

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

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДНОЙ НЕЙРОНАЛЬНОЙ МАТРИЦЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЫ

**I. N. Bolshakov, A. V. Eremeev, A. V. Svetlakov, Ju. I. Sheina,
I. V. Rendashkin, A. M. Polstjanoi, B. A. Krivopalov, G. I. Kaptjuk,
A. M. Karapetjan, A. V. Ignatov, N. N. Medvedeva, E. L. Zhukov**

USING NEURONAL POLYSSACHARIDE MATRIX IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL SPINAL CORD INJURY

*ГОУ ВПО КРasГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития России, г. Красноярск
Красноярский центр репродуктивной медицины, г. Красноярск
Институт биофизики СО РАН, Академгородок, г. Красноярск
Институт общей генетики им. Вавилова РАН, г. Москва*

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

Цель работы — показать процессы пролиферации и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в нейрональном направлении на коллаген-хитозановой матрице в присутствии искусственной кондиционированной нейрональной питательной среды и факторов нейрональной дифференцировки, продемонстрировать практическое использование специализированных подложек для биоинженерии спинного мозга при экспериментальной спинальной травме у крыс путем прямой трансплантации в зону разрыва.

Ключевые слова: нейрональная матрица, эмбриональная стволовая клетка, предшественники нейрональных клеток, экспериментальная спинальная травма, нейрональные маркеры, трансплантация, биоинженерия спинного мозга, неврологический статус, иммуноцитогистохимия.

The aim of the work is to show processes of embryonic stem cells proliferation and differentiation to neuronal rate on collagen-chitosan matrix at the presence of artificial conditioned neuronal nutrient medium and differentiated neuronal factors, to show practical use of the specialized scaffolds for bioengineering of a spinal cord in experimental spinal trauma at rats by direct transplantation in a zone of breaking.

Key words: neuronal matrix, embryonal stem cell, predecessors neuronal cells, experimental spinal cord injury, neuronal markers, transplantation, bioengineering of a spinal cord, neurologic status, immuno-cyto-histochemistry.

УДК 616.833.192-089.844:615.462:677.46

ВВЕДЕНИЕ

При решении вопросов первичной хирургической обработки осложненной позвоночно-спинальной травмы, как правило, не ставятся задачи реконструкции спинного мозга (СМ), выполняется операция на позвонках и решаются задачи стабилизации позвоночника относительно спинного мозга. За последнее время накоплены важные экспериментальные данные и ограниченный клинический материал, свидетельствующие о принципиальной возможности

регенерации в центральной нервной системе (ЦНС) и восстановлении ее нарушенной функции [1–3]. Полученные научные факты позволяют с современных позиций предложить новые стратегии и концепции лечения повреждений СМ [4]. Основным инструментом регенераторной медицины являются различные клеточные технологии — от трансплантации клеток в место травмы после оперативного доступа через костные элементы позвоночника и обнажения спинного мозга (клеточная терапия) до тканевой инженерии.

В экспериментах на крысах пересадка шванновских клеток крысам в спинной мозг, при частичной его перерезке, может сопровождаться значительным восстановлением функции ЦНС с демонстрацией не только обширной регенерации спинномозговых аксонов ростральнее и каудальнее зоны повреждения, но и ограниченного спрутинга аксонов в каудальный конец трансплантата [5–7]. При этом частично восстанавливается функция конечностей [8]. Растущие аксоны при использовании эмбрионального трансплантата регенерировали с формированием связей. Применение трансплантации эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) на модели спинальной травмы показало способность этих клеток встраиваться в поврежденные участки СМ, дифференцироваться согласно молекулярному и клеточному микроокружению, быть длительно жизнеспособными [9]. При этом образующиеся из ЭСК олигодендроциты у половозрелых крыс подвергаются миелинизации в области аксонов. Аксональный рост может сопровождаться прорастанием через глиальный рубец в области хирургического пересечения СМ. Ожидаемые морфологические изменения в СМ сопровождаются частичным снижением нейродефицита. Пересадка эмбриональной клеточной массы головного или спинного мозга от крыс или человека в разрыв спинного мозга новорожденным или взрослым крысам приводит в ранние сроки после травмы (до 7 сут.) к приживлению и спрутингу пересаженных нейронов, трансляции клеток нейроглии в каудальном направлении за пределы зоны повреждения [10, 11]. В зоне травмы СМ трансплантированная ткань активно интегрирует с тканью реципиента [12]. Это подтверждается на модели полной перерезки СМ у новорожденной крысы. Трансплантация эмбриональных клеток в зону перерезки СМ улучшает его функциональные характеристики по сравнению с контролем [13].

