

УДК 547.995.12:612.014:616-089.843

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ПОДЛОЖКИ ПРИ ЧАСТИЧНОМ СПИНАЛЬНОМ РАЗРЫВЕ У КРЫС

Большаков И.Н., Кривопалов В.А., Каптюк Г.И., Карапетян А.М., Игнатов А.В.

ГОУ ВПО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздравоохранения России, Красноярск, e-mail: bol.bol@mail.ru

Приведены результаты прямой трансплантации коллаген-хитозановой матрицы в спинной мозг взрослых крыс после частичного его пересечения. Матрицы содержат в своем составе гликозаминогликаны, факторы роста, кондиционированную питательную среду от нейрональных клеток мыши, а также предшественников нейрональных клеток, экспрессирующих специфические маркеры нейрональной природы. Результаты подтверждают, что прямая трансплантация нейрональной матрицы в разрыв спинного мозга приводит к восстановлению моторной и сенсорной функций спинного мозга, равновесию, предупреждению патологической двигательной активности. Положительная неврологическая динамика наблюдается при трансплантации бесклеточной подложки, содержащей нейрональное микроокружение.

Ключевые слова: трансплантация, коллаген-хитозановая подложка, нейрональное микроокружение, предшественники нейрональных клеток, повреждение спинного мозга, неврологический контроль

THE TRANSPLANTATION OF CELLULAR POLYSSACHARIDE SCAFFOLD BY INCOMPLETE SPINAL CORD INJURY OF RATS. DYNAMIC NEUROLOGICAL CONTROL

Bolshakov I.N., Krivopalov V.A., Kaptyuk G.I., Karapetjan A.M., Ignatov A.V.

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, e-mail: bol.bol@mail.ru

Results of direct transplantation collagen – chitosan matrix in a spinal cord of adult rats after its partial section are investigated. Structure of substrates: polyssacharides, factors of the growth, the conditioned nutrient medium from neuronal cells of the mouse, and also the progenitors of neuronal cells with specific markers expression of the neuronal nature. Researches show, that the direct transplantation of the neuronal scaffold in a spinal cord restores impellent and sensitive functions of a spinal cord, balance, prevents the pathological impellent activity. Positive neurologic dynamics is observed at non-cellular scaffold transplantation containing a neuronal microenvironment.

Keywords: transplantation, collagen-chitosan scaffold, neuronal microenvironment, progenitors of neuronal cells, spinal cord injury, neurological control

Фундаментальные и прикладные исследования в области хитина и хитозана в сфере биологии и медицины показывают четкую тенденцию прочного вхождения этих биополимеров и их химических дериватов не только в качестве эффективной биодобавки к пищевым продуктам, но и в качестве самостоятельных конструкций, способных выполнять конкретные задачи в профилактике и лечении заболеваний терапевтического и хирургического плана. Известная пищевая добавка благодаря всемирным достижениям в научном поиске переходит в разряд парентеральных имплантатов, выполняя функции систем переноса целевых молекул или клеток через агрессивные среды без потери их изначальной активности. Традиционно считалось, что возможность регенерации спинного мозга (СМ) резко ограничена в связи с необратимыми морфологическими изменениями в нервной ткани после повреждения. Однако за последнее время накоплены экспериментальные результаты и ограниченный клинический материал, свидетельствующие о принципиальной возможности регенерации в центральной нервной системе (ЦНС) и возможном восстановлении ее на-

рушенных функций [8, 16, 18]. Полученные научные факты позволяют с современных позиций пересмотреть канонизированные представления о регенераторном потенциале в ЦНС, а также предложить новые стратегии и концепции лечения повреждений СМ [1, 2, 3, 12]. Большинство исследователей в этой области полагают, что будущее принадлежит технологиям регенераторной медицины. Основным инструментом регенераторной медицины являются различные клеточные технологии от трансплантации клеток (клеточная терапия) до тканевой инженерии. В этом смысле речь идет о введении клеток при травматическом повреждении спинного мозга (СМ). Нейрональные клетки-предшественники можно получить при определенном микроокружении в условиях *in vitro* из ЭСК и в дальнейшем использовать в качестве собственно клеточного трансплантата. Подобные манипуляции приводят к положительной неврологической динамике и морфологическому восстановлению СМ. При этом эффект трансляции жизнеспособного пересаженного клеточного материала существен и сопровождается дифференцировкой на 3 основных типа нейрональных

