

УДК 616.832-001.4.001.6:57:62:547.995.12

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ПОДЛОЖКИ
С НЕЙРОНАЛЬНЫМ МИКРООКРУЖЕНИЕМ
ДЛЯ БИОИНЖЕНЕРИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЕ У КРЫС.
ИММУНОГИСТОХИМИЯ СПИННОГО МОЗГА**

**Большаков И.Н., Еремеев А.В., Шеина Ю.И., Полстяной А.М., Медведева Н.Н.,
Жуков Е.Л., Каптук Г.И., Кривопапов В.А., Игнатов А.В., Карапетян А.М.**

*ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого», Красноярск, e-mail: bol.bol@mail.ru;*

Красноярский центр репродуктивной медицины, Красноярск;

Институт биофизики СО РАН, Академгородок, Красноярск;

Институт общей генетики им. Вавилова РАН, Москва

Приведены результаты гистологического и иммуногистохимического анализа образцов спинного мозга взрослых крыс с моделью частичного повреждения спинного мозга и прямой трансплантации коллаген-хитозановой подложки, содержащей предшественников нейрональных клеток мыши и нейрональное микроокружение. Установлено, что пересаженные предшественники нейрональных клеток в зоне повреждения спинного мозга жизнеспособны в течение 4 недель и составляют через 14 дней около 34 % клеточной массы. К концу 4 недели предшественники нейрональных клеток мигрировали к материнской нервной ткани, число клеток макроглии увеличилось. Присутствие в подложках полного комплекса факторов роста нервных клеток ускоряет процессы реконструкции зоны повреждения. Установлено формирование межсинаптических соединений на границе трансплантата при отсутствии выраженной воспалительной реакции.

Ключевые слова: полисахаридная подложка, нейрональное микроокружение, экспериментальная травма спинного мозга, биоинженерия, предшественники нейрональных клеток, иммуногистохимия

**THE USE OF POLYSSACHARIDE SCAFFOLD WITH NEURONAL
MICRO-ENVIRONMENT FOR CENTRAL NERVE SYSTEM
BIOENGINEERING BY EXPERIMENTAL SPINAL CORD INJURY IN RATS.
IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF SPINAL CORD**

**Bolshakov I.N., Ereemeev A.V., Sheina J.I., Polstjanoi A.M., Medvedeva N.N.,
Zhukov E.L., Kaptjuk G.I., Krivopalov B.A., Ignatov A.V., Karapetjan A.M.**

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenevsky,

Krasnoyarsk region, e-mail: bol.bol@mail.ru;

Centre of reproductive medicine, Krasnoyarsk;

Biophysics Institute of Siberian Division Russian Academy of Science, Krasnoyarsk;

N.I. Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Science, Moscow

The histologic and immunohistochemical assay results of the spinal cord samples of adult rats with partial damage model of a spinal cord and direct transplantation of collagen-chitosan scaffold containing progenitors of neuronal cells of the mouse and neuronal microenvironment are shown. It is established, that the replaced progenitors of neuronal cells in an area of spinal cord damage are viable within 4 weeks and make for 14 day about 34% of cellular weight. By the end of 4 weeks progenitors of neuronal cells migrated to a nervous tissue of the recipient, the number of macroglia cells has increased. The presence of a full complex of the nervous cells growth factors is accelerates processes in area damage reconstruction. Formation of synaptic communications between neuronal cells on the border of a transplant is confirmed at absence of the expressed inflammatory reaction.

Keywords: polyssacharide scaffold, neuronal microenvironment, experimental spinal cord injury, bioengineering, progenitors of neuronal cells, immunohistochemistry

Перспективным направлением в регенераторной клеточной терапии можно считать трансплантацию предшественников нейрональных клеток или нейрональных стволовых клеток (НСК), которые получают из нейроэпителлия эмбриона [7]. Направленное культивирование СК приводит к их нейрональной дифференцировке. Нейрональные стволовые клетки (НСК) наиболее часто используются в экспериментальной трансплантации для лечения повреждений СМ.

