Выживание и дифференцировка мигрирующих в спинной мозг эндогенных шванновских клеток под влиянием нейротрофических факторов

Я.О. Мухамедшина [1,2], Г.Ф. Шаймарданова [3], А.Р. Мухитов [3], И.И. Салафутдинов [2], А.А. Ризванов [2], В.Н. Зарубина [1], Ю.А. Челышев [1,2]

[1] Казанский государственный медицинский университет, Казань

[2] Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

[3] Казанский институт биохимии и биофизики РАН, Казань

Survival and differentiation of endogenous Schwann cells migrating into spinal cord under the influence of neurotrophic factors

Y.O. Mukhamedshina [1,2], G.F. Shaymardanova [3], A.R. Muhitov [3], I.I. Salafutdinov [2], V.N. Zarubina [1], A.A. Rizvanov [2], Yu.A. Chelyshev [1,2]

[1] Kazan State Medical University, Kazan

[2] Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

[3] Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of RAS, Kazan

Шванновские клетки мигрируют в область повреждения спинного мозга, где участвуют в ремиелинизации и рассматриваются как источник многочисленных молекулярных сигналов, потенциально способных поддерживать рост аксонов в центральной нервной системе. В работе описано поведение мигрирующих в область дозированного контузионного повреждения спинного мозга крысы эндогенных шванновских клеток в условиях локальной доставки плазмиды с генами сосудистого эндотелиального фактора роста (vegf) и фактора роста фибробластов 2 (fgf2) путем прямого введения «голой» плазмидной ДНК и в составе трансплантированных генетически модифицированных клеток мононуклеарной фракции крови пуповины человека. При помощи иммуногистохимического выявления маркеров шванновских клеток S100, GFAP, Krox20, а также белка HSP25, охарактеризован фенотип мигрирующих в спинной мозг эндогенных шванновских клеток и произведена оценка их численности. Установлено, что наибольшее влияние на их количество в области повреждения оказывает локальная доставка генов vegf и fgf2 при помощи мононуклеарных клеток крови пуповины человека. Тем не менее, прямое введение той же плазмиды может также считаться перспективным в случае применения синтетических платформ, повышающих ее трансфекционную активность.

Ключевые слова: шванновские клетки, травма спинного мозга, клетки крови пуповины, плазмида, *vegf, fgf2*.

Schwann cells are a major figure in the process of regeneration in the peripheral nervous system. They migrate into the injury region of spinal cord, which are involved in remyelination and are regarded as the source of numerous molecular signals that could potentially support the growth of axons in the central nervous system. In the present work we describe the behavior of migrating into the injury dosed region spinal cord Schwann cells under the influence of neurotrophic factors – vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor 2 (FGF2), delivered by direct introduction of «naked» plasmid DNA and by transplantation of genetically modified human umbilical cord blood mononuclear cells.

Using immunohistochemical detection of markers of S100, GFAP, Krox20 and HSP25 identified different phenotypes of migrating into the spinal cord of endogenous Schwann cells. Found that greatest influence on their numbers in the injury region provides local delivery of genes vegf and fgf2 by human umbilical cord blood mononuclear cells. However, the direct introduction of the same plasmid may also be promising in the case of synthetic platforms that enhance its transfection activity.

Key words: spinal cord injury, Schwann cells, umbilical cord blood cells, plasmid, *vegf, fgf2*.

Одним из направлений преодоления последствий травмы спинного мозга является компенсация демиелинизации. При этом трансплантированные и собственные (эндогенные) шванновские клетки представляются наиболее эффективными миелинобразующими элементами [1]. Из всех известных клеточных типов именно шванновские клетки активно продуцируют нейротрофические факторы, молекулы внеклеточного матрикса, адгезии и другие молекулы, связанные с ростом аксонов [2–4], наиболее энергично стимулируют процессы нейрорегенерации. Показано, что сформировав заместительный периферический миелин, шванновские клетки постепенно замещаются олигодендроцитами [5]. Подобное поведение шванновских клеток представляется исключительно позитивным для замещения миелинобразующей функции повреждённых или погибших олигодендроцитов [6]. Несмотря на большое количество исследований с трансплантацией в ЦНС шванновских клеток, значение фактора миграции в мозг эндогенных шванновских клеток изучено недостаточно. Представляется вероятным, что трансплантация клеток с целью стимулирования посттравматической регенерации в ЦНС может вызывать количественные и качественные сдвиги в популяции эндогенных шванновских клеток, заселяющих область повреждения. Исследования влияния трансплантируемых клеток на поведение резидентной глии и мигрирующих в мозг эндогенных клеток практически только начинаются. Первые значимые результаты получены на глиальных клетках обонятельных структур, которые in vitro проявляют способность поддерживать миграцию шванновских клеток, что опосредуется действием фактора роста нервов (NGF) [7]. При контузионной травме спинного мозга трансплантация шванновских клеток приводит к вы-