клеток: нейроны, астроциты и олигодендроциты [17]. Маркерный анализ подтверждает процесс ремиелинизации нервных проводников [14]. Инъекция взвеси НСК, выделенных из фетального гиппокампа, приводит к достоверной их трансляции в зоне травмы СМ, дифференцировке в нейроны, астроциты и олигодендроциты и восстановлению нарушенных функций у половозрелых крыс [5] или у представителей приматов [7]. Трехмерную матрицу в качестве трансплантата, содержащего олифакторные нейрональные клетки (ОНК), ряд авторов помещал в зону одностороннего повреждения пирамидного тракта у взрослых крыс. Результаты указывали на дифференцировку клеточной массы в Шванновские клетки и их активизацию взаимодействия с нейрофибробластами. Как известно, такая межклеточная связь провоцирует процесс миелинизации аксонов, появление новых аксонов, их рост и спрутинг в дистальную культуру СМ [6, 10, 13, 15]. При этом морфологический инжиниринг СМ сопровождается сокращением неврологического дефицита, несмотря на использование модели полного пересечения СМ [11]. Совершенно очевидно, что процесс инжиниринга поддерживается комплексом молекулярного микроокружения, создаваемого клетками СМ, в основе которого лежит взаимодействие нейротрофических факторов [9].

Цель исследования – неврологический контроль у взрослых крыс с частичным разрывом спинного мозга после трансплантации коллаген-хитозановой матрицы с нейрональным микроокружением и предшественниками нейрональных клеток.

Материалы и методы исследования

Экспериментальная спинальная травма у крыс (разрыв спинного мозга). В исследования включены 24 половозрелые крысы-самки массой 200–220 г. Группу опыта в срок 1 неделя после травмы составили 19 животных, группу контроля – 5 животных, в срок 2 недели – 17 и 5 особей соответственно, в срок 3 недели – 5 и 14 особей соответственно, в срок 4 недели – 8 и 2 особи соответственно. Премедикация: за 30 мин до операции – Sol. Tramadol 2,5 мг в/м; Sol. Atropini sulfatis 0,1% – 0,1 мл в/м; Sol. Dimedroli 0,1% – 0,1 мл в/м. Анестезия: наркоз (диэтиловый эфир). Животным с использованием операционного микроскопа воспроизводилась модель спинальной травмы на уровне IX–X грудных позвонков с 50% по объему боковым пересечением ствола спинного мозга после предварительно выполненной ламинэктомии.

Ход операции. После предварительной обработки операционного поля 70-м% раствором этилового спирта под наркозом производился разрез по средней линии спины животного на уровне от Th7 до L4 длиной 4–5 см. Гемостаз производился по ходу операции. После рассечения кожи, подкожно-жирового слоя края раны мобилизовались и разводились ра-

норасширителями Эдсона. Остисто-трапециевидная и широчайшая мышцы отсекались от мест их прикрепления к остистым отросткам Th9 – L3. Мышцы глубокого слоя отсекались от позвоночника тупым инструментом и разводились микрохирургическим ранорасширителем, оголялись дужки позвонков Th9-Th12. Производилась резекция дужки Th10, твердая мозговая оболочка рассекалась и разводилась в стороны в горизонтальной плоскости. При помощи микроскальпеля и микроножниц осуществлялось пересечение 1/2 правой боковой порции спинного мозга в поперечном направлении. В образовавшийся дефект нервной ткани размерами около 1 мм помещался нейрональный клеточно-матричный имплантат указанного ниже состава. Костная рана закрывалась полисахаридной гидрогелевой массой «Бол-хит», не содержащей животного коллагена. Рана ушивалась послойно: на глубокий слой мышц накладывались П-образные швы шовным материалом Vicril 4-0; мышцы поверхностного слоя ушивались непрерывным швом Vicril 4-0; на кожу накладывались П-образные швы нитью Polyester 3-0. Швы обрабатывались спиртовым раствором йода.