Несмотря на успехи клеточной трансплантологии при реконструкции СМ, использование дифференцированных в нейрональном направлении клеток недостаточно эффективно по причине их низкой массы, непродолжительной жизнеспособности, большой потери при трансляции с подложек в дислокацию травмы. Совершенно очевидно, что процесс инжиниринга поддерживается комплексом молекулярного микроокружения, создаваемого клетками СМ, в основе которого лежит взаимодействие нейротрофических факторов.

Предлагаемые в настоящей работе подходы к реконструкции СМ при экспериментальной

осложненной позвоночно-спинальной травме основаны на использовании современных биодеградируемых полисахаридных матриц, содержащих необходимое микроокружение, включая продукты роста и дифференцировки стволовых и нейрональных клеток, предшественники нейрональных клеток с целью восстановления моторной и сенсорной функций ЦНС. Имплантация такой матрицы может быть осуществлена открытым оперативным способом в диастаз СМ.

Цель исследования — получение клеточной белково-полисахаридной губчатой матрицы, содержащей нейрональное микроокружение для прямой трансплантации нейрональных предшественников стволовых клеток в модели спинальной травмы у крыс, анализ специфических молекулярных маркеров.

Задачи исследования:

1. Получить белково-полисахаридную матрицу с нейрональным микроокружением.
2. Провести культивирование и дифференцировку эмбриональных стволовых клеток крыс, а также иммуноцитохимический контроль дифференцировки.
3. Выполнить спинальную травму у крыс, прямую трансплантацию матриц в диастаз СМ с обеспечением послеоперационного ведения животных.
4. Осуществить динамический неврологический контроль животных в течение 4 недель.
5. Провести иммуноцитохимический и гистологический анализы СМ в зоне имплантации нейрональной матрицы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

1. Получение матрицы с нейрональным микроокружением. Для создания нейрональных матриц был использован базовый полиионный гелевый комплекс, состоящий из наномикроструктурированного аскорбата хитозана с молекулярной массой 695 kDa и степенью деацетилирования 98% при содержании на 1 г сухого хитозана аскорбиновой кислоты 1,8 г, включающий солевые анионные формы хондроитинсерной (200 мг/г), гиалуриновой (100 мг/г) кислот и гепарина (5 мг/г), сывороточного фактора роста крупного рогатого скота «адгелон» (110 мкг/г).

В экспериментах по получению кондиционированной среды от стволовых эмбриональных нейрональных клеток мыши (клетки из головного мозга 17–20-дневных фетусов белых мышей

после его диспергирования и обработки 0,5 % раствором коллагеназы в течение 30 мин в среде ДМЕМ при 37 °С) для наращивания клеточной биомассы использовали среду ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 мкг/мл канамицина сульфата, 1 мМ L-глутамин, в которую дополнительно добавляли еще 4 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF), 1 мМ раствора незаменимых аминокислот (Sigma-Aldrich). Наращивание клеточной биомассы при 37 °С проводили во флаконах, покрытых 0,1 % раствором желатина. Сбор среды проводили ежедневно. После пересева с помощью 0,5 % раствора коллагеназы клеток на матрицы их культивировали в среде с добавлением агента нейрональной дифференцировки (N2-компонента) согласно инструкции производителя. Среду собирали, фильтровали через 0,22 мкм ацетат-целлюлозный фильтр, отделяя ее от клеток, и в дальнейшем использовали в качестве кондиционированной среды. В частности, кондиционированную среду добавляли в полиионный хитозановый гель.

В дальнейшем осуществляли ковалентное соединение полученной хитозановой полисахаридной гелевой конструкции с бычьим коллагеновым гелем в соотношении 1:3, лиофильное высушивание глубоко замороженных образцов в установке FC500. Далее продукт упаковывали и стерилизовали электронно-лучевым способом («Медицинская компания ООО «Коллахит» г. Железногорска Красноярского края, ген. директор предприятия А. Н. Сапожников).

Было предположено, что культивирование на коллаген-хитозановых матрицах ЭСК крысы при добавлении в полную питательную среду фактора N2 или B27 (нейрональная добавка), а также ретиноевой кислоты может приводить к их нейрональной дифференцировке.

