

И. Н. Большаков¹, В. И. Сергиенко², С. Л. Киселёв³, М. А. Лагарькова^{2,3}, А. А. Ремигаило⁴,
А. А. Михайлов⁴, С. В. Прокопенко¹

НОВЫЕ ТКАНЕ-ИНЖЕНЕРНЫЕ ПРОДУКТЫ В ЛЕЧЕНИИ ПОЗВОНОЧНО-СПИННОМОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

I. N. Bolshakov, V. I. Sergienko, S. L. Kiselev, M. A. Lagarkova, A. A. Remigaylo,
A. A. Mikhaylov, S. V. Prokopenko

NEW PRODUCTS TISSUE-ENGINEERING IN THE TREATMENT OF SPINAL CORD INJURY

¹ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» МЗ РФ, г. Красноярск

²ФГБУН «НИИ физико-химической медицины» ФМБА, г. Москва

³ФГБУН «НИИ общей генетики им. Н. И. Вавилова» РАН, г. Москва

⁴ООО «ПРОмедфарм», г. Москва

При лечении больных с осложненным повреждением спинного мозга российское здравоохранение затрачивает около 1 млн рублей на каждого пациента в острый и переходный периоды после травмы. Количество случаев осложненной травмы спинного мозга в различных географических районах Российской Федерации составляет от 30 до 50 на 1 млн населения, т.е. 5 600–6 000 человек. Применение современных хирургических и фармакологических методов лечения и нейрореабилитации дает неудовлетворительные результаты или минимально эффективное лечение, особенно при полном анатомическом разрыве спинного мозга. Выполнена трансплантация в анатомической разрыв спинного мозга крыс 100 тыс. мышинных нейрональных клеток-предшественников (24 особи) или нейронных клеток-предшественников человека (18 особей) с последующим анализом неврологического дефицита. Имплантация нейрональной матрицы в спинном мозге крыс, содержащей 100 тыс. нейрональных клеток-предшественников человека, устраняет неврологический дефицит в течение 14 нед после трансплантации, что составляет 5–9 баллов по шкале BBB. Культивирование в условиях *in vitro* индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (hiPSC) на коллаген-хитозановой матрице показало, что нейроны, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, выращенных на матрицах, образуют форму сфероидов и имеют короткие невриты. Клетки не проникают в матрицу при длительном культивировании; структуры, напоминающие нейросферы, формируются вблизи поверхности матрицы. Около 90 % клеток имели положительную экспрессию нейронального маркера тубулина b3. Дальнейшие исследования ставят задачи анализа совместимости нейронных культур и нейрональных подложек.

Ключевые слова: коллаген-хитозановая матрица, нейрональные клетки-предшественники мыши и человека, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека, трансплантация, анатомическое повреждение спинного мозга, функциональное восстановление

The results of the use of chitosan-collagen substrates in the presence of growth factors and neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells in treatment of complete anatomical fracture of the spinal cord in rats has been presented in the paper. It was demonstrated that transplantation of these substrates in the spinal cord of animals, leads to complete or partial recovery of motor, sensory and autonomic functions.

Key words: chitosan-collagen substrate, mouse and human embryonic stem cells, transplantation, spinal cord injury, functional recovery.

УДК 616.832:616.711]-001-089
DOI 10.17223/1814147/54/9

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ЭКОНОМИКА ПОЗВОНОЧНО-СПИННОМОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Показатели качества медицинской помощи пострадавшим с сочетанной позвоночно-спинномозговой травмой (ПСМТ) в различных горо-

дах России на догоспитальном и госпитальном этапах невысоки. Применяемые до настоящего времени хирургические и фармакологические методики дают неудовлетворительные или минимально эффективные результаты лечения [1, 2].

На лечение одного пациента с осложненной позвоночно-спинномозговой травмой российское

здравоохранение затрачивает порядка 1 млн рублей в острейший, острый и промежуточный периоды после травмы. Число осложненных ПСМТ составляет в разных географических зонах России от 30 до 50 на 1 млн населения, что составляет 5 600–6 000 пострадавших в год. Таким образом, ежегодные расходы в острейший, острый и промежуточный периоды после травмы составляют около 5,6 млрд руб.

Количество лиц, нуждающихся в уходе и нейрореабилитации в отдаленном периоде, в нашей стране составляет 55–60 тыс. человек. Затраты на одного такого пациента составляют в отдаленный период только за 1 мес без учета хирургической реабилитации порядка 720 тыс. руб. в год (четырёхразовая реабилитация по 18 дней, согласно МЭС). Таким образом, затраты на всех нуждающихся в реабилитации составляют 43,2 млрд руб.

Применение предлагаемого продукта-имплантата с целью реконструкции спинного мозга после анатомического разрыва предполагает устранение проблем со стороны тазовых органов. Стоимость лечения одного пациента с патологией тазовых органов, функция которых нарушена в результате осложненной нейротравмы, в течение 40 дней (МЭС) [3] составляет около 687,3 тыс. руб. Таким образом, восстановление в течение 40 дней только функции тазовых органов позволит сократить затраты здравоохранения на одного пациента в отдаленном послеоперационном периоде (средняя продолжительность жизни 10 лет) на 6,87 млн руб. Общее сокращение затрат на эту категорию больных может составить за 10 лет 412,4 млрд руб.

