СТИМУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТУБУЛЯЦИИ В СОЧЕТАНИИ С АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Р.Ф. Масгутов [1,2], Г.А. Масгутова [1], А.А. Рогожин [1,3], М.Н. Журавлева [1], Е.Ю. Закирова [1], М.В. Нигметзянова [1,4], Л.Р. Мухаметова [1], А.А. Шульман [2], Я.О. Мухамедшина [1,4], Г.Г. Яфарова [1], А.А. Ризванов [1]

[1] *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*
[2] *Республиканская клиническая больница, Казань, Россия*
[3] *Казанская государственная медицинская академия, Казань, Россия*
[4] *Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия*

Regeneration of rat sciatic nerve using tubulation and allogeneic transplantation of adipose-derived mesenchymal stromal cells

R.F. Masgutov [1,2], G.A. Masgutova [1], A.A. Rogojin [1,3], M.N. Zhuravleva [1], E.Y. Zakirova [1], M.V. Nigmetzyanova [1,4], L.R. Mukhametova [1], A.A. Shulman [2], Y.O. Mukhamedshina [1,4], G.G. Yafarova [1], A.A. Rizvanov [1]
[1] *Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia*
[2] *Republic Clinical Hospital, Kazan, Russia*
[3] *Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia*
[4] *Kazan State Medical University, Kazan, Russia*

На модели диастаза седалищного нерва крысы при использовании кондуита, биодеградируемой трубки NeuraGen (INTEGRA, США), в сочетании с аллотрансплантацией мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) из жировой ткани крысы, в составе фибринового клея Tissucol-Kit (Baxter AG, Австрия) исследована эффективность посттравматической регенерации периферического нерва. Показан нейропротекторный эффект клеточной терапии при использовании предложенной нами схемы эксперимента.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани, седалищный нерв крысы, травма периферического нерва, регенерация, NeuraGen, Tissucol-Kit.

The effectiveness of application of biodegradable conduit (NeuraGen; INTEGRA, USA) in combination with adipose derived multipotent mesenchymal stem cells and fibrin sealant (Tissucol-Kit; Baxter AG, Austria) on posttraumatic peripheral nerve regeneration was investigated using a rat model of sciatic nerve injury. We demonstrate that our proposed cell therapy confers a neuroprotective effect under our experimental design.

Keywords: Adipose derived mesenhymal stromal cells, rat's sciatic nerve, peripheral nerve injury, regeneration, NeuraGen, Tissucol-Kit.

Введение

Регенераторная способность периферических нервов предполагает возможность восстановления функции поврежденного нерва, однако результаты регенерации в условиях использования только собственного резерва организма нельзя назвать удовлетворительными [1, 2], в связи с чем актуальным представляется поиск способов индукции регенерации. В клинической практике и экспериментальных исследованиях, при наличии диастаза между концами нерва, активно исследуются и применяются два направления — соединение нервных проводников с помощью аутогенного нерва и применение кондуитов из различных материалов, обеспечивающих прорастание нервных волокон к периферическому отрезку нерва [3]. Для индукции регенерации поврежденных нервов применяют различные источники ростовых и трофических факторов, а также различные стволовые клетки [4] оказывающие нейропротекторный эффект [5, 6] и генная терапия [7].

В работе мы исследовали биодеградируемые трубки NeuraGen (INTEGRA, США), имеющие разрешение на клиническое использование в России. В качестве матрикса для клеточной трансплантации мы использовали фибриновый клей Tissucol-Kit (Baxter AG, Австрия) (тиссукол), используемый в клинике для интраоперационного склеивания концов нерва, который также имеет разрешение на его клиническое применение в России. Для стимулирования регенерации использовались аллогенные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) жировой ткани, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (eGFP).

Целью работы стало изучение биодеградируемых свойств трубки NeuraGen и эффективности ее применения при использовании мезенхимных стволовых клеток жировой ткани крысы в составе фибринового клея Tissucol-Kit на модели 5 мм диастаза седалищного нерва крысы.