Состав трансплантируемых матриц. В качестве вариантов коллаген-хитозановых конструкций готовили 2 различные подложки, содержащие следующее микроокружение для нейрональных клеток:

1) лиофилизированная коллаген-хитозановая матрица, содержащая сульфатированные и несulfатированные гликозаминогликаны (хондроитинсульфат, гиалуронат натрия, гепарин), с включенными в нее элементами полной питательной среды DMEM, кондиционированной среды от нейрональных клеток мыши и нейрональной добавки N2 (контроль);

2) лиофилизированная коллаген-хитозановая матрица того же состава, содержащая предшественников нейрональных клеток, полученных при культивировании и дифференцировке эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши (опыт).

Варианты пористых матриц-подложек предварительно перед посадкой на них эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) нарезают объемом 1 мм³ и в стерильных условиях раскладывали по лункам 96 луночного планшета без покрытия 0,1% раствором желатина. Клетки с культуральных флаконов снимали 0,5-м% раствором коллагеназы, затем трижды отмывали чистой средой от фермента и переносили в лунки с нарезанной матрицей в среде для ЭСК. Клетки культивировали не менее 3-х суток до появления нейрональных маркеров в гумидных условиях при 37°C и 6% CO₂. Количество прикрепленных клеток оценивали путем диспергирования 5–6 кусочков матрицы в растворе фермента с последующим подсчетом клеток в камере Горяева. Каждый будущий нейроимплантат в процессе культивирования содержал порядка 50 тыс. эмбриональных стволовых клеток. Перед имплантацией кусочки глазным пинцетом осторожно переносили в микропробирки с питательной средой DMEM/F12 и транспортировали в операционную.

Послеоперационный уход. В течение 3–5 дней после операции в качестве анальгетика животные получали Sol. Tramadol 2,5 мг 3 раза в день в/м. Швы снимали на 10 сутки. В ранний послеоперационный период, в первые 24 часа – допуск животных к воде. Кормление – на 2-3 сутки после операции исключительно смесью «Полипротен-нефро» (лечебное питание) в течение 1–4 недель. Крысы содержались в отдельных клетках с двойным сетчатым дном для

активного передвижения, соблюдения гигиены, самостоятельного приема воды и пищи. Лекарственную поддержку осуществляли антибиотиком широкого спектра действия, спазмолитиками, сосудорасширяющими препаратами.

Динамический неврологический контроль. Для оценки неврологических нарушений и динамики восстановления применялась шкала оценки выраженности неврологического дефицита (Neurological Severity Scores – NSS)[4] в течение 1–4 недель послеоперационного периода. В схему контроля входили:

1. *Оценка моторной функции* (подвешивание крысы за хвост с регистрацией сгибания передней и задней конечностей, отклонения головы более чем на 10 градусов от вертикальной оси в течение 30 с, помещение крысы на пол с оценкой нормального движения по полу, неспособности сохранять направленное движение, движения по кругу в сторону паретичных конечностей, падения на паретичную сторону.

2. *Оценка сенсорной функции* (укладывание: зрительный и тактильный тесты; проприоцептивный тест (придавливание лапки к краю стола).

3. *Оценка равновесия* (сохранение равновесия и стабильное положение тела, захватывание балансира, крепкое сжатие балансира и отвисание одной паретичной конечности вдоль балансира, крепкое сжатие балансира и отвисание двух паретичных конечностей вдоль балансира, или кружение на балансире (более 60 с), попытка сохранить равновесие на балансире (более 40 с), но падение с него, попытка сохранить равновесие на балансире (более 40 с), но падение с него, падение без попытки балансировать или ухватиться за балансир (менее 20 с).