Реабилитация в отдаленном периоде после травмы двигательной и чувствительной функций конечностей одного пациента сопровождается затратами порядка 542 тыс. руб в год. Восстановление двигательной и сенсорной активности в результате использования нового инновационного продукта может привести к сокращению сроков реабилитации с 72 до 18 дней в год, что позволит сократить затраты здравоохранения на сумму 362 тыс. руб в год. В целом сокращение затрат на реабилитацию этой категории больных с нарушениями двигательной и чувствительной функций конечностей по имеющимся МЭС может составить 21,75 млрд руб в год. За 10-летний период (средняя продолжительность жизни этой тяжелой категории пострадавших) высвободившиеся средства здравоохранения могут составить 217,5 млрд руб.

ВВЕДЕНИЕ

На основе коллаген-полисахаридных конструкций разработан ряд продуктов, имеющих перспективу применения в качестве импланта-

тов при анатомическом разрыве спинного мозга. Применение подложек, содержащих коллаген-хитозановый комплекс с включенными в него сульфатированными и несulfатированными гликозаминогликанами, факторами роста клеток, факторами пролиферации и дифференцировки стволовых клеток животных или человека, показало, что использование коллаген-хитозанового комплекса «Коллахит-бол» приводит к обратимым изменениям физико-химических свойств клеток. Процесс культивирования клеток на матрицах уменьшает их массу в состоянии апоптоза. Культивирование клеток подтверждает отсутствие цитотоксической реакции при контакте с матрицами. Сделан вывод о целесообразности перед процедурой трансплантации с целью улучшения эффективности приживания образца использовать клетки на этапе восстановления их функций и пролиферативной активности.

Предварительные результаты исследований по поддержанию плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и изучение строения колоний этих клеток показывают, что культивирование на полученных подложках может поддерживать в течение 7 сут нормальное морфологическое состояние колоний плюрипотентных клеток мышей, характерное и для ЭСК человека. Иммуноцитохимическое исследование маркеров плюрипотентности показывает в ЭСК, культивируемых на матрице, что клетки экспрессируют ядерные белки oct-4, TRA1-60, cd30 и антиген SSEA4. Таким образом, предложенные режимы культивирования эмбриональных стволовых клеток мышей после соответствующей подготовки биodeградируемых матриц позволяют повысить качество и стабильность культивирования, поддерживать у эмбриональных стволовых и мультипотентных стволовых клеток нормальные уровни внутриклеточного кальция, pH, НАДН, вязкость мембран, пролиферативную активность, исключить цитогенотоксичность коллаген-хитозановой подложки, исключить на конечном этапе получения клеточной матрицы обработку клеток ферментами в процессе пассирования при смене питательной среды, повысить прикрепление клеток к поверхности матрицы, и, следовательно, предупредить их потерю при пересеве на питательные среды благодаря присутствию в ней хитозанового биополимера, обеспечить получение клеточной матрицы, пригодной для прямой трансплантации.

Суть разрабатываемой технологии заключается в получении 3D-структуры на основе наноструктурированного хитозана, формируемой путем последовательного химического синтеза включения в состав этого природного линейного полимера сульфатированных и несulfатированных гликозаминогликанов, нейрональных факторов

детерминирования и роста, факторов роста стволовых клеток и самих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, предварительно получивших *in vitro* химические сигналы к нейрональной дифференцировке. Изделие медицинского назначения в виде эластичной губки содержит компоненты, функциональные свойства которых формируют наночастицы хитозана при биodeградации аналогично известной схеме с применением анионов триполифосфата натрия.

В настоящем проекте роль структурирующих наночастицы веществ играют соли гиалуроновой, хондроитинсерной кислот и гепарин. Широкая полидисперсность частиц, получаемых в процессе приготовления препаратов на основе хитозана, корректируется при их применении в биodeградируемых подложках. Эта коррекция обусловлена протеканием ферментативной деградации хитозана и комплексов на его основе, которая сдвигает распределение масс молекул и размеров наночастиц в сторону меньших величин. Нейрональные подложки на основе хитозан-коллагеновых комплексов в виде губки являются промежуточным продуктом, удобным для хранения и транспортировки. При клиническом использовании готового продукта губка в составе питательной среды имплантируется в рану. При этом происходит ее набухание и раскрепощение трансляционной подвижности наночастиц хитозана. При достижении наночастицами раневой поверхности происходит их включение в ферментативные процессы. В результате этих ферментативных реакций уменьшается размер молекул биополимера путем гидролиза хитозана по кислородным мостикам до уровня, позволяющего проникать через капилляры, поры и клеточные мембраны и эффективно выполнять функции системы переноса веществ, предусмотренных технологией, лекарственных препаратов, а также продуктов, подлежащих удалению.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

1. Иммуноцитоморфология ЭСК мышцы и ЭСК человека (нейрональная дифференцировка) в условиях нейрональной кондиционированной среды и нейрональной добавки N2 (определение маркеров GFAP, нейрофиламента и нестина) при культивировании на опытных образцах коллаген-хитозановых матриц *in vitro*: а) лиофилизированная коллаген-хитозановая матрица, содержащая сульфатированные и несulfатированные гликозаминогликаны (хондроитинсульфат, гиалуронат натрия, гепарин) с включенными в нее элементами полной питательной среды DMEM; б) лиофилизированная коллаген-хитозановая матрица того же состава, что и в п. 1, с дополнительно включенной в состав кондиционированной нейрональ-

ми клетками средой; в) лиофилизированная коллаген-хитозановая матрица того же состава, что и в п. 1, с включенной в нее нейрональной добавкой N2; г) лиофилизированная коллаген-хитозановая матрица того же состава, что и п. 1, с включенными в нее полной питательной средой DMEM, кондиционированной нейрональными клетками средой и нейрональной добавкой N2.

