КОНДУИТ НА ОСНОВЕ ПОЛИ(ε-КАПРОЛАКТОНА) ЗАПОЛНЕННЫЙ ФИБРИНОВЫМ ГИДРОГЕЛЕМ С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТА ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА

Я.О. Мухамедшина [1], Р.Ф. Масгутов [1,2], Г.А. Масгутова [1], М.Н. Журавлева [1], А.А. Шульман [2], Л.Р. Галиева [1], А.А. Рогожин [1,2], Ю.А. Челышев [1,4], 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

Conduit based on poly(ε-caprolactone) filled with fibrin-based hydrogel with mesenchymal stromal cells for peripheral nerve defect reconstitution

Y.O. Mukhamedshina [1], R.F. Masgutov [1,2], G.A. Masgutova [1], M.N. Zuravleva [1], A.P.Shulman [2], L.R. Galieva [1], A.F. Rogozin [1,3], Y.A. Chelyshev [1,4], 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

В работе предложена терапевтическая стратегия для стимулирования регенерации периферического нерва, которая заключается в комбинации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и имплантации кондуита нерва из поли(ε-капролактона), заполненного фибриновым гелем Tissucol. Исследования in vitro показали, что покрытие подложки из поли(ε-капролактона) фибриновым гидрогелем способствует повышению пролиферативной активности клеток. Полученные результаты in vivo по замещению дефекта периферического нерва крыс с помощью кондуита на основе поли(ε-капролактона) заполненного фибриновым гелем с ММСК подтверждают эффективность предложенного метода.

Ключевые слова: тубуляция, поли(ε-капролактон), мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, фибриновый клей.

In this study we used promising therapeutic strategy for stimulation of peripheral nerve regeneration — implantation of poly(ε-caprolactone) nerve conduit filled with fibrin hydrogel Tissucol in combination with mesenchymal stem cells. In vitro studies showed that the coating by Tissucol of poly(ε-caprolactone) substrate promotes cell proliferation. In vivo results of peripheral nerve defect reconstitution in rats using the conduit based on poly (ε-caprolactone) filled with fibrin hydrogel with mesenchymal stem cells confirmed the effectiveness of the proposed approach.

Keywords: tubulation, poly(ε-caprolactone), multipotent mesenchymal stromal cells, fibrin glue.

Введение

Периферическая нервная система обладает хорошим посттравматическим регенераторным потенциалом, однако проблема высокой степени инвалидизации больных до сих пор не решена [1, 2]. В значительной степени это связано с нерешенностью задачи преодоления протяженных диастазов нерва. С этой целью активно разрабатывают кондуиты нерва из биосовместимых материалов, которые предназначены для направления и поддержания регенерации нервных волокон. Среди тубулированных тканеинженерных конструкций кондуит из поли(ε-капролактона) (PCL) обладает оптимальными механическими свойствами и способностью к биодеградации [3, 4]. Установлено, что данный тип биополимера способствует адгезии не только шванновских клеток, но и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) [5—7].

Представляется перспективной для стимулирования регенерации периферического нерва терапевтическая стратегия, которая заключается в комбинации ММСК и имплантации кондуита нерва [7, 8]. В качестве внеклеточного матрикса для регенерирующих нервных волокон был предложен фибриновый гидрогель Tissucol (Baxter, Австрия). Фибриновый клей Tissucol широко используется в биомедицинских исследованиях как природный высокомолекулярный материал с превосходной биосовместимостью и биодеградацией [9, 10]. Применение ММСК из жировой ткани в данной связи представляется оптимальным, особенно с точки зрения доступности, простоты и относительной безопасности получения аутогенного клеточного материала [11]. Известно, что ММСК секретируют различные нейротрофические факторы и цитокины [12], обладают иммуномодуляторным эффектом и хорошим миграционным потенциалом [13]. При введении ММСК в кровь, они способны к миграции в область повреждения и интеграции в ткань. Указанные выше свойства ММСК, а также их онкогенная безопасность, отсутствие этических противоречий, позволяют рассматривать эти клетки как оптимальный материал для аутотрансплантаций не только при нейротравмах, но и при различных нейродегенеративных заболеваниях.