Пересадка региональных НСК в СМ крыс сопровождается выживанием и интеграцией с мозгом реципиента, а также дифференцировкой в нейроны и глию [3, 6]. Предшественники нейрональных клеток – идеальная мишень для окончательной дифференцировки и запуска аксонального роста. Достоверным контролем такой дифференцировки может служить формирование межсинаптических связей и наличие активных форм специализированных

глутаматергических, серотонинергических, норадреналергических, глицинергических, холинергических, ГАМК–ергических нейротрансмиттеров [5, 8, 9].

Цель исследования – проведение гистологического и иммуногистохимического анализа восстановления структур спинного мозга половозрелых крыс в модели частичного его повреждения и трансплантации коллаген-хитозановой матрицы, содержащей предшественников нейрональных клеток и нейрональное микроокружение.

Материалы и методы исследования

Гистологический и иммуногистохимический анализ срезов спинного мозга при прямой имплантации клеточных нейрональных матриц в дислокацию спинальной травмы. Препараты спинного мозга получали путем тщательного и осторожного выделения ткани из позвоночного канала через 1–4 недели после операции. Спинной мозг помещали на 24 часа в 10%-й раствор фосфат-забуференного формалина. Далее осуществляли классическую гистологическую проводку ткани на оборудовании фирмы Leica (Германия), часть гистологических срезов окрашивали гематоксилин-эозином с целью обзорного анализа ткани в месте дислокации имплантата и в его непосредственном окружении. При обзорной микроскопии гистологических срезов (продольных, косых, поперечных) оценивалась степень глиальной реакции в зоне травмы, окружающей ткани, состояние нейронов серого вещества спинного мозга. Оценивалось состояние белого и серого вещества спинного мозга в 5 полях зрения каждого среза. Подсчитывалось количество клеток макроглии (астроциты, олигодендроциты), микроглии (макрофаги) и количество клеток нейронального ряда [1]. Часть гистологических срезов подвергали иммуногистохимической обработке на предмет выявления состояния имплантированной клеточной массы (поиск трансплантированных клеток, экспрессирующих зеленый флюоресцентный белок GFP) на флюоресцентном микроскопе «Olympus BX-51» с применением программных продуктов «Applied Spectral Imaging» (USA).

Иммуноцитохимия. Детекция экспрессии маркеров (оценка способности дифференцироваться у трансплантированных клеток). Часть препаратов спинного мозга ресуспендировали и использовали для выделения клеточной массы. Клетки отмывали от фиксатора и к суспензии клеток добавляли 0,1% раствор Тритона X100 для пермобилизации мембран. Затем отмывали от Тритона 0,1%-м раствором Твина 20 с последующей инкубацией в этом же растворе с добавлением 2% нормальной сыворотки козы при комнатной температуре (для блокирования неспецифического связывания антител). Далее повторно отмывали последовательно растворами PBS и Твина 20, после чего добавляли первичные антитела к нейрофиламенту мыши (Abcam, USA) в разведении 1:100, смесь инкубировали 1 ч, затем снова отмывали, после чего добавляли раствор вторичных антител кролика с красной флюоресцентной меткой. Не связавшиеся молекулы метки отмывали трижды PBS и оценивали флюоресценцию на проточном цитометре Guava EasyCyte Mini (USA). Детекция по двум спектрам – зеленый (оценка наличия клеток с GFP), красный – наличие экспрес-