2. Иммуноцитохимический сэндвич-анализ диспергатов спинного мозга крыс (проточная цитометрия Guava Easy Cyte Mini, США), в различные сроки (от 1 до 20 нед) получивших трансплантаты различного состава (нейрональные маркеры: GFAP астроцитов, нейрофиламент и нестин, енолаза нейронов, маркер олигодендроцитов).

3. Иммуноцитогистохимический контроль жизнеспособности трансплантированных клеток мышцы в спинной мозг крысы – наличие в ядрах пересаженных клеток плазмиды, контролирующей синтез флуоресцирующего белка GFP (микроскопия Olympus BX51 и программные продукты Applied Spectral Imaging (США)).

4. Гистологический серийный анализ с окраской гематоксилин-эозином срезов спинного мозга крысы после трансплантации предложенных контрольных и опытных нейроматриц в сроки 1–20 нед (Leica, Германия).

5. Иммуногистохимический серийный анализ нейротрансмиттеров (серотонин, ацетилхолин, ГАМК) в клетках на различных уровнях спинного мозга крыс в сроки 1–20 нед посттрансплантационного периода (Abcam, США).

6. Использование на животных (белые крысы линии Вистар) модели 100%-й механической транссекции спинного мозга на уровне IX–X грудных позвонков с полным нарушением моторной, сенсорной и вегетативной функций спинного мозга, со 100%-й летальностью в группе отрицательного контроля. Модели сопровождались поддерживающей антибактериальной, обезболивающей терапией, обеспечением дренирования функций желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы (без имплантационной терапии), энтеральным питанием в течение 1 мес смесями «Полипротэн» («ПРОмедфарм», Москва).

8. Трансплантация 100 тыс. нейрональных предшественников мышцы (24 особи) или человека (18 особей) в анатомический разрыв спинного мозга крысы с последующим анализом неврологического дефицита.

9. Анализ экспрессии нейрональных маркеров клеток человека.

В экспериментах по культивированию плюрипотентных клеток человека первоначально для наращивания биомассы использовали основную среду коDMEM с добавлением 10% SR (заменитель сыворотки), 100 мкг/мл канамицина сульфата, 1 ммоль L-глутамин, 4 нг/мл основного фактора

роста фибробластов (bFGF), 1 ммоль раствор незаменимых аминокислот. Наращивание клеточной биомассы проводили во флаконах, покрытых 0,1%-м раствором желатина. Смену среды осуществляли ежедневно. Состояние колоний оценивали визуально с помощью микроскопа Olympus BX-51. После третьего пассажа с помощью 0,5%-го раствора коллагеназы ЭСК культивировали в среде с добавлением N2 компонента согласно инструкции производителя.

10. Иммунофлуоресцентный анализ плюрипотентных клеток человека. Каждые 3 сут проводилась формальдегидная фиксация с последующей иммуноцитохимией клеток с помощью антител против GFAP – глияльного фибриллярного кислого белка (маркер астроцитов), нейрофиламента и нестина. 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 флуоресцентный микроскоп Olympus BX51 и программные продукты Applied Spectral Imaging (США).

11. Анализ неврологического дефицита с использованием шкалы BBB [4].

12. Отработка Протокола культивирования, дифференцировки и пролиферации стволовых клеток человека (iPSC) в нейрональном направлении на 6 контрольных и опытных биоинженерных нейроматрицах. Контроль жизнеспособности клеточной массы.

13. Анализ экспрессии нейрональных маркеров стволовых клеток человека (iPSC) на биоинженерных нейроматрицах:

а) модифицированная гликозаминогликанами коллаген-хитозановая матрица, содержащая полную питательную среду DMEM;

б) модифицированная гликозаминогликанами коллаген-хитозановая матрица, содержащая кондиционированную питательную среду, полученную от нейрональных предшественников мЭСК;

в) модифицированная гликозаминогликанами коллаген-хитозановая матрица, содержащая DMEM и нейрональную добавку N2;

г) модифицированная гликозаминогликанами коллаген-хитозановая матрица, содержащая кондиционированную питательную среду от нейропредшественников, перепрограммированных мЭСК, и нейрональную добавку N2;

д) модифицированная гликозаминогликанами коллаген-хитозановая матрица, содержащая кондиционированную питательную среду, полученную от нейрональных предшественников чЭСК;

е) модифицированная гликозаминогликанами коллаген-хитозановая матрица, содержащая кондиционированную питательную среду от нейропредшественников, перепрограммированных чЭСК, + нейрональную добавку N2.

