

*Е. С. Петрова<sup>1</sup>, Е. Н. Исаева<sup>2</sup>*

## ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛА РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ МИЕЛИНОВЫХ ВОЛОКОН В ПОВРЕЖДЕННОМ НЕРВЕ КРЫСЫ ПОСЛЕ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ ДИССОЦИИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ЗАКЛАДОК ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

<sup>1</sup> 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; <sup>2</sup> лаборатория иммунофармакологии (руков. — канд. мед. наук А. В. Петров), Научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

Исследование проведено на 6 самках и 36 самцах взрослых крыс линии Вистар с целью сравнения влияния диссоциированных клеток, полученных из разных эмбриональных закладок ЦНС, на рост регенерирующих нервных волокон поврежденного нерва реципиента. Седлищный нерв повреждали путем наложения лигатуры, после чего части животных в проксимальный отдел нерва вводили суспензию клеток, полученную в результате диссоциации фрагментов спинного мозга или переднего мозгового пузыря эмбрионов крыс 15 сут развития. Через 21 и 60 сут после операции проводили анализ поперечных полутонких срезов дистальных частей нервов. Установлено, что введение в поврежденный нерв диссоциированных клеток эмбриональных закладок спинного мозга, но не неокортекса, через 60 сут приводит к увеличению числа миелинованных нервных волокон у реципиента.

**Ключевые слова:** нерв, регенерация, нейральные стволовые/прогениторные клетки, эмбриональные закладки неокортекса, эмбриональные закладки спинного мозга

Поиск способов восстановления поврежденных периферических нервов является одной из актуальных нейробиологических и клинических проблем. В настоящее время для улучшения восстановления поврежденных нервных проводников активно ведутся экспериментальные разработки клеточных технологий с использованием стволовых клеток (СК) [9, 17]. Считается, что СК, выступая в качестве источника трофических и ростовых факторов, могут создавать благоприятное микроокружение для регенерирующих аксонов. В отдельных исследованиях продемонстрировано стимулирующее влияние на рост нервных волокон реципиента фрагментов эмбриональных закладок ЦНС, в частности спинного мозга [19]. Другие исследователи отмечают такой эффект только в случае использования диссоциированных клеток, полученных из этих закладок [6]. Ранее было показано, что полученные в результате диссоциации и пересаженные в поврежденный нерв клетки выживают в течение нескольких недель

после операции, и часть из них дифференцируются в нейроны, содержащие маркер зрелых нейронов, ядерный белок NeuN [7]. Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование влияния диссоциированных клеток, полученных из эмбриональных закладок неокортекса и спинного мозга, на рост регенерирующих нервных волокон поврежденного нерва реципиента.

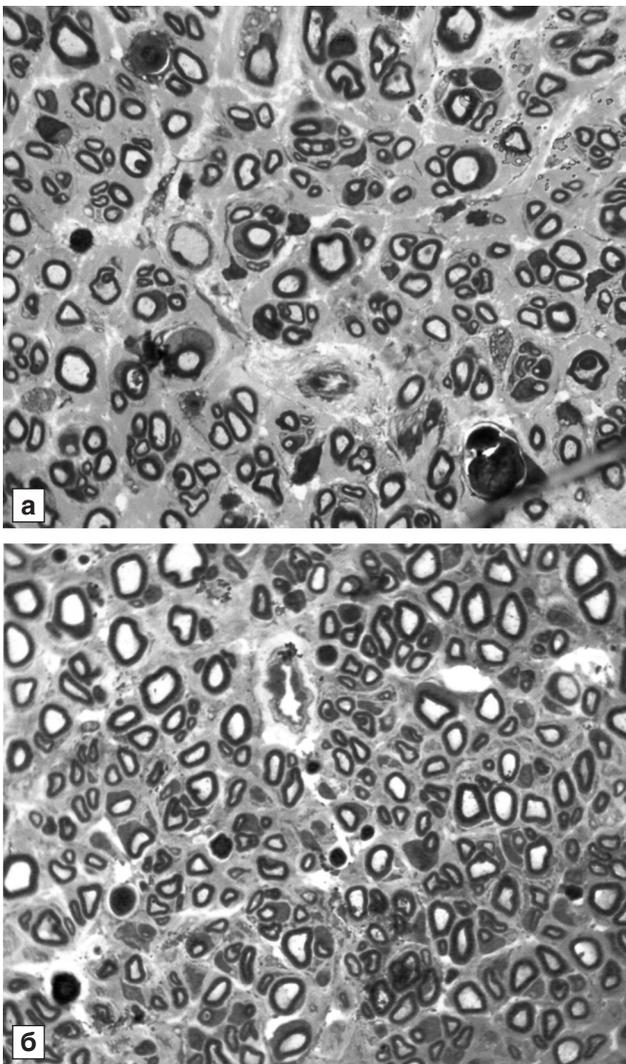
**Материал и методы.** В работе использованы крысы линии Вистар (6 самок и 36 самцов) массой 200–250 г. Содержание животных и все эксперименты осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). У эмбрионов крыс на 15-е сутки развития выделяли фрагменты дорсолатеральной стенки переднего мозгового пузыря и шейного отдела спинного мозга — закладок, в которых, как известно, содержатся нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК). Для получения суспензии НСПК выделенные эмбриональные закладки помещали в культуральную среду 199 (Биолот, Россия), содержащую 0,2% химопсина (Самсон-Мед, Россия), на 10 мин (37 °С), затем фрагменты закладок пипетировали, взвесь клеток