сии нейрофиламента. Часть выделенной клеточной массы спинного мозга подвергали формальдегидной фиксации с последующей иммуноцитохимией клеток с помощью антител (все от Abcam, USA) против GFAP – глиального фибриллярного кислого белка (маркер астроцитов), нейрофиламента, олигодендроцитов и енолазы нейронов, против мышечных белков для исключения появления перекрестного сигнала. Выявление маркеров осуществляли методом согласно инструкции производителя антител. Ядра клеток окрашивали DAPI (0,1 мкг/мл) в течение 10 мин. Для получения изображений и анализа использовали флюоресцентный микроскоп «Olympus BX-51» и программные продукты «Applied Spectral Imaging» (USA). Для анализа каждого маркера выделяли 6 зон для проведения анализа и фотодокументации. Микроскопирование проводили по каждой зоне в 30 полях зрения. Параллельно проводили поиск на этих же препаратах GFP-меченных клеток. Таким образом, производили трехцветный флюоресцентный анализ – детекция зеленого свечения – GFP, красного свечения – маркера и синего свечения – ядер клеток. Наличие прижившихся после трансплантации клеток оценивали с помощью проточной флюориметрии в препаратах на 3 и 4 неделях после имплантации. Образцы спинного мозга диспергировали в 0,5%-м растворе коллагеназы на PBS в течение 15–30 минут при 37°C, фильтровали через нейлоновый фильтр, далее фиксировали 1%-м раствором формалина на PBS и после отмывки окрашивали DAPI, производили оценку количества клеток, несущих синюю и зеленую (GFP) метку (*).

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты детекции флюоресценции в образцах спинного мозга методом проточной цитометрии в сроки 1–2 недели. Анализ цитометрии показал, что прямая трансплантация предшественников нейрональных клеток, полученных путем культивирования и создания нейронального микроокружения, сохраняет предшественников нейронов жизнеспособными, которые пролиферируют в течение двух недель. Относительное количество клеток, экспрессирующих фактор GFP, не изменяется на протяжении двух недель и составляет около 34% (рис. 1).

В имплантированной матрице с эмбриональными стволовыми клетками мыши (ЭСКм) с увеличением длительности срока имплантации отмечалось более выраженное рассасывание ее волокон. К 28 суткам большая часть стволовых клеток мигрировала на периферию матрицы, ближе к нервной ткани. Анализ препаратов показывает, что клетки в матрицах не только выживают, а, заполняя всю ее структуру, мигрируют по направлению к нервной ткани (рис. 2).

Более того, уменьшение количества волокон биополимера свидетельствует о высокой метаболической активности клеток в зоне репарации. Вокруг зоны травмы в обоих случаях (при наличии и отсутствии

ЭСКм в матрице) выявлено большое количество макрофагов, цитоплазма которых заполнена фагоцитированным детритом

(рис. 3). Количество клеток микроглии увеличивалось на 7–14-е сутки, на 21–28-е сутки – их количество уменьшалось.