При работе с индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками человека для заселения матриц использовали нейрональные предшественники, полученные методом направленной дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) здоровых доноров по ранее разработанному протоколу [5]. Для засева матриц использовали нейрональные предшественники, полученные из трех различных линий иПСК. Заселение матриц проводилось в среде для культивирования, имеющей следующий состав: DMEM/F12, penicillin/streptomycin 1x, B27 1x, BDNF 10 ng/ml, Forskolin 4 μ M. Заселение матриц проводилось двумя способами. В первом случае матрикс предварительно вымачивали в DMEM/F12, penicillin/streptomycin 1x, B27 1x, BDNF 10 ng/ml, Forskolin 4 μ M на протяжении 2–4 ч в лунках 24-луночного планшета, после чего излишки среды по краям отбирались и на поверхность матрикса с помощью наконечника наносилось 100 мкл суспензии, содержащей 10^6 клеток. Клетки в течение 1 ч оставляли прикрепляться в CO_2 -инкубаторе, после чего в лунку добавляли 1 мл среды, до полного закрытия поверхности матрикса. Наблюдение за клетками проводили на протяжении 8–10 сут. В качестве контроля нейрональные предшественники засеивались в лунку, покрытую матригелем.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Контроль фенотипа и функции клеток при культивировании на коллаген-хитозановых матрицах показал, что добавление в культуральную среду компонента нейрональной добавки N2 или кондиционированной среды приводит к нейрональной дифференцировке ЭСК мыши и человека. Исследование морфологии клеток показывает, что ЭСК после культивирования в вышеописанных условиях способны приобретать нейрональный фенотип. На 1-е сут в обоих случаях отсутствуют сигналы флуоресценции нейрофиламента. На 5-е сут характерно появление экспрессии нейрофиламента при культивировании ЭСК в кондиционированной среде от эмбриональных нейрональных клеток, а на 7-е сут – и в клетках, культивируемых в среде с добавлением N2 компонента. Аналогичная картина наблюдается и в случае определения маркеров GFAP и нестина. Таким образом, результаты показывают, что, как и при культивировании на матрицах в кондиционированной эмбриональными нейрональными клетками среде, так и в среде с добавлением N2 компонента ЭСК на 14-е сут экспрессируют маркеры, характерные для нейрональных клеток и приобретают их морфологию.

2. Предварительный морфологический и цитохимический анализ клеток спинного мозга при

спинальной травме и трансплантации нейроматрицы показал, что трансплантированные на матрицу предшественники нейронов жизнеспособны и пролиферируют в течение 2 нед. Относительное содержание клеток, экспрессирующих фактор GFP, не изменяется на протяжении 2 нед и составляет около 34 %.

3. Результаты анализа гистопрепаратов показали, что при имплантации матрицы с клетками в спинной мозг происходит приживание и миграция их в раневой зоне с последующей дифференцировкой в нейрональном направлении в течение 1–4 нед. Ключевое значение имеет не только трехмерная структура носителя, но и нейрональное окружение клеток в ране. У животных как в ранние сроки, так и в поздний период наблюдается наличие трансплантированных клеток, дифференцирующихся в тканеспецифические типы. При дифференцировке клеток по нейрональному направлению в продольном срезе спинного мозга отмечаются наличие нейрофиламентов в клеточном цитозоле и образование синапсов.

4. При выполнении анализа наличия енолазы в препаратах спинного мозга после обработки клеток антителами против енолазы и последующего мечения вторичными антителами с детекцией флуоресценции обнаруживается специфический белок нейрона. При обработке антителами против глияльного кислого белка последний также обнаруживается в клеточной массе трансплантированных клеток. В препаратах спинного мозга ЭСК, обработанных антителами против олигодендроцитов, с последующим мечением вторичными антителами и детекцией флуоресценции, последние обнаруживаются в зоне прямой трансплантации. Исследование гистологических препаратов области имплантации, окрашенных гематоксилин-эозином, показывает, что имплантация клеток на матрицах (независимо от состава) демонстрирует более высокую скорость заживления по сравнению с имплантатами без клеток. Клетки в матрицах не только выживают, но и заполняют всю структуру. Количество волокон биополимера в таких препаратах снижено, что свидетельствует о высокой метаболической активности в зоне репарации. При заполнении матрицы клетками ткань, образованная ими, приобретает структуру, идентичную неповрежденным участкам. На 4-й нед после имплантации биополимерный материал практически полностью деградирует, замещается клеточной массой, схожей с интактными участками, тогда как при имплантации матрицы без клеток в тот же срок клеточность зоны экспериментального повреждения незначительна, количество биополимерного материала превышает его содержание в опытных образцах, содержащих имплантированные клетки.

5. Анализ маркеров нейронов в диспергатах спинного мозга из мест дислокации спинальной травмы и имплантации нейрональной матрицы показывает, что в образцах присутствуют GFP-меченые клетки независимо от типа имплантированных матриц, обнаруживается стабильная экспрессия GFP на 3-й и 4-й нед после трансплантации в зону повреждения спинного мозга, что указывает на способность к хоумингу трансплантированных клеток в зоне повреждения. Анализ образцов гистологических препаратов на наличие маркеров нейрональной дифференцировки и восстановление нормальных синаптических межклеточных связей указывает на то, что трансплантированные клетки экспрессируют маркеры олигодендроцитов и нейрофиламентов, образуя межсинаптические связи. Встречаются меченные против нейрофиламента клетки, что указывает на дифференцировку в данном направлении перенесенных ЭСК. Исследование маркеров на мембранах олигодендроцитов показывает, что клетки формируют характерные морфологические структуры.

6. Анализ маркеров передачи нервного сигнала при частичной травме спинного мозга показал, что в сегментах центральной нервной системы, находящихся выше контрольного бесклеточного трансплантата, обнаруживаются клетки, экспрессирующие ГАМК, ацетилхолин и серотонин в сроки от 1 до 4 нед после оперативного вмешательства. В контроле зона имплантации матрицы заполнена межклеточной тканью с клетками материнского спинного мозга, экспрессирующими выше названные нейротрансмиттеры. В хвостовой части спинного мозга обнаруживается жизнеспособная ткань с клетками, продуцирующими медиаторы передачи нервного сигнала.