e-mail: Yanakazmedhist1@rambler.ru

раженной инфильтрации области повреждения эндогенными шванновскими клетками [8]. Пластичность фенотипа и мощный нейрорегенераторный потенциал шванновских клеток типичной локализации в периферическом нерве регулируется рядом нейротрофических факторов и нейропоэтических цитокинов. Остаётся неясным, участвуют ли эти молекулярные сигналы в контроле выживания и дифференцировки мигрирующих в ЦНС шванновских клеток. Данное исследование посвящено проверке гипотезы о том, что нейротрофические факторы *vegf* и *fgf2* поддерживают миграционный потенциал и стимулируют дифференцировку заселяющих область повреждения спинного мозга эндогенных шванновских клеток.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 43 белых лабораторных крысах, самках и самцах весом 200–250 г. Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в Казанском государственном медицинском университете и одобренным этическим комитетом. 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). Животным всех групп проводили ламинэктомию на уровне Т8, после чего наносили дозированную контузионную травму спинного мозга металлическим стержнем весом 10 г строго на центр визуализируемого участка с высоты 25 мм. Сразу после нанесения травмы животным 1 опытной группы вводили мононуклеарные клетки крови пуповины человека, трансфицированные плазмидой pBud-VEGF-FGF2 [9] с комбинацией генов *vegf* и *fgf2* по 1 млн. в 5 мкл DPBS (БиолоТ, Россия) в 2 точки на расстоянии 1 мм ростральнее и каудальнее эпицентра травмы и 0,5 мм латеральнее срединной линии при помощи гамильтоновского шприца (Sigma, США). Крысам 2 экспериментальной группы в тех же экспериментальных условиях вводили 40 мг аналогичной плазмиды pBud-VEGF-FGF2. Крысам с контузионной травмой спинного мозга контрольной группы не производили трансплантацию клеток или инъекцию плазмиды. В течение 7 сут. после операции всем экспериментальным животным внутримышечно вводили гентамицин (5 мг/кг) один раз в сутки.

Через 30 сут. после нанесения травмы животных наркотизировали и транскардиально перфузировали 4% раствором параформальдегида (4°С). Фрагмент спинного мозга длиной 5 см (по 2,5 см в ростральном и каудальном направлении от эпицентра повреждения) забирали вместе с позвонками. Через 12 ч от начала фиксации выделяли спинной мозг и разделяли его на 5 равных частей.

Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили на поперечных срезах спинного мозга толщиной 20 мкм, полученных на микротом-криостате HM560 Cryo-Star (Carl Zeiss, Германия). Для идентификации антигена срезы инкубировали с первичными антителами против белка S100 (Dako, 1:1200, США), глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) (Santa Cruz, 1:200, США), транскрипционному фактору Krox20 (Santa Cruz, 1:200, США) и белку теплового шока HSP25 (Stressgen, 1:2000, США) в течение суток при 4°С, промывали в фос-фатно-солевом буфере, и затем инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями anti-mouse Alexa 647 (Invitrogen, 1:200, США), anti-goat Alexa 488 (Invitrogen, 1:150), anti-rabbit Alexa 555 (Invitrogen, 1:150, США) в течение 2 ч при комнатной температуре. Для визуализации ядер клеток срезы дополнительно окрашивали в течение 10 мин при комнатной температуре раствором 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, 10 мкг/мл в фосфатном буфере, Sigma, США). Окрашенные срезы заключали в среду, поддерживающую флуоресценцию, и изучали при помощи конфокального сканирующего микроскопа LSM 510-Meta (Carl Zeiss, Германия).