Материал и методы

Животные получены из ООО «Питомник РАМТН» (Москва, Россия). Эксперимент проведен на белых крысах линии Wistar (n = 41), вес животных 200—300 г, возраст 4—6 мес., самцы. Животные содержались в стандартных условиях вивария с режимом день/ночь 12/12, со свободным доступом к воде и пище. Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в Казанском (Приволжском) федеральном университете, рекомендациям местного этического комитета и национальным законам.

Наркотизацию производили внутрибрюшинным введением раствора хлоралгидрата (400 мг/кг в 6,4% растворе NaCl).

e-mail: galina2526@gmail.com

МСК получали из жировой ткани здоровых крыс линии Wistar по стандартной методике, методом инкубации с коллагеназой краба (Биолот, Россия) [8] и трансдуцировали лентивирусом, кодирующим ген eGFP (LV-eGFP) [9]. Для трансплантации использовали только клетки, экспрессирующие EGFP, которые получали методом сортинга на проточном цитофлуориметре FACS Aria III (BD, США). Для оценки миграции клеток в раннем послеоперационном периоде дополнительно было прооперировано 6 животных, трансплантированные клетки которых метили с помощью мембранного витального красителя Vybrant® Multicolor Cell-Labeling Kit (Thermofisher), согласно инструкции производителя.

Животным в левом седалищном нерве формировали 5 мм диастаз, концы нерва подшивали к биодеградируемой трубке NeuraGen длиной 7 мм по описанной нами методике [10]. Животные были разделены на 5 групп.

Группа А — тубуляция с NeuraGen, заполненной фибриновым клеем Tissucol-Kit с растворенным в нем 1 млн МСК, экспрессирующими зеленый флуоресцентный белок (eGFP) (Туб+Тис+МСК-LV-eGFP) (n = 10).

Группа Б — тубуляция с NeuraGen, заполненной фибриновым клеем Tissucol-Kit (Туб+Тис) (n = 10).

Группа В — тубуляция с NeuraGen заполненной NaCl (Туб+NaCl) (n = 10).

Группа Г — интактные животные (n = 5).

Группа Д — тубуляция с NeuraGen заполненной фибриновым клеем Tissucol-Kit с растворенным в нем 1 млн МСК окрашеных мембранным красителем Vybrant® Multicolor Cell-Labeling Kit (Thermofisher) (7 сут., n = 3; 14 сут., n = 3) (Туб+Тис+МСК-DiL).

Оценку эффективности регенерации производили по функциональному тесту оценки восстановления двигательной активности конечности (SFI) [11] и тесту оценки восстановления проводимости нерва методом стимуляционной электромиографии (ЭМГ) [12].

Ткани животных группы Д (Туб+Тис+МСК-DiL) забирали через 7 и 14 сут. после травмы, выделяли кондуит с прилегающим нервом и замораживали в среде для заморозки NEG 50 (ThermoScientific) при -80°C. На продольных криосрезах толщиной 6 мкм оценивали миграционную способность трансплантированных клеток. Визуализировали на конфокальном микроскопе LSM 780 (CarlZiess, Германия) при длине волны 555 нм. Ткани других групп забирали через 30 и 60 сут. после операции. С помощью гистологических методов исследования подсчитывали общее количество выживших нейронов спинального ганглия L5 [13]. Для этого выделенные спинальные ганглии замораживали в среде для заморозки NEG 50 (ThermoScientific) при -80°C. На серийных срезах толщиной 7 мкм окрашенных метиленовым синим подсчитывали количество нейронов с видимым ядрышком. Срезы препаратов изготавливали на микротом-криостате HM560 Cryo-Star (CarlZiess).

Эффективность регенерации оценивали в сравнении групп между собой, контролем служили интактные животные.

Результаты подсчетов обрабатывали по Стьюденту. Различия считали достоверными при пороге вероятности меньше 0,05% ($p<0,05$).

Результаты

Через 7 и 14 сут. меченные красителем DiL МСК обнаружены в трубке, в центральном и периферическом отрезках нерва. Через 30 сут. флуоресцентного свечения обнаружено не было.