### Сведения об авторах:

*Петрова Елена Сергеевна* (e-mail: [lemmorphol@yandex.ru](mailto:lemmorphol@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. Акад. Павлова, 12;

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

дважды отмывали средой без химопсина, центрифугируя в течение 15 мин (200 g). Осадок ресуспендировали в 1 мл свежей среды [6, 7] и вводили субперинеурально в проксимальную часть поврежденного седалищного нерва. Нерв повреждали путем наложения лигатуры на 40 с по методу, предложенному М.Е. Мирошниковой и Е.И. Чумасовым [4]. Прооперированные животные были разделены на 6 экспериментальных групп (табл. 1). Выбор сроков исследования (21 и 60 сут) связан с особенностями дегенеративных и репаративных процессов, происходящих в периферических нервных проводниках после повреждения. В более ранние сроки после передавливания в дистальных отделах нервных стволов наблюдается валлеровская дегенерация (ВД). Характерные для нее процессы и образование продуктов распада миелина затрудняют количественную оценку тонких регенерирующих волокон [4, 5]. К 21-м и 60-м суткам продукты распада миелина удаляются макрофагами, и в дистальном отделе поврежденных нервов определяются уже миелиновые нервные волокна, что позволяет осуществлять их количественную оценку на светооптическом уровне (рисунок).



Миелиновые регенерирующие нервные волокна седалищного нерва крысы через 60 сут после наложения лигатуры и введения диссоциированных клеток переднего мозгового пузыря (а) и спинного мозга (б) 15-суточного эмбриона крысы.

Полутонкие срезы, окраска толуидиновым синим. Ув. 1000

Животных умерщвляли передозировкой паров этилового эфира, выделяли фрагменты дистального сегмента нерва на расстоянии 0,5 см от места наложения лигатуры и фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида, дофиксировали в растворе 2% четырехокси осмия, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации, пропиленоксиде и заливали в эпон. Изготавливали поперечные полутонкие срезы толщиной 1 мкм и окрашивали толуидиновым синим. Анализ числа миелиновых регенерирующих волокон на стандартной единице площади осуществляли, используя метод оценки эффективности регенерации нерва, описанный рядом авторов и выполняемый на полутонких срезах [1, 4, 5, 10]. Регенерирующие нервные волокна подсчитывали на цифровых изображениях, полученных при помощи микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica ICC 50 (Leica, Германия). Количественный анализ миелиновых нервных волокон проводили на 6 цифровых изображениях площадью 12 884,18 мкм<sup>2</sup> при ув. 1000. Для подсчета использовали программу ImageJ (НИН, США). О значимости различий судили по величине t-критерия и U-критерия и считали значимыми при P<0,05.