На модели травмы лицевого нерва показано, что применение биодеградируемого материала в комбинации с нейральными стволовыми клетками, генетически модифицированными для экспрессии глиального нейротрофического фактора (GDNF), повышает регенерацию поврежденного нерва [14]. В случае передавливания седалищного нерва крысы введение в область повреждения ММСК человека, модифицированных при помощи аденовирусных векторов с геном GDNF, стимулирует восстановление

e-mail: yana.k-z-n@mail.ru

двигательной функции, регенерацию аксонов и снижение апоптоза шванновских клеток [15]. Недавно обнаружено, что комбинация ММСК и PCL кондуита стимулирует посттравматическую регенерацию срединного нерва мыши, однако результаты по функциональной состоятельности нерва не были представлены [16]. Учитывая позитивное влияние ММСК и фибринового клея на разные мишени и молекулярные механизмы стимулирования регенерации, представляется достаточно вероятным, что их комбинация с PCL кондуитом будет способствовать эффективному преодолению протяженных диастазов нерва.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 20 крысах-самцах породы Wistar, массой 200–250 г. Все процедуры с животными проводили в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму. Крыс наркотизировали путем внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата (Sigma, США) (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г веса животного). В левом седалищном нерве на уровне середины бедра формировали диастаз длиной 5 мм, который преодолевали при помощи тубуляции полимерной трубкой из PCL длинной 7 мм. Получение тубулированного кондуита было описано нами ранее [3]. На каждый конец кондуита накладывали по два шва. Прооперированных животных разделили на три группы. Крысам первой группы (n = 6) сформированный кондуит заполняли 0,9% NaCl (PCL). Во второй группе животных (n = 6) диастаз преодолевали при помощи кондуита нерва, заполненного гидрогелем на основе фибрина Tissucol (Baxter, Австрия) (PCL+Tissucol). В третьей группе (n = 8) сформированный кондуит заполняли смесью Tissucol с ММСК, трансдуцированными рекомбинантным лентивирусом, несущим ген усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) (30 тыс. клеток в 7 мкл) (PCL+Tissucol+MSC-LV-EGFP).

Получение ММСК из жировой ткани и рекомбинантного лентивируса с клонированным геном EGFP с последующей трансдукцией клеток было описано нами ранее [17, 18]. Забор материала осуществляли через 14 сут. (PCL+Tissucol+MSC-LV-EGFP), 30 и 60 сут. (все экспериментальные группы) после операции по методике, описанной ранее [19]. Продольные срезы сформированного кондуита толщиной 6 мкм, полученные на микротом-криостате HM560 Cryo-Star (Carl Zeiss, Германия), окрашивали азур-эозином по стандартной методике.

Для исследований in vitro использовали PCL трубки диаметром и высотой 2 мм, которые укладывали вертикально в ячейки 24 луночного планшета, после чего полость трубок заполняли суспензией ММСК в Tissucol (1 млн клеток в 7 мкл матрикса). PCL трубки, заполненные матриксом с ММСК префабрицировали в CO_2 инкубаторе при 37°С в течение 30 мин., после чего в лунки планшета добавляли 200 мкл среды α-MEM (ПанЭко, Россия). Клетки культивировали в течение 48 часов, после чего трубки аккуратно снимали с культурального пластика, заливали средой для заморозки тканей NEG 50 (ThermoScientific, США). Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили на криостатных срезах толщиной 6 мкм с первичными антителами против каспаз (Caspase-3, sc-98785; Caspase-7, sc-6138; Caspase-10, sc-393983, SantaCruz, США) согласно протоколу фирмы-производителя.

Для проведения MTS-теста в ячейки 96-луночного планшета, покрытые PCL сеяли МСК по 5000 тыс. клеток на лунку. Культуральный планшет инкубировали в течение 48 ч. при 37°С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2. Количество жизнеспособных клеток оценивали колометрически с помощью реагента CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder (Promega) на планшетном анализаторе Infinite M200 Pro (Tecan, США) при длине волны 490 нм.

На 30 и 60 сут. после операции для оценки проводимой способности нервных волокон использовали метод стимуляционной электронейромиографии. С помощью игольчатых электродов регистрировали суммарный потенциал икроножной мышцы (порог возникновения, амплитуду, латентный период, длительность моторного и рефлекторного ответов) у крыс экспериментальных групп и интактных животных.