2. Культивирование и дифференцировка эмбриональных стволовых клеток. Маркерный анализ. Суспензию клеток в среде со всеми компонентами осторожно сверху наслаивали на губчатые матрицы после их предварительной нейтрализации в стерильном бикарбонатном буфере и трехкратной отмытки фосфатным буфером Дульбекко (Биолот). Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) получали из бластоцист путем их вымывания из матки средой DMEM наркотизированного эфиром животного на 4–5-й день после копуляции. Получение внутренней клеточной массы (ВКМ) и дальнейшую экспансию колоний ЭСК проводили согласно протоколу [14, 15]. В экспериментах по культивированию

плюрипотентных клеток на раневых покрытиях первоначально для наращивания биомассы использовали основную среду коДМЕМ с добавлением 10 % SR (заменитель сыворотки), 100 мкг/мл канамицина сульфата, 1 мМ L-глутамин, 4 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF), 1 мМ раствора незаменимых аминокислот и ингибитора Rock киназы 5 нг/мл. Наращивание клеточной биомассы проводили во флаконах, покрытых 0,1 % раствором желатина. Смену среды проводили ежедневно. Состояние колоний оценивали визуально с помощью микроскопа AxioVert 200. Для оценки поддержания состояния плюрипотентности проводили иммуноцитохимический анализ экспрессии маркеров — oct4, TRA-1-60, SSEA4, cd30. Для дифференцировки эмбриональных клеток в нейрональном направлении их высевали во флаконы в среду со всеми добавками, кроме bFGF, с добавлением ретиноевой кислоты и N2 компонента.

Иммуноцитохимический контроль нейрональной дифференцировки стволовых клеток. Каждые три дня проводилась формальдегидная фиксация с последующей иммуноцитохимией клеток с помощью антител (все от Abcam, USA) против GFAP — глиального фибриллярного кислого белка (маркер астроцитов), нейрофиламента и нестина. Выявление маркеров осуществляли методом согласно инструкции производителя антител. Ядра клеток окрашивали DAPI (0,1 мкг/мл) 10 мин. Для получения изображений и анализа использовали флуоресцентный микроскоп «Olympus BX-51» и программные продукты «Applied Spectral Imaging» (USA). Для анализа каждого маркера эксперимент повторяли трижды, наращивая по три флакона, в каждом из которых случайным образом выделяли 6 зон для проведения иммуноцитохимии. Микроскопирование проводили по каждой зоне в 30 полях зрения.

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

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

- лиофилизированная коллаген-хитозановая матрица того же состава, содержащая предшественники нейрональных клеток, полученные при культивировании и дифференцировке ЭСК крысы.

Варианты пористых матриц-подложек предварительно перед посадкой на них ЭСК нареза-ли объемом 1 мм³ и в стерильных условиях рас-кладывали по лункам 96-луночного планшета без покрытия 0,1 % раствором желатина. Клетки снимали с культуральных флаконов 0,5 % раство-ром коллагеназы, затем трижды отмывали чи-стой средой от фермента и переносили в лунки с нарезанной матрицей в среде для ЭСК. Клет-ки культивировали не менее 3 сут. до появления нейрональных маркеров в гумидных условиях при 37°C и 6 % CO₂. Количество прикреплен-ных клеток оценивали путем диспергирования 5–6 кусочков матрицы в растворе фермента с по-следующим подсчетом клеток в камере Горяева. Каждый будущий нейроимплантат в процессе культивирования содержал порядка 50 тыс. ЭСК. Перед имплантацией кусочки глазным пинцетом осторожно переносили в микропробирки с пита-тельной средой DMEM/F12 и транспортирова-ли в операционную.

3. Экспериментальная спинальная трав-ма у крыс (разрыв спинного мозга). Премеди-кация: 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). 12 белым беспород-ным крысам-самкам массой 250 г с использова-нием операционного микроскопа моделировали спинальную травму на уровне IX–X грудных по-звонков с 50 % по объему боковым пересечением ствола спинного мозга после предварительной подготовки операционного поля и выполненной ламинэктомии. В образовавшийся дефект нерв-ной ткани размерами около 1–1,5 мм помещали нейрональный клеточно-матричный имплантат указанного состава. Костную рану закрывали по-лисахаридной гидрогелевой массой «Бол-хит», не содержащей животного коллагена. Рану заши-вали послойно с применением П-образных швов Vicril 4-0 и нитью Polyester 3-0. Кожные швы об-рабатывали спиртовым раствором йода.