Оценка локализации МСК в кондуите показала преимущественно ретроградную миграцию клеток в область центрального отрезка нерва. Показано, что к 14 сут. клетки продвигаются на расстояние до 3 мм в центральный отрезок нерва и до 1 мм в дистальный отрезок нерва (рис. 1).

Через 7 сут. МСК в трубке располагаются в составе фибринового клея Tissucol с равномерным распределением. Через 14 сут., преимущественно с пограничным расположением.

Наибольшие показатели SFI зарегистрированы в группе Туб+Тис+МСК-LV-eGFP. На сроке 28 сут. после операции показатели SFI в группе Туб+Тис+МСК-LV-eGFP на 16,13% ($p<0,05$) выше по сравнению с группой Туб+NaCl. Сравнение результатов данных групп на сроках 44, 52 и 60 сут. после травмы выявили увеличение показателей в группе Туб+Тис+МСК-LV-eGFP на 23,63% ($p<0,05$), 21,99% ($p<0,05$) и 33,34% ($p<0,05$), соответственно, по сравнению с группой с Туб+NaCl. В то же время показатели теста в группе Туб+Тис+МСК-LV-eGFP на сроках 52 и 60 суток после травмы на 17,81% ($p<0,05$) и 21,78% ($p<0,05$) выше, чем в группе Туб+Тис. В свою очередь, на сроке 60 сут. показатели теста в группе Туб+Тис на 8,73% ($p<0,05$) выше, чем в группе Туб+NaCl (рис. 2).

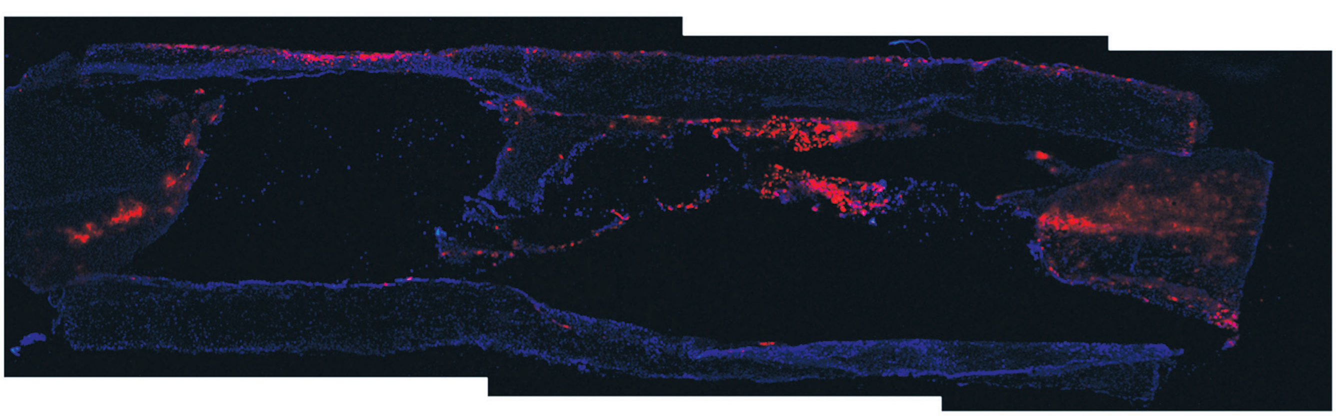

Рис. 1. Продольный срез через трубку; левая часть соответствует центральному концу нерва, правая часть соответствует дистальному участку нерва, 14 сут. Окраска ядер — DAPI. Ув. ×4