4. *Отсутствие рефлексов или патологическая двигательная активность* (рефлекс с ушной раковины при дотрагивании до слухового бугорка – тряска головой, роговичный рефлекс при дотрагивании до роговицы кусочком ваты – мигание, рефлекс испуга (двигательный ответ на короткий шум при щелкании зажима для бумаги), судороги, миоклонус, миодистония. Один балл соответствует невозможности выполнить задание или отсутствие тестируемого рефлекса; 13–18 баллов – выраженное повреждение; 7–12 баллов – повреждение средней степени тяжести; 1–6 баллов – умеренное повреждение.

Результаты исследования и их обсуждение

Спинальная травма. Моделирование спинальной травмы на уровне IX–X грудных позвонков с частичным (50% по объему) боковым пересечением ствола спинного мозга и имплантацией в диастаз между центральным и периферическим сегментами спинного мозга коллаген-хитозановой матрицы с эмбриональной нейрональной клеточной массой показало адекватность используемой модели. У животных в послеоперационном периоде без лечения в течение 4-х недель имелось стойкое выпадение определенных сенсорных и моторных зон иннервации в области нижних конечностей, таза, нижней половины туловища. Используемая модель позволяет технически осуществлять имплантацию коллаген-хитозановых матриц в область разрыва спинного

мозга, создает возможность надежно выхаживать животных в послеоперационном периоде с нулевой смертностью.

Анализ неврологических нарушений после моделирования спинальной травмы и имплантации в диастаз спинного мозга контрольных и опытных матриц показал положительную динамику сенсорного и моторного восстановления спинного мозга.

Тест «суживающаяся дорожка» заключался в прохождении крысой по дорожке длиной 165 см и шириной в начале пути – 9 см, в конце пути – 3 см. Дорожка располагается на высоте 120–130 см над полом, что создаёт у крыс мотивацию для её преодоления. Крысы с повреждением спинного мозга при продвижении вперёд начинали оступаться (наступать тазовыми конечностями мимо дорожки). В зависимости от степени тяжести травмы спинного мозга в целом, и степени нарушения проприорецепции в частности, крысы могли безошибочно проходить по дорожке различного расстояния. Интактные крысы преодолевали дорожку полностью.

Результаты анализа показали, что в присутствии как только матрицы с полным микроокружением, так и матрицы с эмбриональной клеточной массой – предшественниками нейрональных клеток происходит существенное улучшение неврологических показателей, таких как моторная и сенсорная активность задних конечностей, отсутствие патологической двигательной активности, восстановление состояния равновесия, улучшение выполнения тестов на горизонтальной поверхности и передвижений по суживающей дорожке. Через 1 неделю после частичной транссекции спинного мозга интегральная сумма балла в контроле, включающая оценку моторной, сенсорной активности, равновесия, патологическую двигательную активность составила 8,8 баллов, в опыте – 8,94 баллов, что соответствует средней степени тяжести спинальной травмы. Животные в тесте «беговая суживающая дорожка» проходили за лимитное время в среднем 13,8 см. Через 2 недели после нанесения спинальной травмы интегральная сумма баллов при оценке неврологических функций экспериментального животного составила в контроле 6,2, в опыте – 7,46, что указывает на снижение тяжести нарушений и приближение ее к границе умеренного повреждения. Через 3 недели после экспериментальной травмы спинного мозга интегральная сумма нарушений в контроле составила 5,4 балла, а в опыте 6,12 балла. Эти величины соответствуют умеренной силе повреждения. Динамика снижения тяжести неврологиче-

ских нарушений сохраняется к 4-й неделе послеоперационного периода и составляет в опыте 5,6 балла. При этом в тесте «беговая суживающая дорожка» крысы опытной группы наращивали каждую неделю расстояние пробега от 13,8 см в 1-ю неделю до 47,5 см в 4-ю неделю. Необходимо указать, что положительный эффект при имплантации матрицы без клеток при отсутствии воспалительных процессов связан скорее всего с достаточным набором факторов, включенных в ее состав, необходимых для стимуляции миграции собственных клеток, участвующих в регенерации. Другими словами, сама матрица регулирует репаративные процессы в ране.