Статистическую обработку результатов тестирования проводили с использованием пакета программ Origin7 Pro. Статистическую достоверность разницы определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Во всех статистических данных уровень достоверности был принят меньше 0,05 ($p<0,05$).

Результаты

При исследовании срезов PCL трубок, в которых культивировали ММСК в фибриновом клее, используемом в качестве матрикса, наблюдали адгезию клеток к внутренней поверхности трубок (рис. 1А).

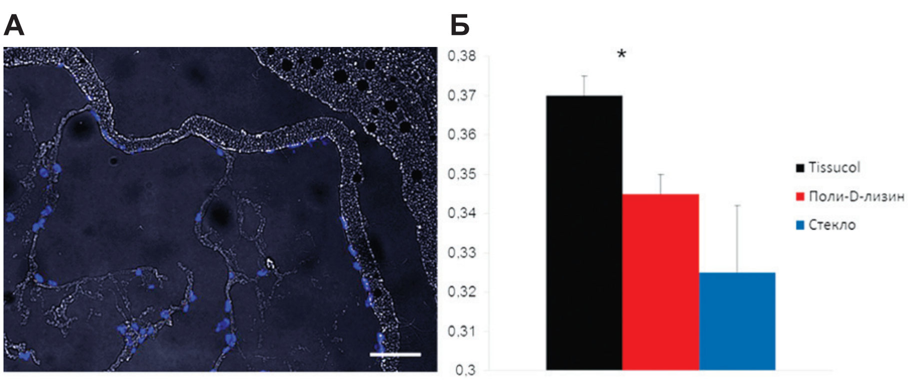

*Рис. 1. ММСК на внутренней поверхности PCL трубок in vitro: А – микрофотография; Б – пролиферативная активность ММСК на различных матриксах (по результатам MTS-теста), * – P < 0,05, t-критерий Стьюдента. Докраска ядер – DAPI. Бар – 100 мкм*

Большинство клеток располагалось ближе к стенкам PCL кондуита, тогда как центральная область трубки ММСК не содержала. В случае отсутствия нанесения на PCL покрытие фибринового клея адгезия клеток к поверхности трубки заметно снижалась. При иммунофлуоресцентном окрашивании клеток на маркеры апоптоза (Caspase-3, -7, -10) иммунопозитивных клеток обнаружено не было.

Пролиферативная активность клеток на различных матриксах анализировалась с помощью MTS-теста. Исследование показало, что покрытие фибриновым клеем Tissucol подложки из поли(ε-капролактона), способствовало повышению пролиферативной активности клеток (рис. 1Б). Покрытие поверхности из поли(ε-капролактона) поли-D-лизином не оказывало существенного воздействия на данный показатель.

В группе PCL+Tissucol+MSC-LV-EGFP на 14 и 30 сут. после операции внутри PCL кондуита были обнаружены ММСК, экспрессирующие EGFP. Специфическое свечение было наиболее интенсивно на 14 сут. после тубуляции в области проксимальных и дистальных концов трубки, но также присутствовало и в центральной части сформированного кондуита (рис. 2А). К 30 сут. после операции свечение EGFP было распределено более равномерно по всей длине PCL трубки (рис. 2В). Как на 14, так и на 30 сут. часть ММСК (~12–15%) была адгезирована к внутренней поверхности PCL кондуита.

К 14 сут. после тубуляции с Tissucol и ММСК кондуит был заполнен фибриновым матриксом (рис. 2Б), имелось большое количество клеток, часть которых (не менее 50%) экспрессировала EGFP. К 30 сут. на продольных срезах сформированного кондуита в группах PCL+Tissucol и PCL+Tissucol+MSC-LV-EGFP центральный отрезок седалищного нерва преодолевал диастаз в 5 мм и достигал периферического отрезка нерва (рис. 2В). В первой группе животных (PCL) к аналогичному сроку дистального конца нерва достигали лишь отдельные пучки нервных волокон.