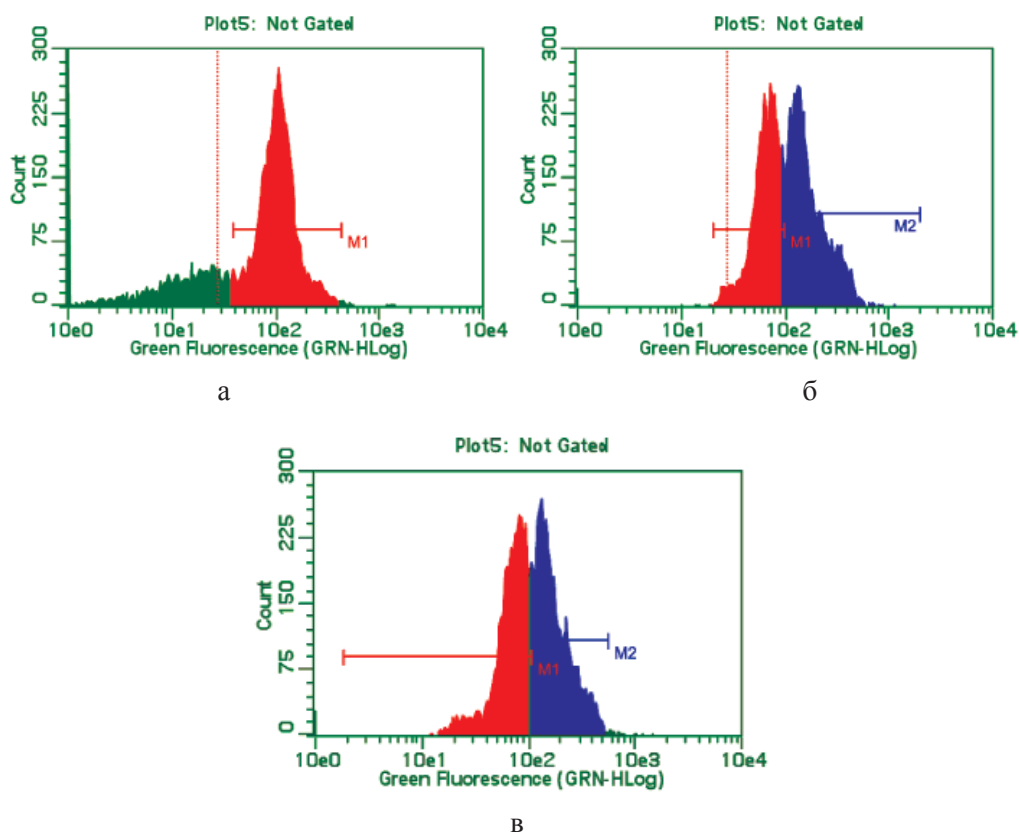


Рис. 1. Проточная цитофлуориметрия диспергатов спинного мозга. Детекция зеленой флуоресценции (в красно-зеленой области):

а – контроль (без клеток); б – 3-я неделя с клетками; в – 4-я неделя с клетками; б, в – наличие второго пика флуоресценции независимо от типа матриц

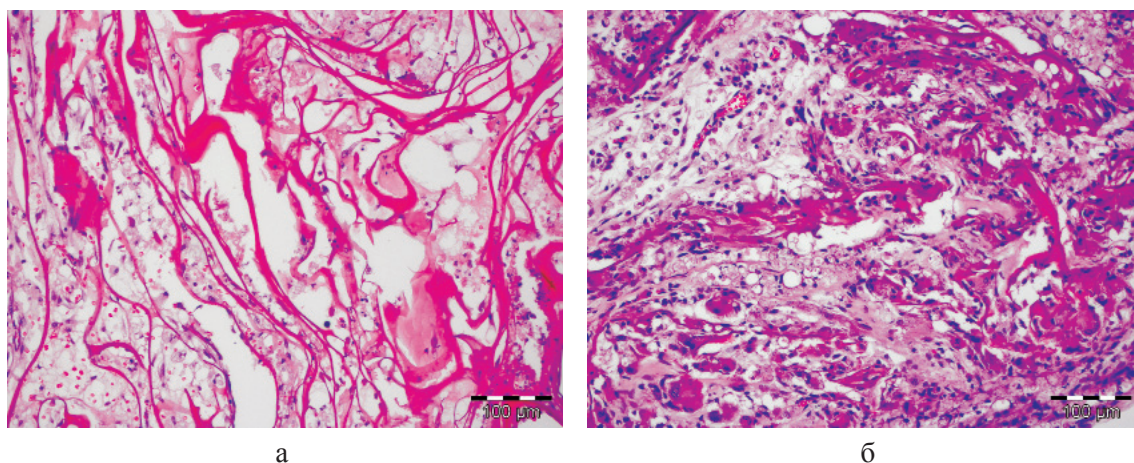


Рис. 2. Имплантированная матрица в зону спинальной травмы (14-е сутки): а – отсутствие ЭСК; б – наличие ЭСК

При имплантации матрицы с ЭСКм отмечалось увеличение всех клеток макроглии (астроциты, олигодендроциты). При

использовании матрицы без ЭСКм наблюдалось увеличение клеток олигодендроглии и уменьшение клеток астроцитарной глии.

