

© Е. С. Петрова, Е. Н. Исаева и Д. Э. Коржевский, 2013
УДК 611.013.9:616.833.58-003.99:599.323.4

Е. С. Петрова, Е. Н. Исаева и Д. Э. Коржевский

РАЗВИТИЕ ДИССОЦИИРОВАННЫХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ ЗАКЛАДОК ЦНС КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ПЕРЕСАДКИ В ПОВРЕЖДЕННЫЙ НЕРВ

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (руков. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, лаборатория иммунофармакологии (руков. — канд. мед. наук А. В. Петров), Научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

Цель настоящей работы — выяснение возможности приживания и изучение дифференцировки диссоциированных клеток эмбриональных закладок спинного мозга и неокортекса крыс линии Вистар, после их пересадки в седалищный нерв взрослых животных. Суспензию клеток, полученную в результате диссоциации фрагментов шейного отдела спинного мозга и переднего мозгового пузыря плодов крыс 15 сут развития, вводили в проксимальный сегмент предварительно поврежденного седалищного нерва. С помощью иммуногистохимического маркера нейральных стволовых/прогениторных клеток (Msi-1) пересаженные клетки были идентифицированы в нервных стволах через 1 сут после операции. Через 21 сут часть из них дифференцировалась в NeuN-иммунопозитивные нейроны, однако число их было невелико. Большинство клеток в трансплантатах неокортекса, в отличие от трансплантатов спинного мозга, через 21 сут после операции представляли собой эпендимоциты.

Ключевые слова: нерв, регенерация, нейральные стволовые/прогениторные клетки, эпендимоциты

Актуальность проблемы восстановления поврежденных нервов обусловлена распространенностью травм нервных стволов, неудовлетворительными результатами традиционных способов лечения и недостатком фундаментальных знаний о механизмах регенерации периферических нервных волокон, роли микроокружения и трофических факторов в этом процессе. В настоящее время основными наиболее перспективными способами ускорения восстановления нервных проводников являются использование кондуитов из биodeградируемых материалов, соединяющих концы поврежденного нерва [6, 8, 12], и применение методов клеточной терапии. В качестве вариантов клеточной терапии используются трансплантация мультипотентных стромальных клеток костного мозга и жировой ткани, нейральных стволовых/прогениторных клеток (НСПК), эмбриональных стволовых клеток и др. [3, 6, 14]. Стволовые клетки рассматриваются как источник трофических факторов и цитокинов, способствующих росту регенерирующих аксонов [1, 14, 15]. Однако механизм влияния трансплантируемых стволовых клеток на регенерацию нервных проводников, а также возможности их дифференци-

ровки в условиях атипичного микроокружения изучены недостаточно.

Цель настоящего исследования — выяснить возможность приживания и изучить дифференцировку диссоциированных клеток эмбриональных закладок спинного мозга и стенки переднего мозгового пузыря крыс после их пересадки в поврежденный нерв взрослых животных.

Материал и методы. Исследование проведено на крысах линии Вистар (n=30). Из них — 6 самок, у которых на 15-е сутки беременности брали плоды с целью получения исходного материала для трансплантации, и 24 самца, которые служили реципиентами. Содержание животных и все эксперименты осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). У плодов крыс выделяли фрагменты закладок шейного отдела спинного мозга и дорсолатеральной стенки переднего мозгового пузыря, содержащие НСПК и помещали в культуральную среду 199 (Биолот, Россия) с добавлением 0,2% раствора химопсина (Самсон-Мед, Россия) на 10 мин (37 °C). Затем фрагменты закладок пипетировали, полученную взвесь, содержащую отдельные клетки и небольшие клеточные агрегаты, дважды отмывали средой без химопсина, центрифугируя в течение 15 мин (200 g), используя центрифугу CM-64 (ELMI, Эстония). Осадок ресуспендировали в 1 мл свежей среды, и проводили тест на жизнеспособность клеток с помощью

Сведения об авторах:

Петрова Елена Сергеевна (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), *Коржевский Дмитрий Эдуардович* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

Исаева Елена Николаевна, лаборатория иммунофармакологии, Научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, 197110, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7

0,2% раствора трипанового синего и подсчета клеток в камере Горяева. Из части полученной взвеси делали мазки, которые фиксировали в 96 ° спирте в течение 40 мин.