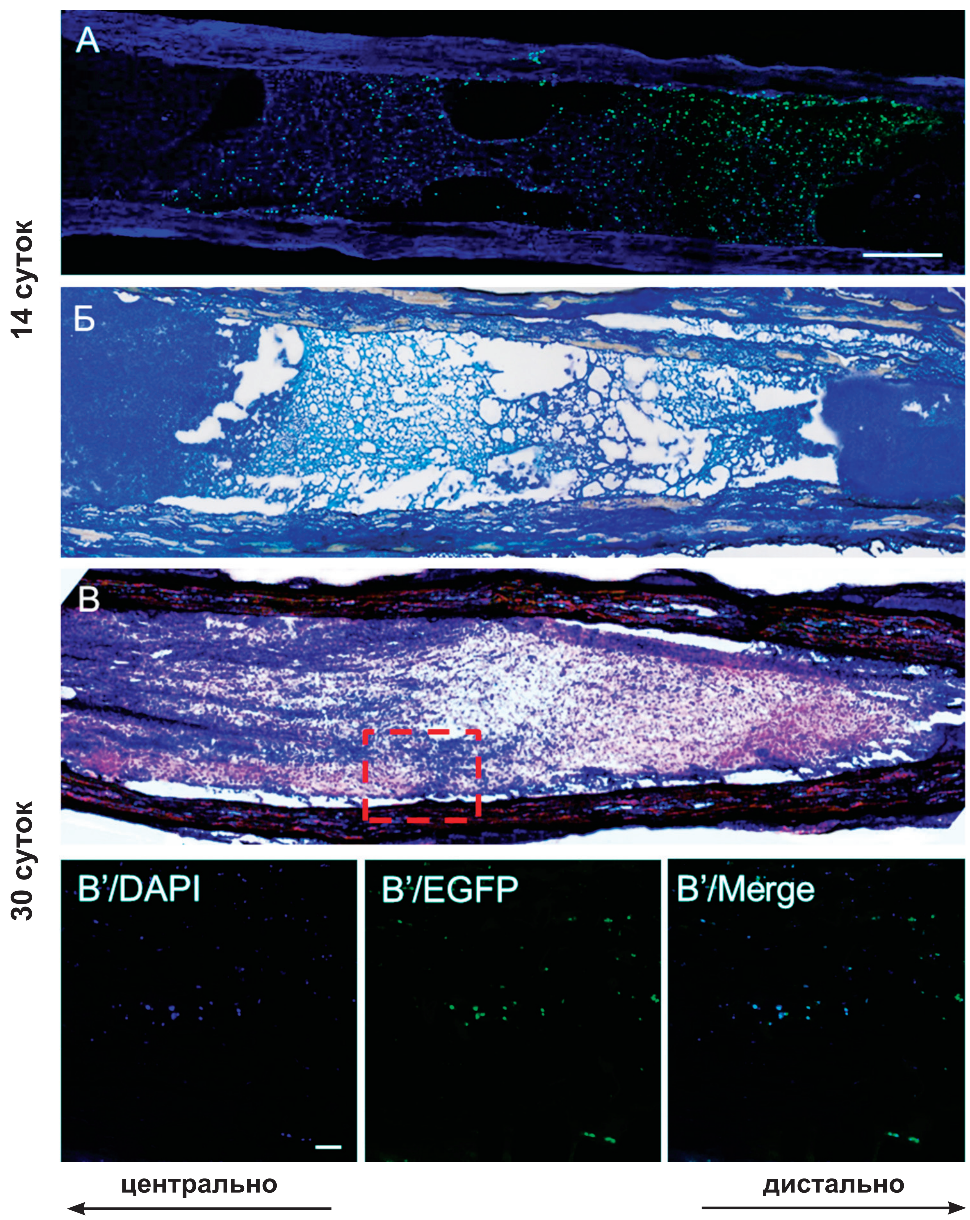

Рис. 2. Продольные срезы кондуита через разные сроки от начала эксперимента iv vivo:
А – EGFP⁺ клетки через 14 сут. после тубуляции и имплантации ММСК с Tissukol; Б, В – состояние кондуита через 14 и 30 сут., соответственно, в группе PCL+Tissucol+MSC+LV-EGFP; 2В' – EGFP⁺ клетки в зоне, соответствующей выделенному красным квадратом участку. Бар: А–В – 500 мкм, В' – 50 мкм