Послеоперационный уход. В течение 3–5 дней после операции в качестве анальгетика животные получали Sol. Tramadol 2,5 мг 3 р/ день в/м. Швы снимали на 10-е сут. В ранний послеоперацион-ный период в первые 24 ч — допуск животных к воде. Кормление — на 2–3-и сут. после операции исключительно смесью «Полипротен-нефро»

(лечебное питание) в течение 1–4 нед. Крысы со-держались в отдельных клетках с двойным дном. Лекарственную поддержку осуществляли анти-биотиком широкого спектра действия, спазмолит-иками, сосудорасширяющими препаратами.

4. Динамический неврологический кон-троль животных. Для оценки неврологических нарушений и динамики восстановления приме-няли шкалу оценки выраженности неврологиче-ского дефицита (Neurological Severity Scores — NSS) в течение 1–4 нед послеоперационного периода [16].

5. Гистологический и иммуногистохими-ческий анализы срезов спинного мозга при прямой имплантации клеточных нейрональ-ных матриц в дислокацию спинальной трав-мы. Препараты спинного мозга получали путем тщательного и осторожного выделения ткани из позвоночного канала через 1–4 нед после опера-ции. Спинной мозг помещали на 24 ч в 10 % рас-твор фосфат-забуференного формалина. Далее осуществляли классическую гистологическую проводку ткани на оборудовании фирмы Leica (Германия), часть гистологических срезов окра-шивали гематоксилин-эозином с целью обзорно-го анализа ткани в месте дислокации имплантата и в его непосредственном окружении. При об-зорной микроскопии гистологических срезов (продольных, косых, поперечных) оценивалась степень глиальной реакции в зоне травмы, окру-жающей ткани, состояние нейронов серого ве-щества спинного мозга. Оценивалось состояние белого и серого вещества спинного мозга в 5 по-лях зрения каждого среза. Подсчитывалось коли-чество клеток макроглии (астроциты, олигоден-дроциты), микроглии (макрофаги) и количество клеток нейронального ряда.

Часть гистологических срезов подвергали им-муногистохимической обработке на предмет вы-явления состояния имплантированной клеточ-ной 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 мар-керов (оценка способности дифференцироваться у трансплантированных клеток). Часть препара-тов спинного мозга ресуспендировали и исполь-зовали для выделения клеточной массы. Клетки отмывали от фиксатора и к суспензии клеток добавляли 0,1 % раствор Тритона X100 для пер-мобилизации мембран. Затем отмывали от Три-тона 0,1 % 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 (Abscam, USA) в разведении 1:100, смесь инкубировали 1 час, затем снова отмывали, после чего добавляли раствор вторичных антител кролика с красной флуоресцентной меткой. Не связавшиеся молекулы метки отмывали трижды на PBS и оценивали флуоресценцию на проточном цитометре Guava EasyCyte Mini (USA). Детекция по двум спектрам — зеленый (оценка наличия клеток с GFP), красный (наличие экспрессии нейрофиламента).

Часть выделенной клеточной массы спинного мозга подвергали формальдегидной фиксации с последующей иммуноцитохимией клеток с помощью антител (все от Abscam, 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 флуоресцентный 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 на этих же препаратах проводили поиск GFP-меченных клеток. Таким образом, проводили трехцветный флуоресцентный анализ: детекция зеленого свечения — GFP, красного свечения — маркера и синего свечения — ядер клеток.

Наличие прижившихся после трансплантации клеток оценивали с помощью проточной флуориметрии в препаратах на 3-й и 4-й нед. после имплантации. Образцы спинного мозга диспергировали в 0,5 % растворе коллагеназы на PBS в течение 15–30 мин при 37°C, фильтровали через нейлоновый фильтр, далее фиксировали 1 % раствором формалина на PBS и после отмывки окрашивали DAPI, производили оценку количества клеток, несущих синюю и зеленую (GFP) метки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поддержание плюрипотентности ЭСК и нейрональная дифференцировка. Ранее было показано, что культивирование ЭСК на полученных подложках может поддерживать в течение 7 сут. нормальное морфологическое состояние колоний плюрипотентных клеток крыс, характерное и для ЭСК человека. Иммуноцитохимическое исследование маркеров плюрипотентности показало в ЭСК, культивируемых на матрице, что клетки экспрессируют ядерные белки oct-4, TRA1-60, cd30 и антиген SSEA4 [17]. Добавление в базовый полиионный коллаген-хитозановый комплекс кондиционированной среды от эмбриональных нейрональных клеток мышей, а также компонента N2 и ретиноевой кислоты