На аналогичных срезах на расстоянии 1 см в каудальном и ростральном направлении от эпицентра травмы непрямым иммунопероксидазным методом выявляли экспрессию специфического маркера шванновсих клеток с антителами против фактора транскрипции Krox20 (Covance, 1:200). Количество Krox20$^+$-клеток подсчитывали на оцифрованных изображениях в 4 фиксированных зонах белого вещества: 1 – вентро-медиальная часть переднего канатика, прилежащая к срединной щели, правая сторона; 2 – аналогично, левая сторона; 3 – латеральная часть бокового канатика в пределах фронтальной плоскости, проходящей через центральный канал, правая сторона; 4 – аналогично, левая сторона. Просмотр препаратов и оцифровку изображений проводили на световом микроскопе AxioOberver.Z1 (Carl Zeiss). Результаты морфометрии обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты

На 30 сут. после нанесения травмы во всех исследуемых группах животных на расстоянии до 2 см от эпицентра повреждения в обоих направлениях обнаружены клетки, экспрессирующие специфические маркеры шванновских клеток. В опытных и контрольной группах их количество и распределение в белом и сером веществе существенно различается. При помощи непрямого иммунопероксидазного метода с выявлением Krox20 обнаружено увеличение количества Krox20$^+$-клеток во всех фиксированных зонах белого вещества на расстоянии 1 см в ростральном и каудальном направлении от эпицентра повреждения в 1 и 2 опытных группах по сравнению с контрольной соответственно на 61% и 50% (рис. 1). Достоверная разница в аналогичном показателе между двумя опытными группами на расстоянии 1 см в ростральном направлении от эпицентра повреждения отсутствует (рис. 1А). Тем не менее, на расстоянии 1 см в каудальном направлении во всех фиксированных зонах белого вещества количество Krox20$^+$-клеток в случае доставки генов нейротрофических факторов *vegf* и *fgf2* на клеточных носителях (1 опытная группа) достоверно больше на 31% ($p < 0,05$) (рис. 1Б) по сравнению с этим же показателем во 2 опытной группе с прямым введением плазмиды с терапевтическими генами.

К 30 сут. после нанесения травмы во всех исследуемых группах в белом и сером веществе обнаружены клетки, одновременно экспрессирующие белки S100, GFAP и Krox20 (S100$^+$/GFAP$^+$/Krox20$^+$-клетки). Для контрольной группы в области вхождения задних корешков характерно: отсутствие S100$^+$-клеток и Krox20$^+$-клеток, преимущественно наличие GFAP$^+$-клеток, небольшое скопление GFAP$^+$/Krox20$^+$-клеток и единичные S100$^+$/GFAP$^+$/Krox20$^+$-клетки (рис. 2А, Г, Ж, К).

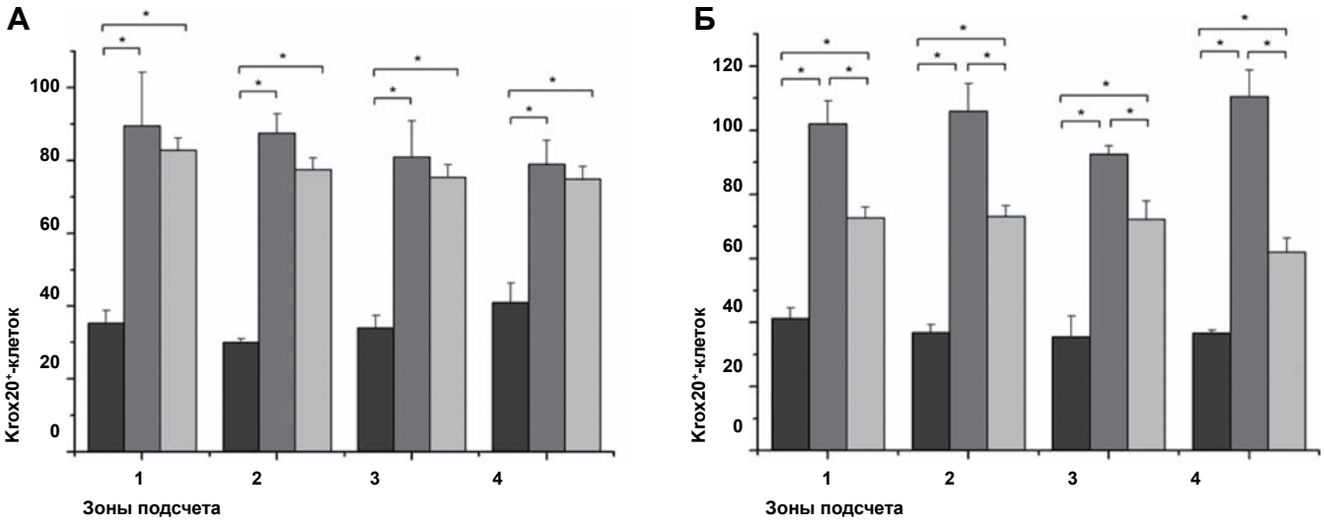

*Рис. 1. Количество Krox20+-клеток в фиксированных зонах белого вещества с площадью каждой по 0,33 мм² (ось ординат), 30 сут. после операции: А – на расстоянии 1 см в ростральном направлении от эпицентра травмы; Б – на расстоянии 1 см в каудальном направлении от эпицентра травмы. Первые столбцы – контрольная группа, вторые – первая опытная группа с ведением мононуклеарных клеток крови пуповины, трансфицированных плазмидой pBud-VEGF-FGF2, третьи – вторая опытная группа с ведением голой плазмиды pBud-VEGF-FGF2. * – p < 0,05*