Для оценки проводимой способности нервных волокон седалищного нерва у крыс использовали метод стимуляционной электронейромиографии. Во всех группах после пересечения нерва к 30 дню отмечалось частичное восстановление амплитуды моторного ответа (М-ответа) без статистически достоверных межгрупповых отличий (рис. 3А). Однако порог вызывания М-ответа и латентный период (ЛП) по М-ответу в группе PCL+Tissucol заметно отличался от других экспериментальных групп (рис. 3Б). Значения амплитуды М-ответа оставались стабильными с 30 по 60 сут. в группах PCL+NaCL и PCL+Tissucol, при этом в группе PCL+Tissucol+MSC+LV-EGFP наблюдалось уменьшение порога М-ответа.

Исследование рефлекторного ответа (Н-ответ) позволило оценить также и функцию чувствительных волокон седалищного нерва. Наличие Н-ответа на 30 день после операции позволяет утверждать о восстановлении не только двигательной, но и чувствительной функции нерва. Соотношение амплитуд Н-ответа и М-ответа к 30 дню пришло к значениям, наблюдавшимся до пересечения нерва, но к 60 дню отмечалось увеличение соотношения Н/М-ответов в группе PCL+Tissucol+MSC+LV-EGFP.

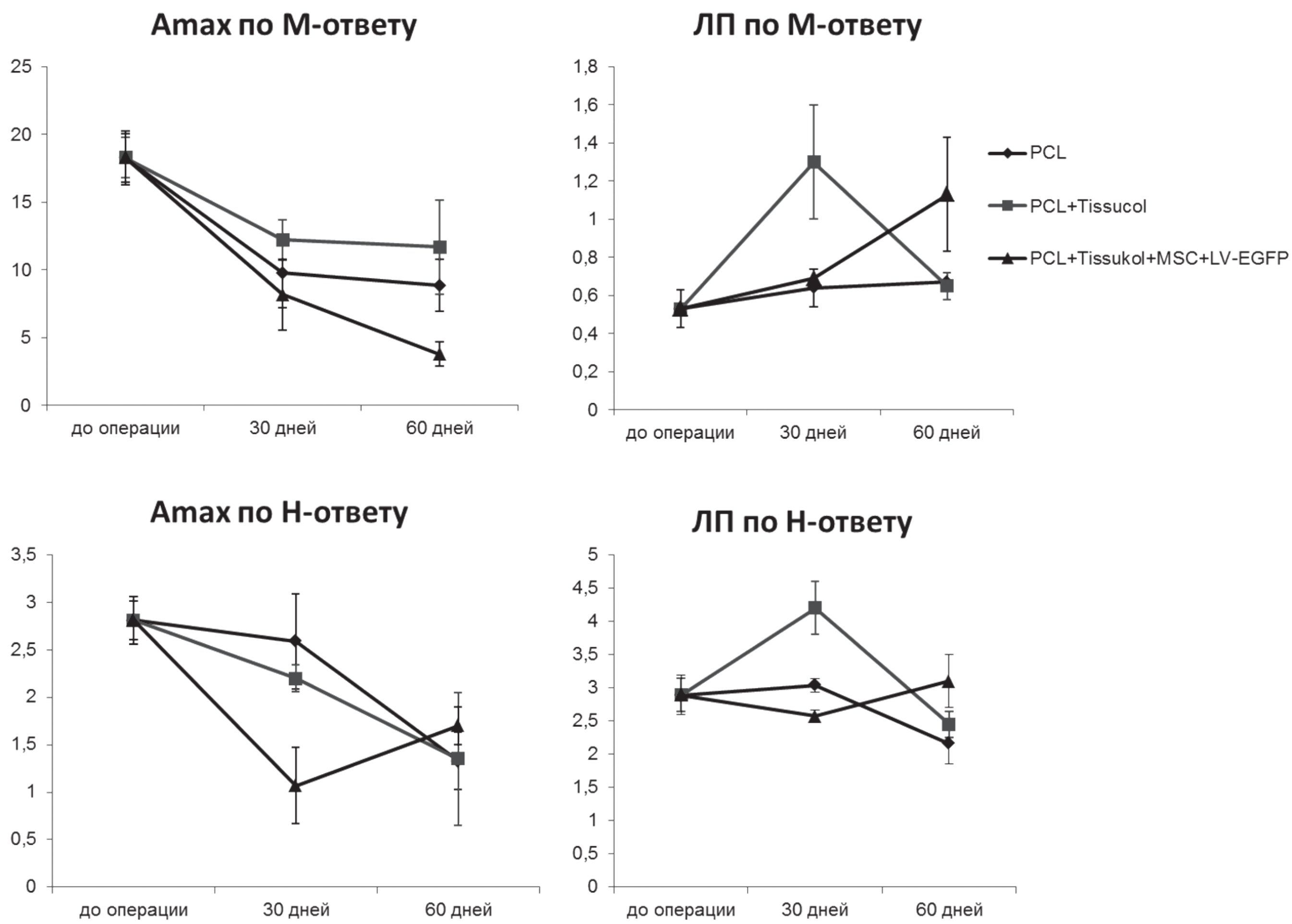

Рис. 3. Амплитуда (Amax) и латентный период (ЛП) М- и Н-ответов икроножной мышцы крыс экспериментальных групп PCL (черный цвет), PCL+Tissucol, PCL+Tissucol+MSC+LV-EGFP до операции, через 30 и 60 сут. после тубуляции

Обсуждение

В ходе исследований in vitro обнаружена адгезия ММСК к внутренней поверхности PCL трубок, что подтверждает полученные ранее результаты [7]. При этом в случае нанесения на PCL покрытие фибринового клея Tissucol адгезия клеток к поверхности трубки заметно повышается. Отсутствие клеток, экспрессирующих маркеры апоптоза или пролиферации, вероятнее всего свидетельствует о нахождении ММСК в интерфазе клеточного цикла.