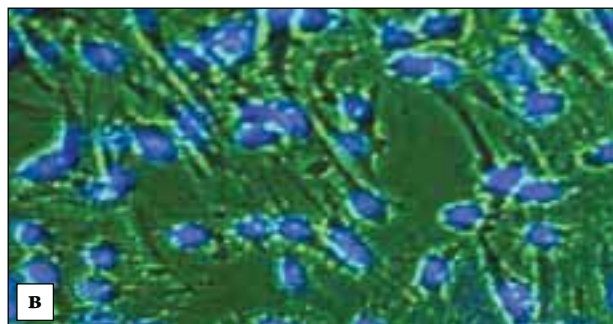
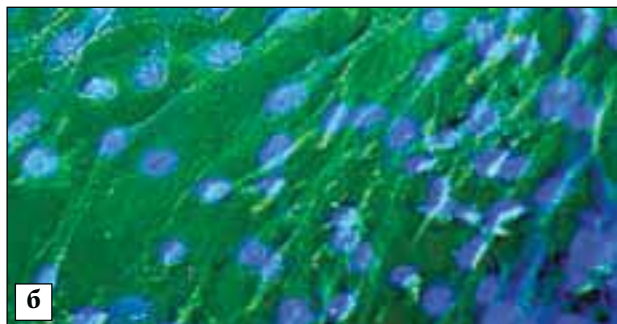
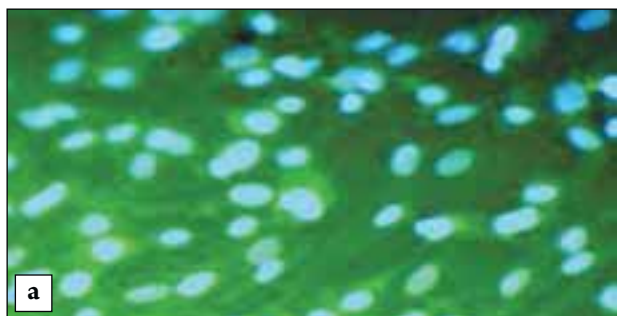


Рис. 1. Динамика экспрессии нейрофиламента на 1-е, 7-е и 14-е сут в клетках, культивируемых на коллаген-хитозановом комплексе в присутствии кондиционированной среды или при добавлении N2 комплекса (а, б, в)

приводило к нейрональной дифференцировке ЭСК крысы. Анализ экспрессии одного из нейрональных маркеров — нейрофиламента — показал, что на первые сут отсутствуют сигналы флуоресценции по указанному маркеру (рис. 1). На 5-е сут. при культивировании ЭСК в кондиционированной среде от эмбриональных нейрональных клеток обнаруживается экспрессия нейрофиламента, а на 7-е сут. — и в клетках, культивируемых в среде с добавлением N2-компонента. Аналогичная картина наблюдалась и в случае определения маркеров GFAP и нестина в сроки 7 и 14 сут. (рис. 2).

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 нед. имелось стойкое выпадение определенных сенсорных и моторных зон иннервации в области нижних конечностей, таза, нижней половины туловища. Модель позволяет технически осуществлять имплантацию коллаген-хитозановых матриц в область разрыва спинного мозга, создает возможность надежно выживать 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 располагалась на высоте 120–130 см над полом, что создавало у крыс мотивацию для ее преодоления. Крысы с повреждением спинного мозга при продвижении вперед начинали оступаться (наступать тазовыми конечностями мимо дорожки). В зависимости от степени тяжести травмы спинного мозга или степени восстановления в целом и степени нарушения проприорецепции в частности, крысы могли безошибочно проходить по дорожке различное расстояние. Интактные

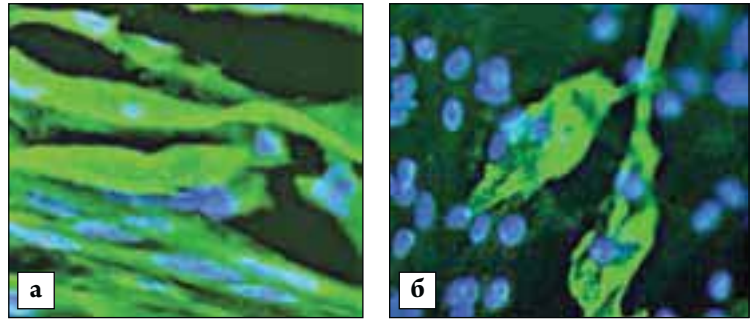


Рис. 2. Иммуноцитохимия ЭСК, культивируемых в кондиционированной эмбриональными нейрональными клетками среде или в среде с добавлением N2 компонента (а, б). Клетки фиксированы 1 % формальдегидом в фосфатном буфере, обработаны антителами против нестина (а), глиального фибриллярного кислого белка (б) с последующим мечением вторичными антителами и детекцией флуоресценции

крысы преодолевали дорожку полностью. Результаты анализа показали, что как в присутствии 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. 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.

