0,10)	0,10 (0,10; 0,20)	0,00 (0,00; 0,10)	$p_{1-2} = 0,036$ $p_{1-3} = 0,854$ $p_{2-3} = 0,014$
Содержание креатинина, мкмоль/л	107,70 (103,60; 109,50)	166,30 (163,60; 172,00)	188,30 (176,00; 196,30)	$p_{1-2} = 0,003$ $p_{1-3} = 0,001$ $p_{2-3} = 0,028$

В настоящей работе в качестве маркера повреждения клеточных мембран нейронов головного мозга, демиелинизации нервных окончаний была выбрана нейрон-специфическая енолаза [6]. По результатам иммуноферментного анализа было установлено повышение концентрации данного показателя в сыворотке крови у экспериментальных животных с моделью длительного вибрационно-шумового воздействия (таблица).

Полученные результаты применения биоинженерных конструкций при моделировании длительного вибрационно-шумового воздействия характеризовались статистически не различающимися уровнями кортикостерона и нейрон-специфической енолазы по сравнению с контрольной группой. Тогда как у ложнооперированных крыс эти показатели статистически значимо были выше (таблица).

Концентрация сывороточного креатинина у животных с биоинженерными конструкциями и у ложнооперированных была выше нормы, что подтверждает факт мембранопатологического эффекта вибрационно-шумового фактора на мышечную ткань [7]. Между группами также отмечались статистические различия: концентрации кортикостерона и нейронспецифической енолазы в группе ложнооперированных животных были выше, чем у крыс на фоне применения скеффолдов, несущих мезенхимальные стволовые клетки (таблица).

Для оценки роли мезенхимальных стволовых клеток в коррекции структурных изменений органов, наиболее чувствительных к негативному воздействию вибрационного

фактора, было выполнено микроскопическое исследование тканей надпочечников, мозжечка и бедренной мышцы у животных с моделью длительного вибрационно-шумового воздействия, которым была проведена имплантация мезенхимальных стволовых клеток, культивированных на полилактидном скеффолде. Проведенный морфологический анализ органов-мишеней у крыс после длительного вибрационно-шумового воздействия выявил структурные изменения, характерные для вибрационной патологии. В ткани надпочечников было зарегистрировано сглаживание границы между пучковой и сетчатой зонами, микроциркуляторные расстройства (участки от слабо-умеренного кровенаполнения и до очагов резко выраженного капиллярно-венозного полнокровия с эритростазами, а также эритростаз в расширенных синусах мозгового вещества). В молекулярном слое мозжечка был выявлен периваскулярный отек, а в зернистом слое и белом веществе – участки полнокровия и резко расширенных сосудов. Поперечно-полосатая мышечная ткань бедренной мышцы характеризовалась чередованиями интенсивно и бледно-окрашенных участков, что свидетельствует о нарушении тинктореальных свойств. Применение биоинженерного клеточного продукта для коррекции последствий длительного вибрационно-шумового воздействия продемонстрировало неоднозначные результаты. На фоне клеточной терапии в надпочечниках у крыс, подвергавшихся длительному действию повышенных уровней вибрации и шума, микроциркуляторные расстрой-

ства были минимизированы и оставались характерны только для пучковой и сетчатой зон. Морфологический анализ мозжечка у животных данной группы не выявил различий с ложнооперированными крысами. В бедренной мышце после длительного вибрационно-шумового воздействия и имплантации скеффолдов, несущих мезенхимальные стволовые клетки, были отмечены нарушения тинктореальных свойств при выраженной гиперплазии миосателлитов, составляющих камбиальный резерв поперечно-полосатой мышечной ткани.

Полученные результаты можно объяснить способностью мезенхимальных стволовых клеток увеличивать количество клеток олигодендроцитной линии в участке повреждения и запускать иммунный отклик в направлении более благоприятного баланса Т-хелперных лимфоцитов типа 1 и типа 2 за счет клеточной миграции в зону поражения, интеграции, нейтральной трансдифференцировки и стимуляции эндогенного нейро- и ангиогенеза вследствие экспрессии глиального нейротрофического фактора, фактора роста нервов, нейротрофического фактора мозга [8, 9]. Очевидно, это способствует коррекции нейрональных повреждений, вызванных длительным вибрационно-шумовым воздействием.

Таким образом, проведенные исследования доказали повреждающий эффект вибрационно-шумового фактора в условиях экспериментальной модели. При этом полученные результаты могут считаться положительной оценкой применения мезенхимальных стволовых клеток при вибрационной патологии в силу доказанной эффективности по ряду ключевых исследованных показателей. По результатам экспериментального применения полилактидного скеффолда, несущего аутологичные мезенхимальные стволовые клетки, на фоне длительного вибрационно-шумового воздействия у крыс были зарегистрированы минимальные позитивные изменения в структуре органов-мишеней. При этом определяющим моментом в восстановлении структурных изменений органов, на наш взгляд, являются сроки биодеградации скеффолда и сохранения регенераторного потенциала мезенхимальных стволовых клеток.

Выводы

1. Установлено, что использованная в эксперименте модель негативного влияния вибрационно-шумового производственного фактора была эффективна в оценке перспективности использования мезенхимальных стволовых клеток, в качестве одного из подходов в решении задач регенеративной медицины.

2. Проведенное исследование продемонстрировало положительную динамику изучаемых показателей сыворотки крови (уровни кортикостерона и нейрон-специфической енолазы) и тенденцию к восстановлению гистологической структуры органов-мишеней при введении мезенхимальных стволовых клеток на фоне длительного вибрационно-шумового воздействия.

Список литературы

1. Беско В.А. Организация медицинского обслуживания работников ЛПУ: производственный принцип // *Здравоохранение*. – 2012. – № 5. – С. 30–34.
2. Петренко А.Ю., Хунов Ю.А., Иванов Э.Н. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения. – Луганск: Пресс-экспресс, 2011. – 368 с.
3. Nonwoven Polylactide Scaffolds Obtained by Solution Blow Spinning and the In Vitro Degradation Dynamics / S. Tverdokhlebov et al. // *Advanced Materials Research*. – 2014. – Vol. 872. – P. 257–262.
4. Оценка цитотоксичности и апилогенности биодеградируемого полилактидного матрикса / К.В. Зайцев и др. // *Медицина и образование в Сибири: сетевое научное издание*. – 2016. – № 4. – Режим доступа: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=2059 (дата обращения 22.10.2017).
5. Ориентировочно-исследовательское поведение у крыс при вибрационно-шумовом воздействии / Н.Г. Абдулкина и др. // *Медицина и образование в Сибири: сетевое научное издание*. – 2015. – № 6. – Режим доступа: http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1939 (дата обращения 20.10.2017).
6. Иммуно-ферментный анализ нейроспецифической енолазы на основе моноклональных антител в оценке проницаемости гематоэнцефалитического барьера при нервно-психических заболеваниях / В.П. Чехонин и др. // *Российский психиатрический журнал*. – 2000. – № 4. – С. 15–19.
7. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course / M.J. Nicolaidis et al. // *Sports Medicine*. – 2008. – Vol. 38. – №7. – P. 579–606.
8. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis / L. Bai et al. // *Glia*. – 2009. – Vol. 57, № 11. – P. 1192–1203.
9. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models / L. Bai et al. // *Nature neuroscience*. – 2012. – Vol. 15, № 6. – P. 862–870.