Для получения значимого терапевтического эффекта генетически модифицированные стволовые и прогениторные клетки должны обладать повышенной способностью к выживанию и активно экспрессировать терапевтические гены. Исследование позволило установить не только продолжительность присутствия ММСК, заключенных вместе с Tissucol в PCL кондуите до 30 сут. после тубуляции, но и эффективную экспрессию рекомбинантного репортерного гена EGFP в генетически модифицированных ММСК in vivo в течение указанного времени.

Не смотря на то, что центральный отрезок седалищного нерва в группах PCL+Tissucol и PCL+Tissucol+MSC+LV-EGFP преодолевал диастаз в 5 мм и достигал периферического отрезка нерва, говорить о функциональной состоятельности нерва без оценки проводимости не корректно. В ходе исследования были обнаружены одинаковые темпы реиннервации в экспериментальных группах, но при этом присутствовали различия в порогах вызывания М-ответа и ЛП по М-ответу на 30 сут. после тубуляции. Это может свидетельствовать о том, что во второй группе (PCL+Tissucol) восстановление нерва происходило за счет медленнопроводящих аксонов, а в группах PCL и PCL+Tissucol+MSC+LV-EGFP за счет быстропроводящих аксонов. Наблюдаемое уменьшение порога М-ответа в группе PCL+Tissucol+MSC+Lv-EGFP с 30 по 60 сут. свидетельствует о продолжающейся ремиелинизации в данной группе.

Соотношение амплитуд Н/М-ответов длительное время считали показателем возбудимости альфа-мотонейронов спинального центра, однако дальнейшие исследования установили, что изменчивость Н-ответа может определяться двумя факторами: состоянием мотонейронов и пресинаптическими тормозными влияниями на терминали Ia афферентов [20]. Из этого следует, что обнаруженное нарастание амплитуд Н/М-ответов к 60 дню в группе PCL+Tissucol+MSC+LV-EGFP может быть обусловлено как ослаблением пресинаптического торможения, так и повышением возбудимости мотонейронов.