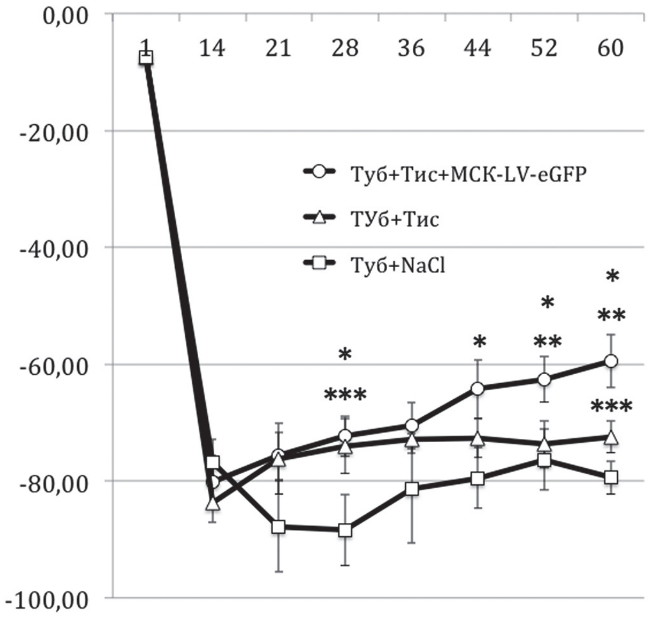

Рис. 2. Динамика изменения показателей SFI: по оси абсцисс — срок после операции в сутках, по оси ординат — значения SFI.
** — p<0,05 при сравнении групп Туб+Тис+МСК-LV-eGFP и Туб+NaCl;*
*** — p<0,05 при сравнении групп Туб+Тис+МСК-LV-eGFP и Туб+Тис;*
**** — p<0,05 при сравнении групп Туб+Тис и Туб+NaCl*

Показатели порога М-ответа (порог) на сроке 30 сут. после операции не выявили различий между интактными животными и группой Туб+Тис+МСК-LV-eGFP, также не выявлены различия между группами Туб+NaCl и Туб+Тис. Тогда как общие средние показатели порога групп (интактные и Туб+Тис+МСК-LV-eGFP) в два раза превышают средние значения групп (Туб+NaCl и Туб+Тис). На сроке 60 сут. по данному показателю разницы нет.

Амплитуда М-ответа (А-макс) на сроке 30 сут. после операции резко отличается от показателей интактных животных. Средние показатели А-макс группы Туб+Тис+МСК-LV-eGFP на ≈30% ($p<0,05$) превышают средние показатели групп (Туб+NaCl и Туб+Тис). На сроке 60 сут. после травмы средние показатели А-макс группы Туб+NaCl на 49% ($p<0,05$) меньше среднего показателя групп (Туб+Тис и Туб+Тис+МСК-LV-eGFP).

Показатели латентного периода (ЛП) на сроках 30 и 60 сут. после операции не выявили достоверных различий между группами.

Показатели длительности (ДЛ) ответа на сроке 30 сут. после операции не выявили различий между группами Туб+NaCl и Туб+Тис, так же как и между группами интактные и Туб+Тис+MSC-LV-eGFP. Средние показатели ДЛ групп (Интактные и Туб+Тис+MSC-LV-eGFP) на 24% ($p<0,05$) меньше средних показателей групп (Туб+NaCl и Туб+Тис) (табл.).

Таблица. **Показатели стимуляционной электромиографии**

	Порог			А-макс		
	До операции	**30 сут.**	**60 сут.**	**До операции**	**30 сут.**	**60 сут.**
Туб+Тис+MSC-LV-eGFP	0,584 (0,045)	0,622 (0,072)	0,900 (0,245)	18,276 (1,365)	6,573 (1,014)	8,684 (1,857)
Туб+Тис		0,917 (0,083)	0,667 (0,167)		2,437 (0,596)	8,327 (0,960)
Туб+ NaCl		1,000 (0,183)	0,500 (0,000)		1,943 (0,519)	4,337 (0,535)
Интактные		0,584 (0,045)	0,584 (0,045)		18,276 (1,365)	18,276 (1,365)
	ЛП			**ДЛ**		
	До операции	**30 сут.**	**60 сут.**	**До операции**	**30 сут.**	**60 сут.**
Туб+Тис+MSC-LV-eGFP	0,528 (0,027)	0,589 (0,035)	0,520 (0,049)	2,017 (0,077)	2,056 (0,213)	1,760 (0,236)
Туб+Тис		0,550 (0,034)	0,467 (0,033)		1,585 (0,094)	1,533 (0,088)
Туб+ NaCl		0,667 (0,080)	0,433 (0,067)		0,667 (0,080)	1,633 (0,067)
Интактные		0,528 (0,027)	0,528 (0,027)		2,017 (0,077)	2,017 (0,077)

Общее количество нейронов спинального ганглия L5 в опытных группах уменьшается более чем вдвое по сравнению с интактными животными.