Для трансплантации использовали суспензию клеток, если жизнеспособность последних была не менее 85%. 5 мкл клеток взвеси с количеством $3\text{--}7 \times 10^4$ вводили в проксимальный конец предварительно поврежденного седалищного нерва взрослых животных. Нерв повреждали путем наложения лигатуры на 40 с. Животных содержали в обычных условиях вивария и умерщвляли парами этилового эфира через 1 и 21 сут. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, обезвоживали и заливали в парафин. Иммуногистохимические реакции проводили на парафиновых срезах толщиной 5 мкм. Выявляли следующие антигены: белок Musashi-1 (Msi-1) — маркер НСПК, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) — маркер астроцитов, виментин — белок, характерный для радиальных глиоцитов и эпендимоцитов крыс [2], ядерный белок нейронов NeuN. Для выявления белка Msi-1 использовали поликлональные кроличьи антитела (Abcam, Великобритания); для GFAP — поликлональные кроличьи антитела (Dako, Дания); для виментина — моноклональные мышьиные антитела (клон V-9, Dako, Дания); для NeuN — моноклональные мышьиные антитела (клон A60; Chemicon, США). В качестве вторичных реагентов для Msi-1 и GFAP использовали реактивы из набора Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/Dab (Bio Genex, США); для NeuN и виментина — реактивы из набора EnVision+System Labeled Polymer-HRP Anti-Mouse (Dako, Дания).

Результаты исследования. Иммуногистохимическое исследование, проведенное на гистологических срезах спинного мозга и неокортекса плодов крысы 15 сут развития, показало, что значительная часть клеток исходного материала являются Msi-1-содержащими НСПК (рис. 1, а, б).

В спинном мозгу они располагаются вокруг центрального канала в эпендимной и субэпендимной зоне. В области презумптивных передних рогов Msi-1-иммунопозитивные клетки не выявляются, поскольку здесь в этот срок развития присутствуют более дифференцированные клеточные элементы: нейробласты и молодые нейроны. В дорсолатеральной стенке переднего мозгового пузыря большинство клеток оказались Msi-1-иммунопозитивными. Тест на жизнеспособность, который был проведен после диссоциации эмбриональных закладок, показал, что не менее 85% клеток выживают. С помощью иммуногистохимического исследования мазков, приготовленных из полученной для трансплантации взвеси клеток, выявлено, что большинство составляющих ее клеток Msi-1-иммунопозитивны (рис. 2, а).

Через 1 сут после пересадки трансплантаты легко определяются в центре нервных стволов в виде небольших скоплений Msi-1-иммунопозитивных клеток (см. рис. 2, б). Следует отметить, что реакция на белок Msi-1 обладает высокой специфичностью: в толще поврежден-

ного нерва другие клеточные элементы не давали иммуногистохимической реакции. Пересаженные клетки в этот срок морфологически сходны с НСПК исходного материала. Они имеют круглую или овальную форму и достигают размеров 6–8 мкм.

Через 21 сут после операции трансплантаты разных закладок ЦНС выглядят по-разному. Определить клетки спинного мозга, пересаженные в эндоневрии нервных стволов реципиентов, обычными гистологическими методами весьма затруднительно. Некоторые отдельные дифференцирующиеся нейроны встречаются между нервными волокнами реципиента, однако лишь иммуногистохимическое исследование позволяет выявить одиночные NeuN-содержащие нейроны (рис. 3). Порой они располагаются небольшими группами из 2–3 клеток.