**Результаты исследования.** Изучение поперечных полутонких срезов дистального отдела поврежденных нервов крыс I экспериментальной группы (контроль) выявило структурные изменения, характерные для регенерирующего нерва. В этот срок в макрофагах еще можно видеть остатки продуктов распада миелина. Эпиневрив в

Таблица 1

## Описание экспериментов

Экспериментальные группы	Число животных	Срок наблюдений, сут
I, наложение лигатуры (контроль)	8	21
II, наложение лигатуры. Введение суспензии клеток, полученных после диссоциации эмбриональных закладок неокортекса	5	21
III, наложение лигатуры. Введение суспензии клеток, полученной из спинного мозга эмбриона	5	21
IV, наложение лигатуры (контроль)	8	60
V, наложение лигатуры; введение суспензии клеток, полученных после диссоциации эмбриональных закладок неокортекса	5	60
VI, наложение лигатуры; введение суспензии клеток, полученной из спинного мозга эмбриона	5	60

области повреждения утолщен, в нем наблюдается разрастание кровеносных сосудов. В нервном стволе определяются большое число регенерирующих миелиновых нервных волокон. Через 60 сут после наложения лигатуры (IV группа) плотность их расположения значимо возрастает (табл. 2).

Анализ нервных стволов у животных II и III экспериментальных групп показал, что по сравнению с контролем (наложением лигатуры) количество регенерирующих нервных волокон не изменено (см. табл. 2).

В экспериментальной группе VI в дистальном сегменте нерва у реципиента число нервных волокон по сравнению с контролем (наложение лигатуры) значимо возрастает, а в группе V этого не наблюдалось (см. табл. 2).

**Обсуждение полученных данных.** Проведенный анализ количества нервных волокон на единице площади нервного ствола в разные сроки после наложения лигатуры показал, что через 60 сут оно приблизительно в 2 раза выше, чем через 21 сут. Аналогичные результаты были получены в работах, выполненных ранее на сходной модели повреждения седалищного нерва крыс [4].

В настоящем исследовании показано, что под влиянием диссоциированных клеток, полученных из спинного мозга эмбриона и введенных в передавленный нерв, число регенерирующих миелиновых волокон в дистальной его части возрастает по сравнению с контролем. Сопоставляя полученные результаты с данными литературы, можно высказать три предположения о механизмах отмеченного влияния клеточной терапии на рост нервных волокон.

Первая гипотеза связана со способностью применяемых для трансплантации клеток-предшественников вырабатывать и секретировать ростовые и трофические факторы. Известно, что регенерация аксонов в поврежденных нервных

проводниках определяется их микроокружением [5, 14, 18]. Последнее зависит от функционирования эндогенных клеточных элементов нерва: макрофагов, клеток стенки кровеносных сосудов, клеток эндо-, пери- и эпинеуря и, главным образом, нейролеммоцитов (шванновских клеток). Рост регенерирующих нервных волокон находится в зависимости от концентрации трофических факторов, цитокинов и белков межклеточного вещества, секретируемых нейролеммоцитами [14, 18]. Внесение в место повреждения экзогенных клеточных элементов, обладающих высокой секреторной активностью, приводит к изменению микроокружения и может оказывать стимулирующее влияние на репаративные процессы. В частности, применение мезенхимных стволовых клеток (МСК) приводит к увеличению пролиферативной активности эндогенных нейролеммоцитов и повышению секреции ими биологически активных веществ (фактора роста нервов и др.) [14, 18]. НСПК, как и МСК, вырабатывают ряд ростовых факторов [13, 15, 16], которые могут создавать благоприятное микроокружение для роста аксонов и положительно влиять на функционирование собственных клеток нерва. Кроме того, некоторыми авторами отмечено, что применение клеточной терапии поврежденного нерва оказывает нейропротективное действие и препятствует ретроградной дегенерации нейронов соответствующих сегментов поясничного отдела спинного мозга и чувствительного ганглия [3, 11]. Вследствие увеличения числа сохранившихся нейронов количество волокон на периферии может возрастать.