Через 30 сут. после травмы количество выживших нейронов в группе Туб+Тис+МСК-LV-eGFP на 24,28% (p<0,05) и на 30,24% (p<0,05) больше, чем в группе Туб+Тис и Туб+NaCl, соответственно. На сроке 60 сут. количество выживших нейронов в группе Туб+Тис+МСК-LV-eGFP на 18% (p<0,05) выше, чем в группе Туб+Тис и на 36% (p<0,05) больше, чем в группе Туб+NaCl. При этом количество выживших нейронов в группе Туб+Тис на сроке 60 сут. на 21,24% (p<0,05) выше, чем в группе Туб+NaCl (рис. 3).

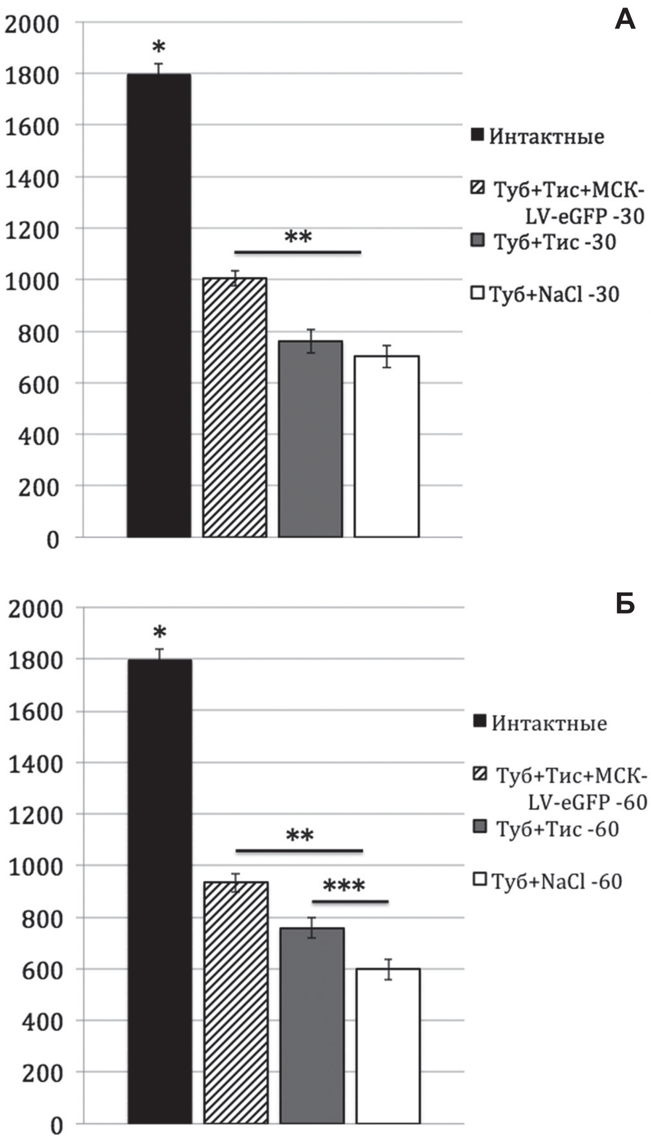

Рис. 3. Количество нейронов спинального ганглия L5:
А – через 30 сут. после травмы;
Б – через 60 сут. после травмы.
** – p<0,05 при сравнении интактных животных с экспериментальными группами;*
*** – p<0,05 при сравнении групп Туб+Тис+МСК-LV-eGFP с Туб+Тис и Туб+NaCl;*
**** – p<0,05 при сравнении групп Туб+Тис и Туб+NaCl*