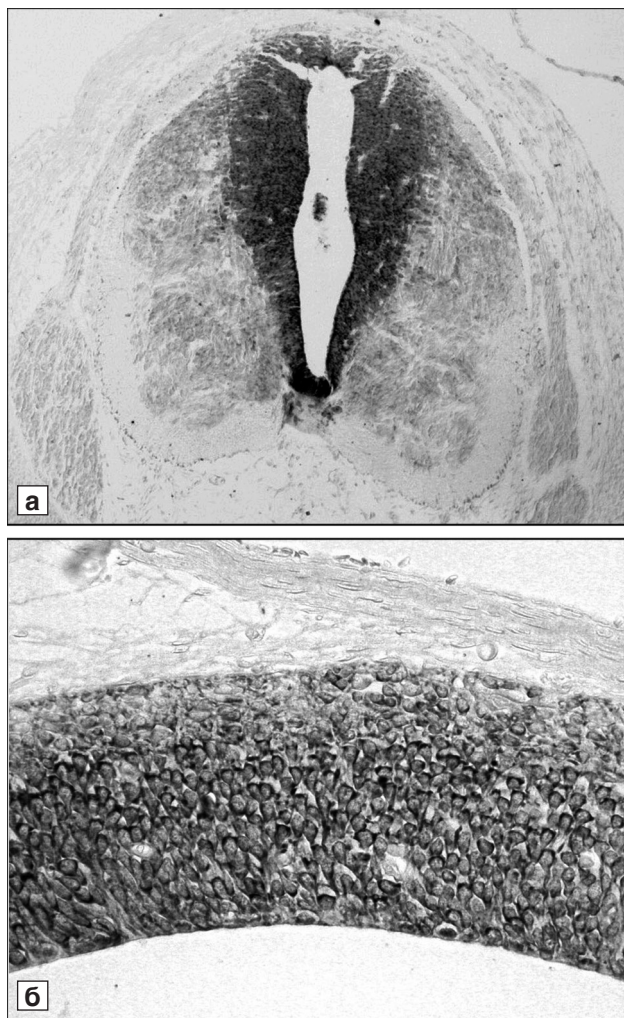


Рис. 1. Нейральные стволовые/прогениторные клетки в спинном мозгу (а) и дорсолатеральной стенке переднего мозгового пузыря (б) крыс 15 сут пренатального развития.

Иммуногистохимическая реакция на Msi-1. Ув.: а — 100; б — 400

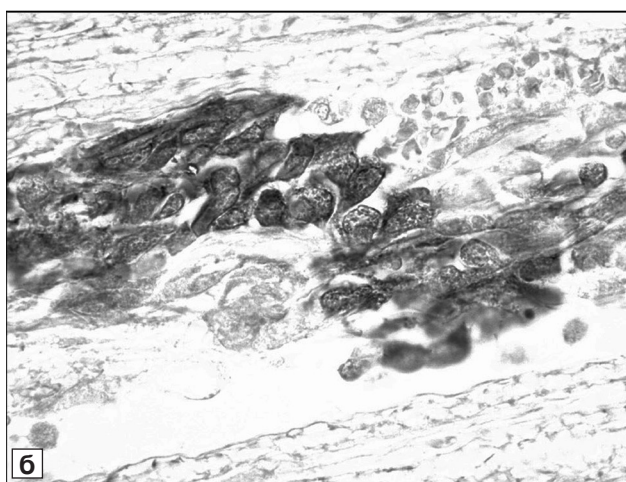
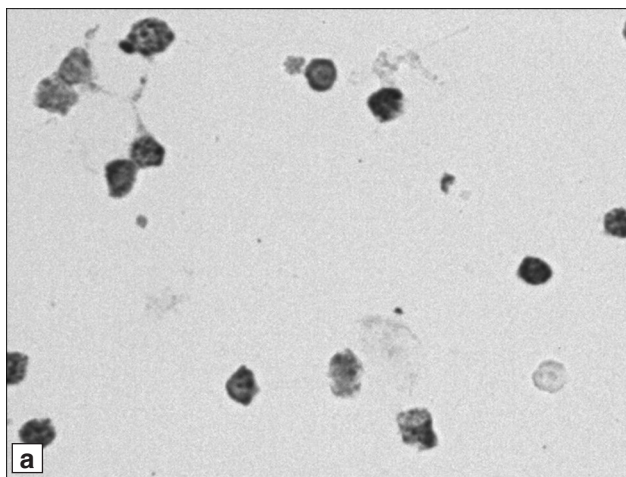