7. У животных опытной серии при частичной травме спинного мозга в зонах головной и хвостовой части обнаруживается идентичная контролю картина экспрессии нейротрансмиттеров. Вместе с тем, регистрируется феномен спрутинга трансплантированных предшественников нейрональных клеток из зоны трансплантации в проксимальный отдел материнского спинного мозга. В цитоплазме клеток кроме обнаружения зеленого флуоресцирующего протеина выявляется экспрессия нейромедиаторов. Во всей зоне трансплантации в спинной мозг коллаген-хитозановой матрицы с предшественниками нейрональных клеток помимо клеток материнской ткани регистрируется высокое число клеток, содержащих в цитоплазме GFP. Кроме того, эти клетки экспрессируют ГАМК, ацетилхолин и серотонин. В хвостовой части спинного мозга ниже трансплантированной клеточной матрицы наблюдается спрутинг предшественников нейрональных клеток (клетки, экспрессирующие ацетилхолин-GFP, через 2 нед после трансплантационного периода).

8. Иммунофлуоресцентный анализ нейротрансмиттеров контрольных серийных срезов головного отдела спинного мозга крысы через 20 нед после его полной транссекции (непосредственно надтрансплантационная зона) показывает, что межучасточная ткань заполнена ядерной клеточной массой, активно экспрессирующей ГАМК, ацетилхолин и серотонин. Число таких клеток имеет равномерный характер распределения от центра к зоне трансплантата.

9. Серийный иммунофлуоресцентный анализ зоны коллаген-хитозанового трансплантата показывает, что через 20 нед после операции зона заполнена межучасточной мозговой тканью с большим числом жизнеспособных нейрональных клеток материнского спинного мозга, активно экспрессирующих маркеры ГАМК, ацетилхолин и серотонин. Кроме того, зона трансплантата содержит большое количество вновь образованных микрокапилляров, содержащих тела эритроцитов с эффектом аутофлуоресценции. Количество ядросодержащих клеток материнского спинного мозга в трансплантате уменьшается по направлению к хвостовому отделу. В хвостовой зоне спинного мозга (ниже трансплантата) число ядросодержащих клеток существенно меньше, чем в головной зоне и в контрольном трансплантате. Тем не менее, жизнеспособные клетки экспрессируют нейротрансмиттеры ГАМК, ацетилхолин и серотонин.

10. Исследование опытных образцов спинного мозга, содержащих, кроме нейронального микроокружения факторов роста, 100 тыс. предшественников нейрональных клеток мыши, показывает, что со стороны трансплантата регистри-

руется спрутинг клеток, продуцирующих GFP, в зону центрального отдела материнского спинного мозга. Трансляция ядросодержащих клеток сопровождается экспрессией нейромедиаторов ГАМК, ацетилхолина и серотонина. Детальный серийный анализ срезов собственно клеточного трансплантата в спинном мозге указывает на богатое содержание жизнеспособных нейронов, продуцирующих GFP и одновременно экспрессирующих нейромедиаторы. Трансплантированная клеточная масса помимо пришедших материнских нейрональных клеток занимает весь объем коллаген-хитозановой подложки. В хвостовой части спинного мозга опытной группы животных регистрируется сниженное число ядросодержащих клеток с экспрессией нейромедиаторов и без таковой. Изучение серийных срезов ниже коллаген-хитозанового клеточного трансплантата (хвостовой отдел спинного мозга) выявляет слабый феномен спрутинга GFP-клеток.

11. Установлено, что добавление в культуральную среду компонента N2 приводило к нейрональной дифференцировке ЭСК человека. Исследование морфологии клеток показало, что ЭСК после культивирования в вышеописанных условиях способны приобретать нейрональный фенотип. Отмечено, что на 1-е сут в обоих случаях отсутствуют сигналы флуоресценции по указанному маркеру. На 7-е сут наблюдалось появление экспрессии нейрофиламента при культивировании ЭСК в среде с добавлением N2 компонента. Еще через 1 нед при анализе ЭСК выявляются и другие маркеры нейрональной дифференцировки, такие как нестин и глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP) (рис. 1–6).