Количество нейронов в сером веществе спинного мозга при имплантации матрицы с ЭСКм сохранялось примерно на одном уровне, с небольшим пиком на 2–3 неделях. Кроме того, на 28-е сутки вокруг зоны имплантации матрицы с ЭСКм отмечено появление большого количества клеток-предшественников нейрональной популяции (рис. 4). При отсутствии в матрице ЭСКм

количество нейронов с течением времени уменьшалось. Таким образом, результаты исследований показали признаки возможного полноценного восстановления структуры поврежденного спинного мозга. Трансплантация клеток на матрице приводит к более полноценному и быстрому восстановлению гистологической целостности ткани после повреждения.

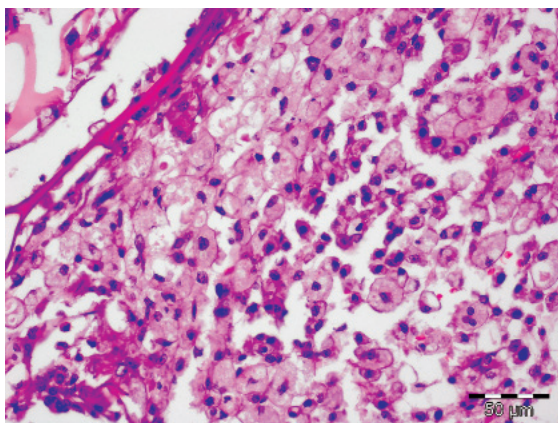


Рис. 3. Выраженная макрофагальная реакция в зоне спинальной травмы на 7-е сутки после имплантации матрицы

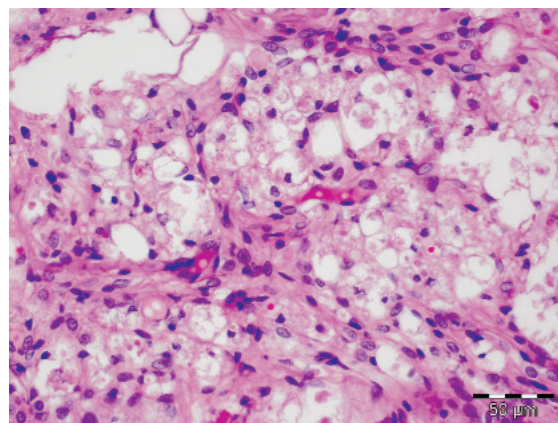


Рис. 4. Малодифференцированные нейрональные клетки-предшественники в зоне имплантации матрицы на 28-е сутки

Иммуногистохимический анализ срезов спинного мозга. При иммуногистохимическом анализе фиксированных ЭСКм препаратов спинного мозга клетки предварительно обрабатывали антителами против нейрофиламента, с последующим мечением вторичными антителами и детекцией флюоресценции. Результаты анализа гистопрепаратов показали, что добавление в матрицу имплантата предшественников нейрональных клеток ведет к приживлению и миграции их в раневой зоне с последующей дифференцировкой в нейрональном направлении в независимости от состава матриц в течение 1–4 недель. Вероятно, ключевое влияние играет не только трехмерная структура носителя, но и цитокиновое окружение клеток в ране. У животных как в ранние сроки, так и в поздний период наблюдалось наличие трансплантированных клеток, дифференцирующихся в тканеспецифические типы. При дифференцировке клеток по нейрональному направлению в продольном срезе спинного мозга имеется наличие нейрофиламента в клеточных тяжах, енолазы, образование синапсов и GFP к глияльному белку (рис. 5). При выполнении анализа наличия енолазы в препаратах спинного мозга после обработки клеток антителами против енолазы и последующего мечения вторичными антителами с детекцией флюоресценции обнаруживается специфический белок нейрона. При обра-

ботке антителами против глияльного кислого белка последний также обнаруживается в клеточной массе трансплантированных клеток.