Результаты детекции флуоресценции в образцах спинного мозга методом проточной цитометрии в сроки 1–2 нед. Анализ проточной цитометрии показал, что прямая трансплантация предшественников нейрональных клеток, полученных путем культивирования и создания нейронального микроокружения, сохраняет предшественники нейронов жизнеспособными, которые пролиферируют в течение 2-х нед. Относительное количество клеток, экспрессирующих фактор GFP, на протяжении 2-х нед. не изменяется и составляет около 34 %. В имплантированной матрице с ЭСК с увеличением длительности срока имплантации отмечалось более выраженное рассасывание ее волокон. К 28-м сут. большая часть стволовых клеток мигрировала на

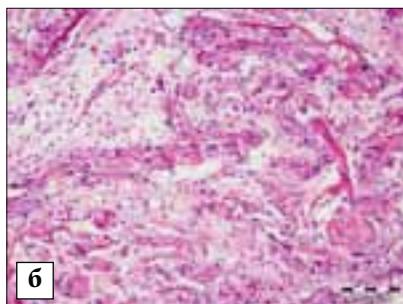
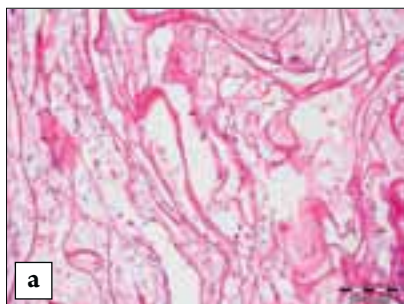


Рис. 3. Имплантированная матрица в зону спинальной травмы (14-е сутки): а — отсутствие ЭСК; б — наличие ЭСК

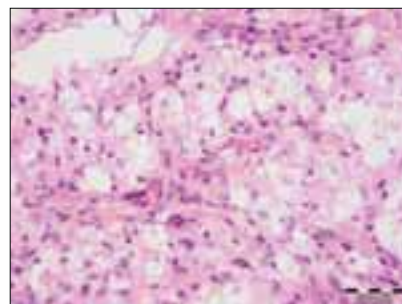


Рис. 4. Предшественники нейрональных клеток в зоне имплантации матрицы с ЭСК на 28-е сутки

периферию матрицы, ближе к нервной ткани. Анализ препаратов показал, что клетки в матрицах не только выживают, а, заполняя всю ее структуру, мигрируют по направлению к нервной ткани. Более того, уменьшение количества волокон биополимера свидетельствует о высокой метаболической активности клеток в зоне репарации (рис. 3). Вокруг зоны травмы в обоих случаях (при наличии и отсутствии ЭСК в матрице) выявлено большое количество макрофагов, цитоплазма которых заполнена фагоцитированным детритом. Количество клеток микроглии увеличивалось на 7–14-е сут., на 21–28-е сут. их число уменьшалось. При имплантации матрицы с ЭСК отмечалось увеличение всех клеток микроглии (астроциты, олигодендроциты). При использовании матрицы без ЭСК наблюдалось увеличение клеток олигодендроглии и уменьшение клеток астроцитарной глии. Количество нейронов в сером веществе спинного мозга при имплантации матрицы с ЭСК сохранялось примерно на одном уровне, с небольшим пиком на 2–3 нед. Кроме того, на 28-е сут вокруг зоны имплантации матрицы с ЭСК отмечено появление большого количества малодифференцированных клеток (рис. 4). В контроле при отсутствии в матрице ЭСК количество нейронов с течением времени уменьшалось. Таким образом, результаты

исследований показали признаки восстановления структуры поврежденного спинного мозга. Трансплантация клеток на матрице приводит к более полноценному и быстрому восстановлению гистологической целостности ткани после повреждения.

Иммуногистохимический анализ срезов спинного мозга. 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 течение 1–4 нед. Вероятно, ключевое влияние имеет 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 имелись нейрофиламенты и енолаза в клеточных тяжах (рис. 5), образование синапсов и маркеров к олигодендроцитам с формированием характерных морфологических структур (рис. 6).