Рис. 2. Нейральные стволовые/прогениторные клетки спинного мозга плода крысы 15 сут развития на мазке (а) и в эндоневрии поврежденного седалищного нерва через 1 сут (б) после операции.

Иммуногистохимическая реакция на Msi-1. Ув. 1000

В трансплантатах неокортекса через 21 сут после операции также встречаются отдельные экспрессирующие NeuN нервные клетки. Однако большинство пересаженных клеток дифференцируются в эпендимоциты. Последние располагаются рядами вдоль нервных волокон реципиента и имеют характерные морфологические признаки. Это клетки кубической формы, экспрессирующие белки промежуточных филаментов — виментин и GFAP.

Обсуждение полученных данных. Выявление Msi-1-иммунопозитивных НСПК через 1 сут после трансплантации и дифференцированных нейронов, содержащих NeuN, через 21 сут позволило показать, что пересаженные клетки-предшественники реализуют свои гистобластические потенции и дифференцируются в нейрональном направлении после пересадки в эктопическую область. Число нейронов в таких трансплантатах

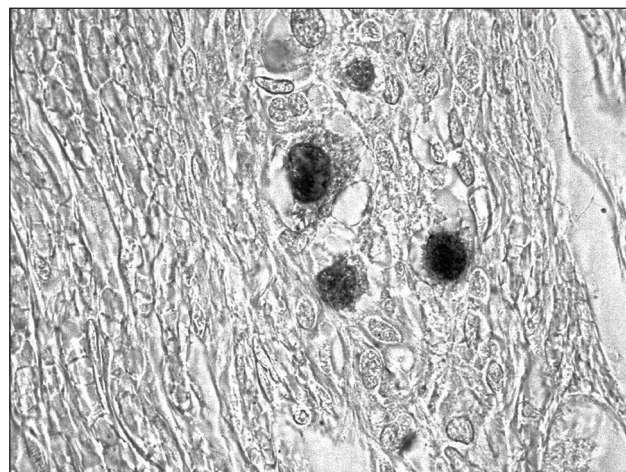


Рис. 3. Отдельные нейроны в толще нервного ствола через 21 сут после трансплантации диссоциированных клеток спинного мозга плода крысы 15 сут развития.

Иммуногистохимическая реакция на NeuN. Ув. 1000

невелико. Это отличает их от трансплантатов фрагментов эмбриональных закладок ЦНС, которые не подвергались диссоциации и были пересажены в нерв [4, 7]. Ранее было показано, что трансплантаты суспензий диссоциированных клеток, развивающихся в головном мозгу взрослых животных, имеют ряд особенностей по сравнению с трансплантатами фрагментов эмбриональных закладок [5, 9, 16]. Часть пересаженных диссоциированных клеток эмбрионального мозга погибают путем апоптоза в ранние сроки после пересадки [16]. В нашем случае процедуры диссоциации и трансплантация в нерв, вероятно, также приводят к гибели части недифференцированных нейрональных предшественников и дифференцирующихся нейронов, поэтому через 21 сут число NeuN-иммунопозитивных нейронов в трансплантатах и неокортекса, и спинного мозга невелико.