При использовании в препаратах спинного мозга ЭСКм, обработанных антителами против олигодендроцитов, с последующим мечением вторичными антителами и детекцией флюоресценции последние обнаруживаются в зоне прямой трансплантации.

Анализ морфологии спинного мозга крыс указывает, что технология имплантации матриц в спинной мозг и их состав обеспечивают стабильность губчатой конструкции в течение 4-х недель, жизнеспособность пересаженных предшественников нейрональных и олигодендритных клеток, отсутствие выраженной воспалительной реакции в месте имплантации, формирование межсинаптических соединений при межклеточном контакте. Такая картина подтверждает субстратную реконструкцию спинного мозга в месте разрыва в виде вновь образованной нервной ткани [2, 4].

Исследование диспергатов спинного мозга показало, что в образцах присутствуют GFP-меченные клетки. Результаты иммуногистохимического анализа показывают стабильную экспрессию GFP на третьей и четвертой неделе после трансплантации в зону повреждения спинного мозга, что подтверждает способность трансплантированных клеток к хоумингу в зоне повреждения.

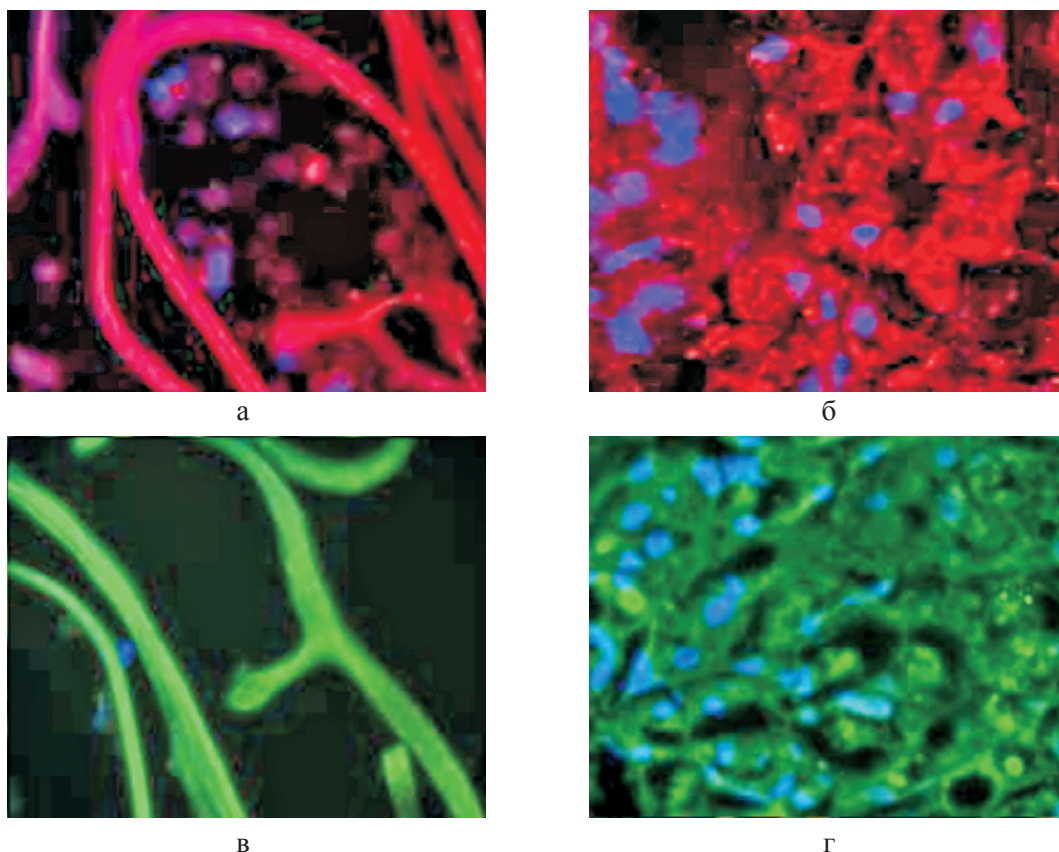


Рис. 5. Дифференцировка клеток по нейрональному направлению в продольном срезе спинного мозга: а – экспрессия нейрофиламента, 2 недели, опыт; б – экспрессия енолазы, 2 недели, опыт; в – наличие синапсов на аксональных окончаниях пересаженных клеток, экспрессия GFP, опыт; г – наличие GFP к глиальному белку, опыт