Рис. 1. 1-е сут. Отсутствие экспрессии нейрофиламента

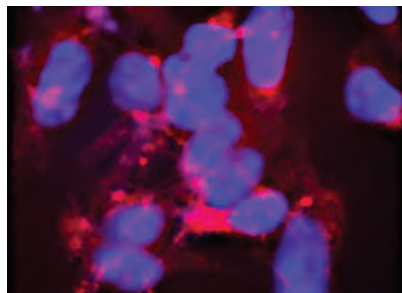


Рис. 2. 7-е сут. Экспрессия нейрофиламента

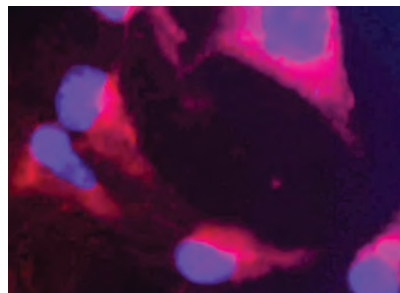


Рис. 3. 14-е сут. Экспрессия нейрофиламента

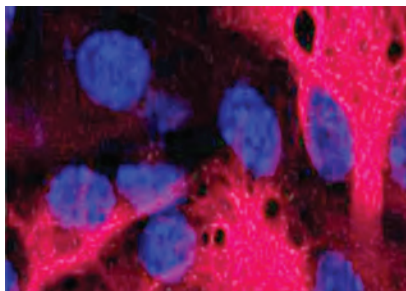


Рис. 4. GFAP

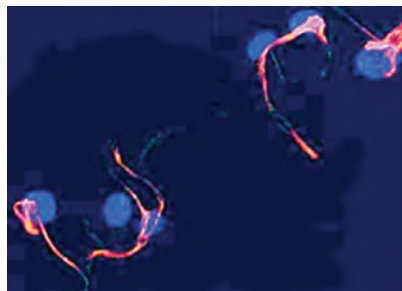


Рис. 5. Нестин

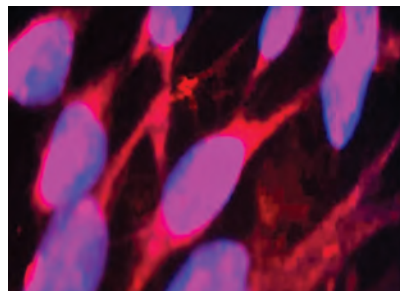


Рис. 6. Нейрофиламент

12. Анализ неврологического дефицита у крыс после полной транссекции спинного мозга показывает, что трансплантация бесклеточной коллаген-хитозановой матрицы в диастаз спинного мозга на уровне IX грудного позвонка приводит к заметному сокращению объема нарушений, восстанавливая функции тазовых органов в полном объеме, а также обеспечивает 5–6-й уровни восстановления моторных и сенсорных функций спинного мозга в течение 20 нед наблюдения. Имплантация в диастаз спинного мозга коллаген-хитозановой подложки с 100 тыс. предшественников нейрональных клеток мыши приводит к практически полному устранению нейродефицита, достигая в течение 20 нед 20-го уровня восстановления (из 21-го возможного) (рис. 7). Имплантация в спинной мозг крысы нейроматрицы, содержащей 100 тыс. нейрональных предшественников ЭСК человека, повторяет результаты трансплантации контрольных нейроматриц, не содержащих клеточную массу, устраняя нейродефицит в течение 14 нед после трансплантации порядка 5–6 баллов по шкале BBB (рис. 8).

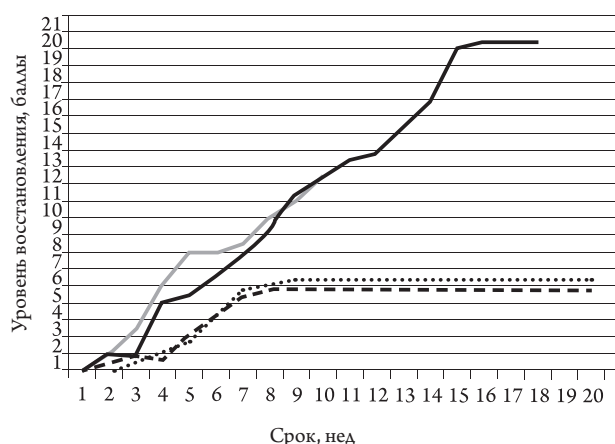


Рис. 7. Динамика изменения неврологического статуса крыс по шкале BBB на протяжении 20 нед после трансплантации ЭСК мыши (серый и черный маркер – две задние лапки в опыте, пунктирные маркеры – две задние лапки в контроле)

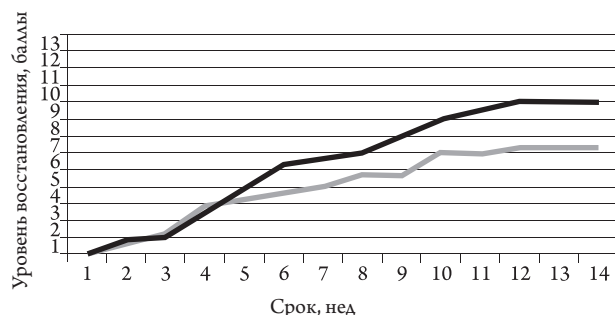


Рис. 8. Динамика изменения неврологического статуса крыс по шкале BBB на протяжении 14 нед после трансплантации плюрипотентных клеток человека (черный маркер – правая лапка, серый маркер – левая лапка)

13. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека на матриксах росли компактными группами, не выпускали нейриты, рост скорее наблюдался не по поверхности подложки, а над ней (рис. 9). В то же время контрольные клетки, как и положено, выпускали длинные нейриты, достигающие размеров в несколько миллиметров и формировали сетевую структуру (рис. 10). Внутрь матрикса клетки не проникали и при длительном культивировании формировали около поверхности сферические структуры, напоминающие нейросферы (рис. 11).

В связи с этим был использован другой способ заселения матрикса, который мог бы обеспечить более глубокое проникновение клеток. Для этого сухие матриксы помещались в криопробирку, в которой находилась суспензия клеток в концентрации $2 \cdot 10^6$ /мл. Пробирки помещались на 1 ч в CO_2 -инкубатор. После этого матрикс извлекался из пробирки и помещался в 24-луночную плашку и залитую средой доверху (1 мл). Использование этого подхода позволило немного увеличить проникновение клеток внутрь матрикса.