Вторая гипотеза о механизмах влияния пересаженных клеток на регенерацию поврежденного нерва также связана с их трофическим воздействием на восстановление нервных волокон. Она основана на том факте, что при передавливании нервного ствола зажимом или с помощью наложе-

Таблица 2

**Изменение числа миелиновых нервных волокон в дистальном конце нерва у крысы после повреждения и введения клеток различных эмбриональных закладок ЦНС ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ , на 1 мм<sup>2</sup>)**

Экспериментальные группы	Срок наблюдения, сут	
	21	60
Наложение лигатуры (контроль)	6773±446	13621±797*
Наложение лигатуры, введение диссоциированных клеток эмбриональных закладок неокортекса	8869±671	13561±936
Наложение лигатуры, введение диссоциированных клеток спинного мозга эмбриона	8128±480	18162±2141**

\* Различия значимы: по сравнению с показателями при наложении лигатуры через 21 сут при P<0,05; \*\* различия значимы по сравнению с показателями при наложении лигатуры через 60 сут при P<0,05.

ния лигатуры есть вероятность, что не все нервные волокна дистального сегмента подвергаются ВД. Часть тонких волокон могут сохраняться на всем своем протяжении. Возможно, под влиянием клеточной терапии сохраняется большее количество волокон реципиента. Подтверждением этого предположения служат результаты работы М.Н.Карагяура [2], показавшего, что при клеточной терапии МСК, полученными из жировой ткани, число волокон, содержащих нейрофиламенты, возрастает по сравнению с таковым в контроле (повреждение нерва без применения МСК) уже через 7 сут после травмирования, т.е. клеточная терапия может способствовать повышению устойчивости к повреждению травмированных нервных волокон. Одним из факторов, стимулирующих восстановление волокон, является нейротрофический фактор головного мозга, вырабатываемый МСК [2].

Третья гипотеза базируется на наблюдении, которое было сделано при пересадке фрагментов эмбриональных закладок ЦНС в полностью изолированный от проксимальной части дистальный отдел перерезанного нерва, в место, где отсутствуют собственные нервные волокна реципиента [8]. Было показано, что только аксоны мотонейронов, развивающихся в тканевых трансплантатах спинного мозга, в отличие от нейронов неокортекса, способны выходить за пределы трансплантатов и расти на периферию. Имеются данные, что развивающиеся в нерве нейроны спинного мозга могут реиннервировать соответствующую мышцу и предотвращать ее атрофию [12]. Вероятно, в нашем случае часть подсчитанных аксонов в дистальной части нерва принадлежат пересаженным клеткам — дифференцирующимся в изученные сроки в мотонейроны. Однако ранее было показано, что число нейронов суспензионных трансплантатов, выживших через 3 нед после пересадки, невелико [7]. В связи с этим мы полагаем, что более вероятна первая гипотеза о механизмах влияния пересаженных клеток, которые стимулируют рост собственных регенерирующих волокон нерва реципиента.

Вопрос о том, почему стимулирующее влияние на регенерирующие волокна нерва оказывают суспензионные трансплантаты спинного мозга, но не неокортекса, спорен. Клеточный состав разных эмбриональных закладок неодинаков. Трансплантаты спинного мозга 15-суточных зародышей содержат более дифференцированные клетки-предшественники, чем трансплантаты переднего мозгового пузыря. Возможно, способ-

ности вырабатывать трофические и ростовые факторы у этих трансплантатов различны.