Далее были проанализированы образцы гистологических препаратов на наличие маркеров нейрональной дифференцировки и восстановление нормальных синаптических межклеточных связей. Результаты флуоресцентной микроскопии показывают, что трансплантированные клетки экспрессируют маркеры олигодендроцитов и нейрофиламента, образуя межсинаптические связи. На препаратах с трансплантированными клетками встречаются меченные против нейрофиламента клетки, что указывает на дифференцировку в данном направлении перенесенных ЭСКм.

Исследование маркеров на олигодендроциты показало, что клетки формируют характерные морфологические структуры. Наличие зеленого свечения подтверждает, что трансплантированные клетки функционируют и дифференцируются в олигодендроциты. Пересаженная клеточная трехмерная конструкция способна создавать условия для дифференцировки трансплантированных на матрице ЭСКм в нейрональном и глиальном направлениях.

Заключение

Таким образом, результаты, полученные в ходе выполнения исследований, позволяют полагать, что коллаген-хитозановая матрица, содержащая в своем составе факторы нейрогенной дифференцировки и предшественники нейрональных клеток, пригодна для имплантации с целью восстановления функций поврежденного спинного мозга без риска образования тератом при условии культивирования клеточной массы ЭСКм в условиях искусственно созданного трехмерного окружения. Полученные результаты соответствуют мировому уровню и расширяют знания о механизмах дифференцировки ЭСК в культуре.

Исследования выполнены при поддержке гранта ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» МЗ СР РФ (2009), грантов государственного фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (проект №6746р/9167 от 10.04.2009 г. и проект № 8775 р/13993 от 11.01.2011 г.).

Список литературы

1. Семченко В.В., Барашков С.А., Артемьев В.Н. Гистологическая техника. – Омск, 2003. – 152 с.
2. Сафонова Г.Д. Влияние условий ограничения подвижности позвоночника на динамику деструктивного процесса в краниальной части поврежденного участка и смежном сегменте спинного мозга // Неврологический вестник. – 2008. – Т.XL. Вып. 3. – С. 25–28.
3. Цымбалюк В.И., Медведев В.В. Нейрогенные стволовые клетки. – Киев, 2005. – 596 с.
4. Ярыгин В.Н., Банин В.В., Ярыгин К.Н. Регенерация спинного мозга крыс после торакальной сегментэктомии: восстановление анатомической целостности спинного мозга // Морфология. – 2005. – №2. – С. 39–43.
5. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons // Cell. – Vol. 110. – P. 385–397.
6. Intraspinal delivery of neurotrophin-3 using neural stem cells genetically modified by recombinant retrovirus // Exp. Neurol. – 1999. – Vol. 158. – P. 9–26.
7. Mendez I., Sadi D., Hong M. Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral

dopaminergic transplants // J. Neurosci. – 1996. – Vol. 16. – P. 7216–7227.

8. Onifer S.M., Cannon A.B., Whittemore S.R. Altered differentiation of CNS neural progenitor cells after transplantation into the injured adult rat spinal cord // Cell Transplant. – 1997. – Vol. 6. – P. 327–338.

9. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord // Nat. Med. – 1999. – Vol. 5. – P. 1410–1412.

Рецензенты:

Манчук В.Т., д.м.н., профессор, директор НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск;

Савченко А.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск.

Работа поступила в редакцию 17.10.2011.