Анализ роста клеток показал, что одиночные клетки распределяются по матриксу, но растут и пролиферируют значительно хуже, чем в контроле. Вполне вероятно, что ни один из примененных способов заселения матрикса не обеспечивает полноценного заселения матрикса в связи с низкой адгезивностью нейрональных клеток к его поверхности. Для подтверждения того, что матриксы заселяются действительно нейрональными предшественниками, было проведено иммуноцитохимическое окрашивание клеток, растущих на матриксах антителами в b3 тубулин, маркеру нейрональных клеток (рис. 12, 13).

Как видно из рис. 12, 13, не менее 90 % клеток имеют нейрональный маркер b3 тубулин. Применение антител позволило визуализировать нейриты. Из приведенных микрофотографий видно, что нейриты очень короткие и сильно искривленные. Создается впечатление, что в отличие от нейритов, сформированных контрольными нейронами на матригеле, нейриты на матриксе пытаются избежать контактов с ним и формируются между отдельными группами нейронов «на весу». Разницы в росте клеток на разных типах матрикса от «а» до «г» не обнаружено. Матриксы под индексами «д» и «е» засевались труднее всего и деформировались после засева (картина скручивания). С целью преодоления низкой адгезивности матриксов нейрональными предшественниками и нейронами была предпринята попытка заселения матриксов комплексом нейрональных и глиальных клеток, полученных из одной и той же культуры индуцированных ПСК (рис. 14).

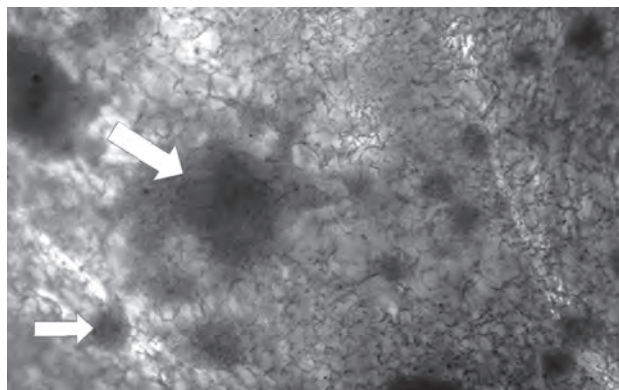


Рис. 9. Световой фазовый контраст нейрональных предшественников, засеянных суспензионно на матриксу. Группы клеток указаны стрелками

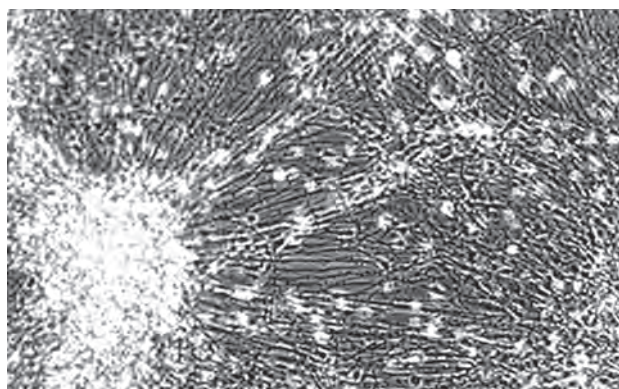


Рис. 10. Световой фазовый контраст контрольных нейрональных предшественников, засеянных на лунку, покрытую матриксом

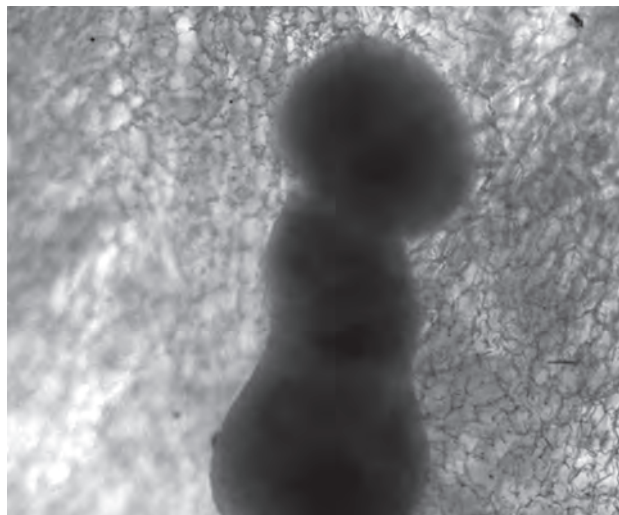


Рис. 11. Световой фазовый контраст нейрональных предшественников при длительном культивировании на матриксе

Не исключено, что в присутствии глиальных клеток нейрональные культуры будут вести себя на матриксах более физиологично и будут формировать нейрональные сети. В целом очевидно, что дальнейшие исследования потребуют внесения поправок в содержание белка

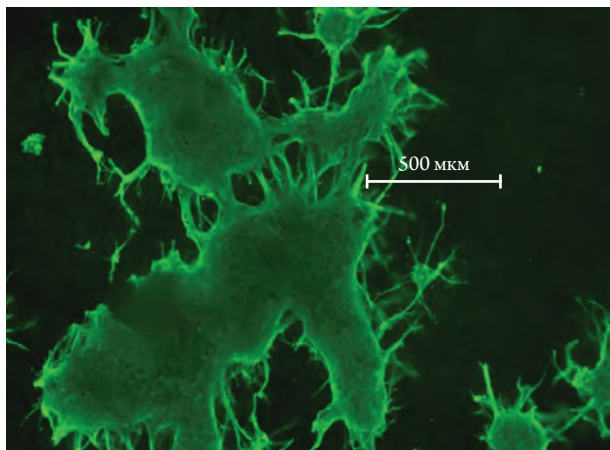


Рис. 12. УФ-изображение нейрональных предшественников, выращенных на матриксе и окрашенных антителами к β3 тубулину (зеленый)