Таким образом, полученные нами результаты in vitro и in vivo подтверждают перспективность направления, которое заключается в комбинации терапии стволовыми клетками и трансплантации кондуита нерва, заполненного фибриновым гидрогелем Tissucol. Однако говорить о неоспоримых преимуществах данной комбинации на сегодняшний день не представляется возможным, в связи с необходимостью расширения морфологических и патофизиологических методов исследования для раскрытия полноценной картины возможных процессов нейрорегенерации в созданных условиях.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №13-04-12035_офи_м и РФФИ №15-04-07527_а. Исследование осуществлено в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. 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. Lee S.K., Wolfe S.W. Peripheral nerve injury and repair. J. Am. Acad. Orthop. Surg. 2000; 8(4): 243-52.
2. Navarro X. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: a critical overview. Eur. J. Neurosci. Epub ahead of print. 2015.
3. Николаев С.И., Галлямов А.Р., Мамин Г.В. и др. Кондуит нерва на основе поли(ε-капролактона) и локальная доставка генов vegf и fgf2 стимулируют нейрорегенерацию. Клеточные технологии в биологии и медицине 2014; 1: 44-49.
4. Chang C.J. The effect of pulse-released nerve growth factor from genipin-crosslinked gelatin in schwann cell-seeded polycaprolactone conduits on large-gap peripheral nerve regeneration. Tissue Eng. Part A. 2009; 15(3): 547-57.
5. Chiono V., Vozzi G., Vozzi F. et al. Melt-extruded guides for peripheral nerve regeneration. Part I: poly(epsilon-caprolactone). Biomed. Microdevices 2009; 11(5): 1037-50.
6. Schnell E., Klinkhammer K., Balzer S. et al. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend. Biomaterials 2007; 28(19): 3012-25.
7. Frattini F., Lopes F.R., Almeida F.M. et al. Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit promote sciatic nerve regeneration and sensory neuron survival after nerve injury. Tissue Eng. Part A. 2012; 18(19-20): 2030-9.
8. Ribeiro-ResendeV.T., Pimentel-Coelho P.M., Mesentier-Louro L.A. et al. Trophic activity derived from bone marrow mononuclear cells increases peripheral nerve regeneration by acting on both neuronal and glial cell populations. Neuroscience 2009; 159(2): 540-9.
9. Miri Bonjar M.R., Maghsoudi H., Samnia R. et al. Efficacy of fibrin glue on seroma formation after breast surgery. Int. J. Breast Cancer. 2012; 2012: 643132.
10. Tokuishi K., Yamamoto S., Anami K. et al. Successful application of subcutaneous adipose tissue with fibrin glue in conservative treatment of tracheobronchial rupture. Ann. Thorac. Surg. 2012; 94: 1726–9.
11. 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 Eng. 2012; 18(11-12): 1264-72.
12. Azari M.F., Mathias L., Ozturk E. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of CNS injury. Curr. Neuropharmacol. 2010; 8: 316-23.
13. Chidgey A.P., Layton D., Trounson A. et al. Tolerance strategies for stem-cell-based therapies. Nature 2008; 453: 330-7.
14. Shi Y., Zhou L., Tian J. et al. Transplantation of neural stem cells overexpressing glia-derived neurotrophic factor promotes facial nerve regeneration. Acta Otolaryngol. 2009; 129(8): 906-14.
15. Cheng F.C., Tai M.H., Sheu M.L. et al. Enhancement of regeneration with glia cell line-derived neurotrophic factor-transduced human amniotic fluid mesenchymal stem cells after sciatic nerve crush injury. J. Neurosurg. 2010; 112(4): 868-79.
16. Oliveira J.T., Almeida F.M., Biancalana A. et al. Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit enhance median-nerve regeneration, prevent decrease of creatine phosphokinase levels in muscle, and improve functional recovery in mice. Neuroscience 2010; 170(4): 1295-303.
17. 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. КТТИ 2012; 7(3): 82-7.
18. Соловьева В.В., Исаев А.А., Генкин Д.Д. и др. Влияние рекомбинантного гистона Н1.3 на эффективность лентивирусной трансдукции клеток человека in vitro. КТТИ 2012; 3(7): 151-4.
19. Masgutov R.F., Masgutova G.A., Zhuravleva M.N. et al. Human adipose-derived stem cells stimulate neuroregeneration. Clin. Exp. Med. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1007/s10238-015-0364-3.
20. Старобинец М.Х., Волкова Л.Д. Особенности функционирования сегментарного аппарата спинного мозга человека при различных формах нарушения нисходящего контроля. Физиология человека 1988; 14(2): 237-47.

Поступила:17.09.2015