Известно, что НСПК в ЦНС в онтогенезе дают начало не только нервным, но и глиальным клеткам мозга, включая эпендимоциты. В настоящем исследовании пересаженные НСПК, несомненно, дифференцируются и в глиальном направлении. Однако для выяснения их способности давать начало олигодендроцитам, астроцитам, нейролеммоцитам необходимы специальные исследования с применением соответствующих иммуногистохимических маркеров. В трансплантатах неокортекса среди выявляющихся GFAP-иммунопозитивных клеток, вероятно, имеются астроциты. Однако они имеют нехарактерную для типичных астроцитов форму, что затрудняет их идентификацию. Кроме того, показано, что нейролеммоциты могут при определенных условиях экспрессировать GFAP [10].

Способность НСПК дифференцироваться в направлении эпендимы была продемонстрирована в экспериментах, выполненных *in vitro* [13]. По мнению авторов, это может происходить при двух условиях: если культивирование проводится на подложке из ламинина и если между НСПК сохраняются контакты [13]. В нашем случае подобные условия создаются при пересадке НСПК в периферический нерв. Как известно, в толще эндоневрия периферических нервов большое количество ламинина содержится в составе базальных мембран и, как отмечалось ранее, используемая для трансплантации взвесь клеток содержала небольшие клеточные агрегаты, т. е. некоторая часть клеток сохраняли межклеточные контакты. В литературе встречается мнение, что эпендимоциты сохраняют свойства стволовых клеток и являются мультипотентными [11]. Кроме того, они секретируют трофические и ростовые факторы, которые могут способствовать регенерации нерва.

В трансплантатах спинного мозга эпендима не была выявлена, несмотря на то, что процедуры подготовки материала для трансплантации были одинаковы для всех закладок. Формирование значительного числа эпендимоцитов в трансплантатах неокортекса, но не спинного мозга, отмечалось и ранее при пересадке недиссоциированных фрагментов эмбриональных закладок ЦНС [4, 7]. Вероятно, такое отличие связано с тем, что клеточный состав разных закладок неодинаков. Известно, что спинной мозг формируется в эмбриогенезе раньше мозговых пузырей и является более зрелой закладкой, чем закладка коры полушарий большого мозга соответствующего срока развития. Следовательно, в используемой в данном исследовании закладке спинного мозга плода 15 сут развития содержится больше коммитированных клеток-предшественников, чем мультипотентных нейральных стволовых клеток, а в закладке неокортекса — наоборот. В связи с этим в трансплантатах неокортекса большее число нейральных стволовых клеток под влиянием микроокружения эндоневрия способно дифференцироваться в эпендиму, чем в трансплантатах спинного мозга.

Таким образом, установлено, что трансплантаты, представленные диссоциированными клетками-предшественниками из эмбриональных закладок ЦНС (спинного мозга и неокортекса) крыс, выживают в течение 21 сут в условиях пересадки в поврежденный нерв взрослых животных. Пересаженные клетки сохраняют способность к дифференцировке в нейроны, однако этот процесс не имеет массового характера. В отличие от трансплантатов спинного мозга, большинство