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что введение в поврежденный нерв диссоциированных клеток эмбриональных закладок спинного мозга, но не неокортекса, приводит к увеличению числа миелиновых регенерирующих волокон в дистальном конце нерва у реципиента. Выяснение возможных молекулярных и клеточных механизмов этого явления требует дальнейших исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Варсегова Т.Н. Возрастная динамика морфометрических показателей большеберцового нерва собак // Морфология. 2012. Т. 142, вып. 6. С. 36–40.
2. Карагяур М.Н. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на восстановление периферического нерва после травмы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2013.
3. Масгутов Р.Ф., Масгутова Г.А., Рагинов И.С. и др. Посттравматическое выживание чувствительных нейронов при аллотрансплантации в нерв эмбриональных тканей крысы // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2009. № 2. С. 103–104.
4. Мирошникова М.Е., Чумасов Е.И. Регенерация седалищного нерва крысы после его различных экспериментальных повреждений // Арх. анат. 1988. Т. 95, вып. 1. С. 30–35.
5. Ноздрачев А.Д., Чумасов Е.И. Периферическая нервная система. СПб.: Наука, 1999.
6. Петрова Е.С., Исаева Е.Н. Изучение влияния аллотрансплантатов эмбриональных закладок спинного мозга крыс на рост регенерирующих волокон нерва реципиента // Изв. РАН. Серия биол. 2014, № 6. С. 545–553.
7. Петрова Е.С., Исаева Е.Н., Коржевский Д.Э. Развитие диссоциированных клеток различных закладок ЦНС крысы в условиях пересадки в поврежденный нерв // Морфология. 2013. Т. 143, вып. 2. С. 30–34.
8. Петрова Е.С., Чумасов Е.И., Отеллин В.А. Морфологическая оценка способности роста аксонов ЦНС в периферическом нерве // Бюл. exper. биол. 1998. Т. 126, № 2. С. 233–236.
9. Челышев Ю.А. Регенерация в нервной системе. Руководство по гистологии. СПб.: СпецЛит, 2011. Т. 1. С. 656–665.
10. Щудло Н.А., Борисова И.В., Щудло М.М. Морфометрическая оценка эффективности посттравматической регенерации периферического нерва при однократном и повторном курсах электростимуляции // Морфология. 2012. Т. 142, вып. 6. С. 31–35.
11. Franchi S., Valsecchi A.E., Borsani E. et al. Intravenous neural stem cells abolish nociceptive hypersensitivity and trigger nerve regeneration in experimental neuropathy // Pain. 2012. Vol. 153, № 4. P. 850–861.
12. Grambles R.M., Almeida V.W., Thomas C.K. Embryonic neurons transplanted into the tibial nerve reinnervate muscle and reduce atrophy but NCAM expression persists // Neurol. Res. 2008. Vol. 30, № 2. P. 283–189.

13. Lu P., Jones L.L., Snyder E.Y., Tuszynski M.H. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury // *Exp. Neurol.* 2003. Vol. 181, № 2. P. 115–129.
14. Marconi S., Castiglione G., Turano E. et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush // *Tissue engineering.* 2012. Vol. 18, № 11–12. P. 1264–1272.
15. Ramasamy S., Narayanan G., Sankaran S. et al. Neural stem cell survival factors // *Arch. Biochem. Biophys.* 2013. Vol. 534, № 1–2. P. 71–87.
16. Sun C., Zhang H., Li J. et al. Modulation of the major histocompatibility complex by neural stem cell-derived neurotrophic factors used for regenerative therapy in a rat model of stroke // *J. Transl. Med.* 2010. Vol. 20, № 8. P. 77–87.
17. Walsh S., Midha R. Use of stem cells to augment nerve injury repair // *Neurosurgery.* 2009. Vol. 65, № 4. P. A80–86.
18. Wang J., Ding F., Gu Y. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo // *Brain Res.* 2009. Vol. 1262. P. 7–15.
19. Xiong G., Ozaki N., Sugiura Y. Transplanted embryonic spinal tissue promotes severed sciatic nerve regeneration in rats // *Arch. Histol. Cytol.* 2009. Vol. 72. P. 127–138.

Поступила в редакцию 20.11.2014

### **CHANGES IN THE NUMBER OF REGENERATING MYELINATED FIBERS IN INJURED NERVE OF THE RAT AFTER ALLOTRANSPLANTATION OF THE DISSOCIATED CELLS OF THE EMBRYONIC CNS ANLAGES**

*Ye.S.Petrova<sup>1</sup>, Ye.N.Isayeva<sup>2</sup>*

The study was conducted on 6 female and 36 male adult Wistar rats to compare the effects of dissociated cells derived from different embryonic CNS anlagen, on the growth of regenerating nerve fibers in the damaged nerve of the recipient. After the sciatic nerve was damaged by ligation, part of the animals received the injection into the proximal portion of the nerve with a suspension of the cells obtained by dissociation of the fragments of spinal cord or forebrain vesicle taken from rat embryos at Day 15 of development. The analysis of transverse semithin sections of the distal part of the nerves was performed 21 and 60 days after surgery. It was found that the number of regenerating myelinated nerve fibers was increased 60 days after the injection of dissociated embryonic spinal cord cells, but not the neocortical cells, into the damaged nerve of the recipient.

**Key words:** *nerve, regeneration, neural stem/progenitor cells, embryonic neocortex anlage, embryonic spinal cord anlage*

<sup>1</sup> 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, St.Petersburg; <sup>2</sup> Laboratory of Immunopharmacology, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St.Petersburg