Заключение

Таким образом, исследования неврологического статуса у взрослых крыс после экспериментального частичного пересечения спинного мозга и прямой трансплантации коллаген-хитозановой губки, содержащей нейрональное микроокружение, и предшественников нейрональных клеток мышцы, подтверждают положительную неврологическую динамику в тестах Neurological Severity Scores – NSS в течение 1–4 недель после операции. Положительное действие имеет место не только при трансплантации предшественников нейрональных клеток, но и при трансплантации безклеточной подложки, содержащей нейрональное микроокружение.

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. Берсенева А.В. Клеточная трансплантология – история, современное состояние и перспективы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – №1. – С. 49–56.
2. Борщенко И.А. Современные возможности активного лечения травматического повреждения спинного мозга // Общество спинной мозг: материалы 4-й ежегодной всероссийской научно-практической конференции. – М., 2005. – С. 4–10.
3. Брюховецкий А.С. Трансплантация нервных клеток и тканевая инженерия мозга при нервных болезнях. – М.: ЗАО Клиника восстановительной интервенционной неврологии и терапии «НейроВита», 2003. – 398 с.
4. Изменение активности АДФ-рибозилциклазы в клетках нервной системы коррелирует с развитием по-

стишемической когнитивной дисфункции / А.Б. Салмина, Н.А. Шнайдер, С.В. Михуткина, А.А. Фурсов, Н.А. Малиновская, Л.В. Труфанова // Международный неврологический журнал. – 2007. – Т.1 (11) (<http://neurology.mif-ua.com/archive/issue-1978/article-1994>).

5. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 6126–6131.

6. Experimental and clinical observation olfactory ensheathing cells: Migratory property after being transplanted in spinal cord // First International Spinal Cord Injury Treatment and Trials Symposium. Abstracts and free papers. – Hong-Kong, 2005. – P. 22.

7. Intravenously injected neural progenitor cells of transgenic rats can migrate to the injured spinal cord and differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes // Neurosci. Lett. – 2004. – Vol. 366, № 3. – P. 287–291.

8. Kakulas B.A. Neuropathology: the foundation for new treatments in spinal cord injury // Spinal Cord. – 2004. – Vol. 42(10). – P. 549–563.

9. Neurotrophin 3 Promotes Purification and Proliferation of Olfactory Ensheathing Cells From Human Nose // GLIA. – 2004. – Vol. 45. – P. 111–123.

10. Raisman G. A promising therapeutic approach to spinal cord repair (editorial). // J.R. Soc. Med. – 2003. – Vol. 96. – P. 259–261.

11. Ramer L.M., Au E., Richter M.W. Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury // J. Comp. Neurol. – 2004. – Vol. 473, №1. – P. 1–15.

12. Tator C. H. Strategies for recovery and regeneration after brain and spinal cord injury // Inj. Prev. – 2002. – Vol. 8. – P. 33–36.

13. The influences of transplanted olfactory ensheathing cells of axonal regeneration in adult rat spinal cord. // First International Spinal Cord Injury Treatment and Trials Symposium. Abstracts and free papers. – Hong-Kong, 2005. – Ab060. – P. 57.

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

15. Transplantation of olfactory ensheathing cells for the treatment of spinal cord injury // First International Spinal Cord Injury Treatment and Trials Symposium. Abstracts and free papers. – 2005. – P. 21.

16. Tsai E.C., Tator C.H. Neuroprotection and regeneration strategies for spinal cord repair // Curr Pharm Des. – 2005. – Vol. 11(10). – P. 1211–1222.

17. Whittemore S.R. Neuronal replacement strategies for spinal cord injury // J. Neurotrauma. – 1999. – Vol. 16. – P. 667–673.

18. Young W. Bases for Hope in Spinal Cord Injury. – <http://sci.rutgers.edu>.

Рецензенты:

Прокопенко С.В., д.м.н., профессор, научный руководитель Центра нейрореабилитации ФГБУ «Сибирский Клинический Центр Федерального медико-биологического агентства», г. Красноярск;

Зайцева О.И., д.м.н., зав. лабораторией клинической мембранологии и иммунохимических исследований НИИ Медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск.

Работа поступила в редакцию 25.10.2011.