Анализ морфологии спинного мозга крыс показывает, что технология имплантации матриц в спинной мозг и их состав обеспечивают

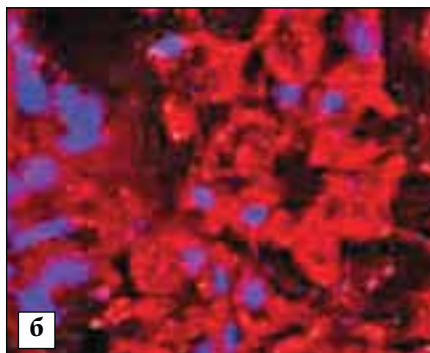
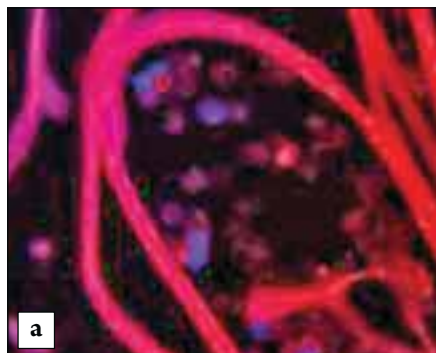


Рис. 5. а — экспрессия нейрофиламента, 2 недели, опыт; б — экспрессия енолазы, 2 недели, опыт

стабильность губчатой конструкции в течение 4 нед., жизнеспособность пересаженных предшественников нейрональных и олигодендритных клеток, отсутствие выраженной воспалительной реакции в месте имплантации, формирование межсинаптических соединений при межклеточном контакте. Пересаженная клеточная трехмерная конструкция способна создавать условия для дифференцировки трансплантированных на матрице ЭСК в нейрональном и глиальном направлениях. Такая картина подтверждает субстратную реконструкцию спинного мозга в месте разрыва в виде вновь образованной нервной ткани.

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

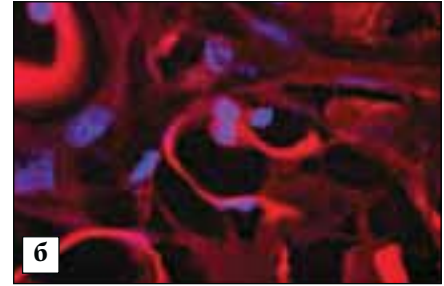
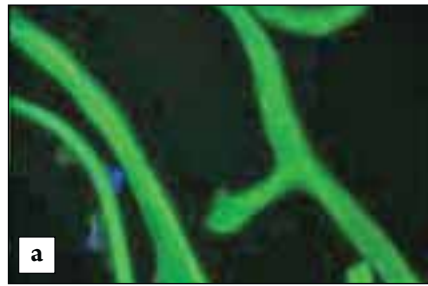


Рис. 6. Иммуногистохимический анализ образцов спинного мозга зоны имплантации: а — наличие синапсов на аксональных окончаниях пересаженных клеток, экспрессия GFP, опыт; б — экспрессия олигодендроцитов (первичные антитела — против олигодендроцитов, вторичные антитела — красные, синие ядра, окрашенные DAPI). Увеличение 12×60, продольный срез

с целью восстановления функций поврежденного спинного мозга при условии культивирования клеточной массы ЭСК 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 ГБОУ 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 № 6746 р/9167 от 10.04.2009 г. и проект № 8775 р/13993 от 11.01.2011 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kakulas B.A. Neuropathology: the foundation for new treatments in spinal cord injury // Spinal Cord. — 2004. — Vol. 42. — № 10. — P. 549–563.
2. Young W. Bases for Hope in Spinal Cord Injury. — URL: <http://sci.rutgers.edu>.
3. Tsai E. C., Tator C. H. Neuroprotection and regeneration strategies for spinal cord repair // Curr Pharm Des. — 2005. — Vol. 11. — № 10. — P. 1211–1222.
4. Tator C. H. Strategies for recovery and regeneration after brain and spinal cord injury // Inj. Prev. — 2002. — Vol. 8. — P. 33–36.
5. Xu X. M., Chen A., Guenard V. et al. Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord // J. Neurocytol. — 1997. — Vol. 26. — P. 16.
6. Weider N., Blesch A., Grill R. J., Tuszynski M. H. Nerve growth factor-hypersecreting Schwann cell grafts augment and guide spinal cord axonal growth and remyelinate central nervous system axons in a phenotypically appropriate manner that correlates with expression of L1 // J. Comp. Neurol. 1999. — Vol. 413. — P. 449–506.
7. Menei P., Montero-Menei C., Whittemore S. R. et al. Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord // Eur. J. Neurosci. — 1998. — Vol. 10. — P. 607–621.
8. Sayers S. T., Khan N., Ahmed Y. et al. Preparation of brain-derived neurotrophic factor- and neurotrophin-3-secreting Schwann cells by infection with a retroviral vector // J. Mol. Neurosci. — 1998. — Vol. 10. — P. 143–160.
9. McDonald J. W., Liu X. Z., Qu Y. et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate, and promote recovery in injured rat spinal cord // Nat. Med. — 2000. — Vol. 5. — P. 1410–1412.
10. Diener P. S., Bregman B. S. Fetal spinal cord transplants support the development of target reaching and coordinated postural adjustments after neonatal cervical spinal cord injury // J. Neurosci. — 1998. — Vol. 18. — P. 763–776.