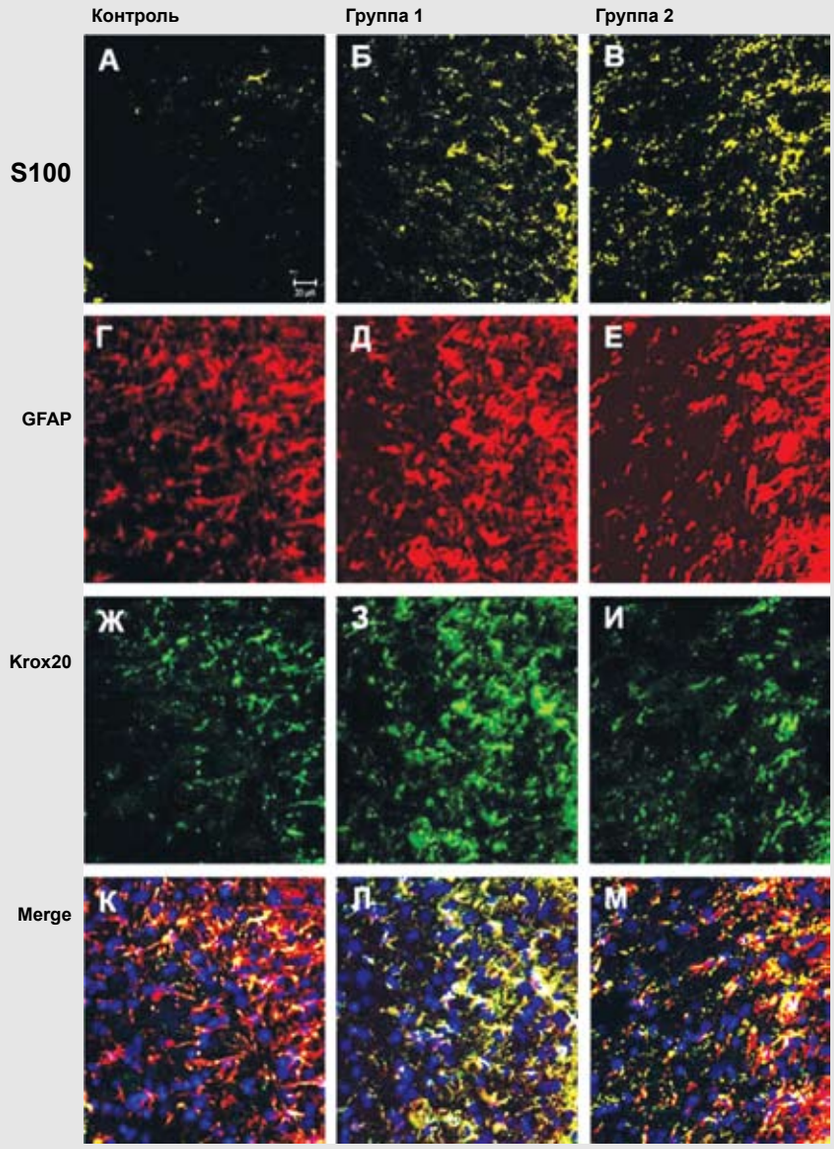

Рис. 2.
Спинной мозг крыс.
Экспрессия S100, GFAP и Krox20 в области вхождения задних корешков на расстоянии 1 см каудальнее эпицентра травмы:
А, Г, Ж, К – контрольная группа животных;
Б, Д, З, Л – 1 экспериментальная группа с ведением мононуклеарных клеток крови пуповины, трансфицированных плазмидой pBud-VEGF-FGF2;
В, Е, И, М – 2 экспериментальная группа с ведением плазмиды pBud-VEGF-FGF2 в большей концентрации;
К, Л, М – объединение панелей по всем трем маркерам (Merge).
Иммуногистохимическая реакция.
Ув.: ×400