Обсуждение

В ходе эксперемента не выявлены случаи отторжения трубки. Выраженные воспалительные процессы в зоне имплантации не возникали. Нами показано, что трубка сохраняется в толще мышц на сроке более 60 сут., при этом использование тубуляции с трубкой NeuraGen в сочетании с фибриновым клеем Tissucol, улучшает результаты регенерации по сравнению с использованием трубки с NaCl. Наибольшее количество выживших нейронов, улучшение проводимости нерва и как факт улучшение восстановления двигательной функции показано в группе с использованием МСК жировой ткани крысы, что несомненно связано с выраженной способностью клеток к выделению нейротрофических факторов и факторов роста нерва [14].

Интерпретируя полученные результаты, нужно отметить, что нервные волокна большего диаметра имеют самый низкий порог возбуждения [15]. Исходя из этого, можно предположить, что повышение порога регистрации М-ответа на 30 день после операции в группах Туб+NaCl и Туб+Тис отражает уменьшение количества быстропроводящих аксонов в седалищном нерве крыс. На графике восстановления двигательной функции, на сроке 30 сут., мы также не наблюдаем достоверной разницы в показателях групп Туб+NaCl и Туб+Тис. Низкие показатели теста SFI в данных группах коррелирует с данными по общему количеству нейронов спинального ганглия L5, которое уменьшается вдвое по сравнению с интактными животными. Сохранность порога регистрации М-ответа на уровне интактных животных к 30 дню исследования в группе Туб+Тис+МСК-LV-eGFP позволяет предположить наличие более быстрой регенерации нерва, однако дальнейшее нарастание порога в таком случае должно указывать на последующую гибель быстропроводящих аксонов. В этой связи необходимо учитывать, что порог регистрации М-ответа значительно зависит от близости стимулирующего электрода к нерву и теоретически от сопротивления тканей между стимулятором и нервом. Таким образом, увеличение порога может быть следствием технических погрешностей исследования либо отражать развитие фиброза в участке операции в группе Туб+Тис+МСК-LV-eGFP, однако при гистологическом исследовании наличие ярко выраженного фиброза нервной ткани подтверждено не было.

Снижение амплитуды М-ответа позволяет выявить повреждение моторных аксонов исследуемого нерва [16], а ее нарастание отражает процессы реиннервации либо регенерации. Наилучшие показатели к 30 дню были достигнуты в группе Туб+Тис+МСК-LV-eGFP и оставались стабильными до 60 дня. В группах Туб+NaCl и Туб+Тис к 30 дню исследования отмечалось восстановление значительно меньшего числа аксонов, однако в группе Туб+Тис к 60 сут. это число значительно возрастает и статистически не отличается от группы Туб+Тис+МСК-LV-eGFP. На графике SFI это выглядит как увеличение показателей теста восстановления двигательной функции в группе Туб+Тис по сравнению с группой Туб+NaCl. Также, мы наблюдаем продолжающуюся гибель нейронов спинального ганглия L5, что проявляется в уменьшении их количества к 60 сут. в группе Туб+NaCl, тогда как в группах Туб+Тис+МСК-LV-eGFP и Туб+Тис процент увеличения гибели нейронов по сравнению с 30 сутками не является достоверным.

Латентность М-ответа увеличивается со снижением скорости распространения возбуждения по нерву и уменьшается с нарастанием скорости распространения возбуждения, необходимо отметить, что малая латентность М-ответа в исследуемых группах на 30 сут. эксперимента совпадает с низким значением порога М-ответа, что может подтверждать наличие быстропроводящих аксонов в регенерирующем седалищном нерве.

Таким образом, использование трубки NeuraGen в сочетании с фибриновым клеем Tissucol-Kit при соединении концов поврежденного нерва имеющих диастаз является целесообразным и может применяться при оперативных вмешательствах на периферических нервах. Для улучшения показателей восстановления поврежденного нерва с целью стимуляции регенерации и поддержания выживания чувствительных нейронов спинального ганглия L5 целесообразно использование мезенхимных стволовых клеток, оказывающих нейропротекторный эффект за счет выделения нейротрофических факторов и факторов роста нерва [17].