11. Das G. D. Neural transplantation in the spinal cord of adult rats. Conditions, survival, cytology and connectivity of the transplants // J. Neurol. Sci. — 1983. — Vol. 62. — P. 191–210.
12. Bernstein J. J., Underberger D., Hoovler D. W. Fetal CNS transplants into adult spinal cord: techniques, initial effects and caveats // Cent. Nerv. Syst. Trauma. — 1984. — Vol. 1. — P. 39–46.
13. Theele D. P., Schrimsher G. W., Reier P. J. Comparison of the growth and fate of fetal spinal iso- and allografts in the adult rat injured spinal cord // Exp. Neurol. — 1996. — Vol. 142. — P. 128–143.
14. Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // Science. — 1998. — Vol. 282. — № 5391. — P. 1145–1147.
15. Hee Sun Kima, Sun Kyung Oha, Yong Bin Parkb et al. Methods for Derivation of Human Embryonic Stem Cells // Stem Cells. — 2005. — Vol. 23. — № 9. — P. 1228–1233.
16. Салмина А. Б., Шнайдер Н. А., Михуткина С. В. и др. Изменение активности АДФ-рибозилциклазы в клетках нервной системы коррелирует с развитием постишемической когнитивной дисфункции // Международный неврологический журнал. — 2007. — Т. 1. — № 11.
17. Еремеев А. В., Светлаков А. В., Большаков И. Н. и др. Функции культивируемых эмбриональных клеток на коллаген-хитозановой матрице // Ж. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2009. — Т. IV. — № 2. — С. 55–62.

Поступила в редакцию 20.12.2011

Утверждена к печати 09.02.2012

Авторы:

Большаков И. Н. — д-р мед. наук, профессор кафедры оперативной хирургии с топографической анатомией ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития РФ, г. Красноярск.

Еремеев А. В. — канд. биол. наук, зав. лабораторией клеточных технологий ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития РФ, ст. науч. сотр. Красноярского центра репродуктивной медицины, научный сотрудник лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН, Академгородок г. Красноярск.

Светлаков А. В. — канд. биол. наук, генеральный директор Красноярского центра репродуктивной медицины, г. Красноярск.

Шеина Ю. И. — аспирант Института общей генетики им. Вавилова РАН, г. Москва, лаборатория генетических основ клеточных технологий, эмбриолог Красноярского центра репродуктивной медицины, препарататор лаборатории клеточных технологий ГОУ ВПО КрасГМУ г. Красноярск.

Рендашкин И. В. — лаборант лаборатории клеточных технологий ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития РФ, г. Красноярск.

Полстяной А. М. — лаборант лаборатории клеточных технологий ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития РФ, г. Красноярск.

Кривопапов В. А. — клинический интерн ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития РФ, г. Красноярск.

Каптюк Г. И. — студент лечебного факультета ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития РФ, г. Красноярск.

Карапетын А. М. — студент лечебного факультета ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития РФ, г. Красноярск.

Игнатов А. В. — студент лечебного факультета ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития РФ, г. Красноярск.

Медведева Н. Н. — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой анатомии и гистологии человека ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития России, г. Красноярск.

Жуков Е. А. — канд. мед. наук, доцент кафедры анатомии и гистологии человека ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития России, г. Красноярск.

Контакты:

Большаков Игорь Николаевич

тел. 8-913-523-34-35

e-mail: bol.bol@mail.ru