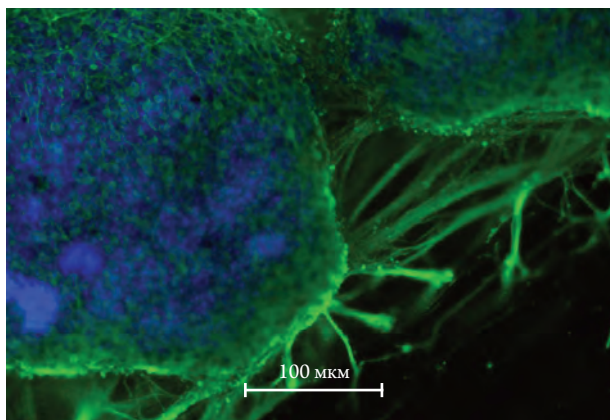


Рис. 13. УФ-изображение нейрональных предшественников, выращенных на матриксе и окрашенных антителами к β3 тубулину (зеленый) и DAPI (синий)



Рис. 14. УФ-изображение нейрональных и глиальных клеток при их совместном культивировании на матриксах на протяжении 8 сут. Окраска DAPI

в подложке, характеристик коллагена, сочетания клеток различной нейрональной природы, изменения 3D-структуры самой матрицы с ориентированными аксональными каналами для быстрого внедрения и роста клеток, качества и количества молекулярных нейродобавок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anderberg L., Aldskogius H., Holtz A. Spinal cord injury-scientific challenges for the unknown future // Ups J Med Sci. – 2007. – V. 112, № 3. – P. 259–288.
2. Fehlings M. G., Perrin R. G. The timing of surgical intervention in the treatment of spinal cord injury: a systematic review of recent clinical evidence // Spine. – 2006. – V. 15, № 31, suppl. 11. – P. 28–35.
3. Электронный ресурс: <http://ru.interhospital.com/hospital.pl?country=11®ion=77&city=11&clinic=0003&type=1021&spec=1025>
4. Basso D. M., Beattie M. S., Bresnahan J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats // J. Neurotrauma. – 1995. – V. 12. – P. 1–21.
5. Shutova M., Chestkov I., Bogomazova A., Lagarkova M., Kiselev S. L. Generation of iPS cells from human umbilical vein endothelial cells by lentiviral transduction, and their differentiation to neuronal lineage. In: Kaiming Ye and Sha Jin (eds.), Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells: Lineage-Specific Differentiation Protocols, Springer Protocols Handbooks, DOI 10.1007 / 978-1-61779-267-0_11, Springer Science + Business Media, LLC 2011.

REFERENCES

1. Anderberg L., Aldskogius H., Holtz A. Spinal cord injury-scientific challenges for the unknown future. Ups J Med Sci, 2007, vol. 112, no. 3, pp. 259–288.
2. Fehlings M. G., Perrin R. G. The timing of surgical intervention in the treatment of spinal cord injury: a systematic review of recent clinical evidence // Spine. – 2006. – vol. 15, no. 31, suppl. 11, pp. 28–35.
3. Электронный ресурс: <http://ru.interhospital.com/hospital.pl?country=11®ion=77&city=11&clinic=0003&type=1021&spec=1025>
4. Basso D. M., Beattie M. S., Bresnahan J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J. Neurotrauma, 1995, vol. 12, pp. 1–21.
5. Shutova M., Chestkov I., Bogomazova A., Lagarkova M., Kiselev S. L., Generation of iPS cells from human umbilical vein endothelial cells by lentiviral transduction, and their differentiation to neuronal lineage. In: Kaiming Ye and Sha Jin (eds.), Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells: Lineage-Specific Differentiation Protocols, Springer Protocols Handbooks, DOI 10.1007 / 978-1-61779-267-0_11, Springer Science + Business Media, LLC 2011.

*Поступила в редакцию 10.07.2015
Утверждена к печати 10.09.2015*

Авторы:

Большаков И. Н. – д-р мед. наук, профессор, КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого МЗ РФ (г. Красноярск).

Сергиенко В. И. – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУН «НИИ физико-химической медицины» ФМБА (г. Москва).

Киселёв С. Л. – д-р биол. наук, профессор, руководитель отдела генетических основ клеточных технологий, гл. научн. сотрудник ФГБУН «НИИ общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН (г. Москва).

Лагарькова М. А. – д-р биол. наук, руководитель лаборатории клеточной биологии ФГБУН «НИИ физико-химической медицины» ФМБА (г. Москва).

Ремигайло А. А. – генеральный директор ООО «ПРОмедфарм» (г. Москва).

Михайлов А. А. – директор по развитию ООО «ПРОмедфарм» (г. Москва).

Прокопенко С. В. – д-р мед. наук, профессор КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого, науч. руководитель Центра нейрореабилитации ГБУЗ СКЦ ФМБА России (г. Красноярск)

Контакты:

Большаков И. Н.

тел.: 8-913-511-0933

e-mail: bol.bol@mail.ru