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-04-07527. Исследование осуществлено в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Анализы выполнены в лаборатории лазерной конфокальной микроскопии Междисциплинарного центра аналитической микроскопии на приборе LSM 780 компании CARL ZEISS. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ID RFMEFI59414X0003) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Hosseinian M.A., Gharibi Loron A., Nemati B. et al. Comparison of a distal end-to-side neurorrhaphy with a proximal-distal end-to-side neurorrhaphy: in a rat model. Orthop Surg Traumatol. 2015; DOI: 10.1007/s00590-015-1699-x.

2. Sakuma M., Gorski G., Sheu S.H. et al. Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. Neurosci. 2015; DOI: 10.1111/ejn.13059.

3. Gao Y., Wang Y.L., Kong D. et al. Nerve autografts and tissue-engineered materials for the repair of peripheral nerve injuries: a 5-year bibliometric analysis. Neural Regen. Res. 2015; 10(6): 1003-8.

4. Масгутов Р.Ф., Богов (мл.) А.А., Ризванов А.А. и др. Стволовые клетки из жировой ткани — биологические свойства и перспективы клинического применения. Практическая медицина 2011; 55: 18-20.

5. Boecker A.H., van Neerven S.G., Scheffel J. et al. Pre-differentiation of mesenchymal stromal cells in combination with a microstructured nerve guide supports peripheral nerve regeneration in the rat sciatic nerve model. Neurosci. 2015; DOI: 10.1111/ejn.13052.

6. Levy M., Boulis N., Rao M. et al. Regenerative cellular therapies for neurologic diseases. Brain Res. 2015; DOI: 10.1016/j.brainres.2015.06.053.

7. Масгутов Р.Ф., Салафутдинов И.И., Богов А.А. и др. Стимуляция посттравматической регенерации седалищного нерва крысы с помощью плазмиды, экспрессирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2011; 6(3): 67-70.

8. Катина М.Н., Гайфуллина Р.Ф., Хаятова З.Г. и др. Выделение, культивирование и дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из жировой ткани крыс Rattus norvegicus и хомяков Mesocricetus auratus. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2012; 7(3): 82-7.

9. Соловьева В.В., Исаев А.А., Генкин Д.Д. и др. Влияние рекомбинантного гистона Н1.3 на эффективность лентивирусной трансдукции клеток человека in vitro. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2012; 3(7): 151-4.

10. Masgutov R., Raginov I., Fomina G. et al. Stimulation of the rat's sciatic nerve regeneration by local treatment with Xymedon. Cell Mol. Neurobiol. 2006; 26(7-8): 1413-21.

11. De Medinaceli L., Freed W.J., Wyatt R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. Exp. Neurol. 1982; 77(3): 634-43.

12. Еремеев А.А., Еремеев А.М., Балтина Т.В. и др. Влияние травмы седалищного нерва на функциональное состояние нейромоторного аппарата трехглавой мышцы голени крысы. Современное искусство медицины 2012; 5(7): 48-52.

13. Henken D.B., Battisti W.P., Chesselet M.F. et al. Expression of beta-preprotachykinin mRNA and tachykinins in rat dorsal root ganglion cells following peripheral or central axotomy. Neuroscience 1990; 39(3): 733-42.

14. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. Anat. 1999; 194(Pt 1): 1-14.

15. Tasaki I. Electric stimulation and the excitatory process in the nerve fiber. Physiol. 1939; 125: 380-95.

16. Raynor E.M., Ross M.H., Shefher J.M. et al. Differentiation between axonal and demyelinating neuropathies: identical segments recorded from proximal and distal muscles. Muscle Nerve 1995; 18: 402-8.

17. Masgutov R.F., Masgutova G.A., Zhuravleva M.N. et al. Human adipose-derived stem cells stimulate neuroregeneration. Clin. Exp. Med. 2015; DOI: 10.1007/s10238-015-0364-3.

Поступила: 13.09.2015