клеток трансплантов неокортекса через 21 сут после операции дифференцируются в эпендимоциты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карагяур М. Н., Лопатина Т. В., Стамбольский Д. В. и др. Мезенхимальные стволовые клетки стимулируют восстановление периферического нерва благодаря секреции нейротрофических факторов. В кн.: Науч. труды Всерос. конф. «Регенеративная биология и медицина». М., Издат. дом «Нарконет», 2011, с. 78–79.
2. Коржевский Д. Э., Ленцман М. И., Кирик О. В. и Отеллин В. А. Виментин-иммунопозитивные клетки конечного мозга крысы после экспериментального ишемического инсульта. Морфология, 2007, т. 132, вып. 5, с. 23–27.
3. Петрова Е. С. Применение стволовых клеток для стимуляции регенерации поврежденного нерва. Цитология, 2012, т. 54, № 7, с. 525–540.
4. Петрова Е. С. и Отеллин В. А. Особенности развития гомо- и гетеротопических аллотрансплантатов эмбрионального неокортекса крыс. Цитология, 2000, т. 42, № 8, с. 750–757.
5. Сухинич К. К., Подгорный О. В. и Александрова М. А. Иммуногистохимический анализ развития суспензионных и тканевых нейротрансплантатов. Изв. РАН. Серия биол., 2011, № 6, с. 659–668.
6. Челышев Ю. А. Регенерация в нервной системе: Руководство по гистологии. СПб., СпецЛит, 2011, т. 1, с. 656–665.
7. Чумасов Е. И. и Петрова Е. С. Имплантация эмбриональных закладок неокортекса и спинного мозга в поврежденный периферический нерв взрослой крысы. Бюл. exper. биол., 1990, т. 108, № 8, с. 198–201.
8. Bellamkonda R. V. Peripheral nerve regeneration: an opinion on channels, scaffolds and anisotropy. Biomaterials, 2006, v. 27, № 19, p. 3515–3518.
9. Bystron I., Otellin V. A., Wierzb-Bobrowicz T. and Dymecki J. Development of human fetal substantia nigra grafts in the brain of non-immunosuppressed rats. Folia Neuropathol., 1997, v. 35, № 2, p. 87–93.
10. Cheng C. and Zochodne D. W. In vivo proliferation, migration and phenotypic changes of Schwann cells in the presence of myelinated fibers. Neuroscience, 2002, v. 115, № 1, p. 321–329.
11. Chojnacki A. K., Mak G. K. and Weiss S. Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? Nat. Rev. Neurosci., 2009, v. 10, № 4, p. 153–163.
12. Geuna S., Nicolino S., Raimondo S. et al. Nerve regeneration along bioengineered scaffolds. Microsurgery, 2007, v. 27, № 5, p. 429–438.
13. Mokry J. and Karbanová J. Foetal mouse neural stem cells give rise to ependymal cells in vitro. Folia Biol (Praha), 2006, v. 52, № 5, p. 149–155.
14. Walsh S. and Midha R. Use of stem cells to augment nerve injury repair. Neurosurgery, 2009, v. 65, № 4, p. 80–86.
15. Xiong G., Ozaki N. and Sugiura Y. Transplanted embryonic spinal tissue promotes severed sciatic nerve regeneration in rats. Arch. Histol. Cytol., 2009, v. 72, № 2, p. 127–138.
16. Zawada W. M., Zastrow D. J., Clarkson E. D. et al. Growth factors improve immediate survival of embryonic dopamine neurons

after transplantation into rats. Brain Res., 1998, v. 786, № 1–2, p. 96–103.

Поступила в редакцию 21.09.2012

DEVELOPMENT OF DISSOCIATED CELLS OF VARIOUS RAT CNS PRIMORDIA AFTER TRANSPLANTATION INTO THE DAMAGED NERVE

Ye. S. Petrova, Ye. N. Isayeva and D. E. Korzhevskiy

The purpose of this paper was to examine the possibilities of engraftment, and to study the differentiation of the dissociated cells from the embryonic primordia of the spinal cord and the neocortex of Wistar rats, after their transplantation into the sciatic nerve of adult animals. The cell suspension obtained as a result of a dissociation of fragments of the cervical spinal cord and the anterior cerebral vesicle from rat fetuses at day 15 of development, was injected into the proximal segment of a previously damaged sciatic nerve. Using the immunocytochemical marker

of neural stem/progenitor cells (Msi-1) the transplanted cells were identified in the nerve trunks after 1 day after the operation. After 21 day some of these cells underwent differentiation into NeuN-immunopositive neurons, however their number was small. Thus, dissociated precursor cells from embryonic rat spinal cord and neocortex survive for three weeks under conditions of transplantation into the damaged nerve and retain the ability to differentiate into neurons, but the number is small. Most of the cells in the neocortex transplants, unlike those from spinal cord transplants, within 21 days after the operation were represented by the ependymocytes.

Key words: *nerve, regeneration, neural stem/progenitor cells, ependymocytes*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical and Biological Agency of Russia, St. Petersburg