Для обеих опытных групп в указанной области серого вещества характерно: наличие S100$^+$-клеток и единичных Krox20$^+$-клеток, присутствие GFAP$^+$-клеток, GFAP$^+$/Krox20$^+$-клеток и S100$^+$/GFAP$^+$/Krox20$^+$-клеток. При этом в случае доставки генов нейротрофических факторов *vegf* и *fgf2* на клеточных носителях (1 опытная группа) по сравнению с прямым введением плазмиды с терапевтическими генами (2 опытная группа) популяция S100$^+$/GFAP$^+$/Krox20$^+$-клеток представляется наибольшей (рис. 2Л). В указанной области вхождения задних корешков в 1 опытной группе особенно выражена популяция GFAP$^+$/Krox20$^+$-клеток, являющаяся также самой многочисленной в материале всех экспериментальных групп (рис. 2Д, 3). Для 2 опытной группы в области вхождения задних корешков характерно наличие большего количества S100$^+$-клеток (рис. 2В) и GFAP$^+$-клеток (рис. 2Е). В белом и сером веществе для всех экспериментальных групп характерно наличие единичных S100$^+$-клеток округлой формы. Отмечены различия в имеющихся размерах тел и отростков S100$^+$/GFAP$^+$/Krox20$^+$-клеток в белом и сером веществах, характерные для опытных и контрольной групп. Так, размер шванновских клеток, одновременно экспрессирующих белки S100, GFAP и транскрипционный фактор Krox20, в зонах белого вещества в 2 раза больше, чем в сером веществе и задних канатиках.

При тройном иммунофлуоресцентом окрашивании с помощью антител против HSP25, GFAP и Krox20 в белом веществе выявлены клетки, экспрессирующие все три указанных маркера (HSP25$^+$/GFAP$^+$/Krox20$^+$-клетки). В сером веществе и в области вхождения задних корешков данные клетки не обнаружены. Наибольшее количество HSP25$^+$/GFAP$^+$/Krox20$^+$-клеток в области задних канатиков характерно для 1опытной группы с доставкой генов *vegf* и *fgf2* на клеточных носителях. Для 2 опытной группы с прямой доставкой плазмиды с теми же генами этот показатель снижен в 2 раза. В контрольной группе HSP25/GFAP/Krox20$^+$-клетки в области задних канатиков отсутствуют, наблюдаются лишь единичные GFAP$^+$/Krox20$^+$-клетки и большое количество GFAP$^+$-клеток. HSP25$^+$-клетки в области вхождения задних корешков обнаружены лишь в 1 опытной группе.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что доставка генов *vegf* и *fgf2* приводит к увеличению количества эндогенных шванновских клеток в области повреждения спинного мозга. Данный феномен можно объяснить либо увеличением срока выживания эндогенных шванновских клеток, либо повышением их способности к миграции в область повреждения и пролиферации. Эти данные согласуются с показанной Haninec P. возможностью плазмиды с геном сосудистого эндотелиального фактора роста (*vegf)* усиливать пролиферацию шванновских клеток, увеличивать экспрессию в них белка *vegf*, тем самым улучшая способность к регенерации аксонов [10]. Способность усиливать пролиферацию шванновских клеток in vitro установлена и для фактора роста фибробластов 2 (*fgf2*) [11].

Транскрипционный фактор Krox20 является надежным маркером миелинобразующих шванновских клеток и также экспрессируется клетками пограничной шапочки, которые активно мигрируют в область повреждения, где дифференцируются в шванновские клетки [12]. Начало экспрессии Krox20 приурочено к стадии перехода предшественников в зрелые клетки [6]. Наличие белка S100 специфично как для астроцитарной глии, так и для незрелых шванновских клеток. Ранее GFAP считался высоко специфичным только для зрелых астроцитов, но исследования последних лет показали экспрессию данного белка в миелиннеобразующих шванновских клетках [13]. Обнаружение S100$^+$/GFAP$^+$/Krox20$^+$-клеток в нашем исследовании может свидетельствовать о наличии мигрирующих в спинной мозг шванновских клетках на стадии неполной дифференцировки в миелинобразующий клеточный тип. При этом среди всей популяции мигрировавших шванновских клеток встречаются и зрелые Krox20$^+$-клетки, способные к миелинизации аксонов. Увеличение количества Krox20$^+$-клеток в 1 опытной группе по сравнению с остальными группами животных как в белом веществе, так и в области вхождения задних корешков говорит о стимулировании миграции и дифференцировке шванновских клеток в большей степени при доставке генов *vegf* и *fgf2* при помощи мононуклеарных клеток крови пуповины человека. Наиболее вероятно, что это связано со способностью к длительному выживанию трансплантированных клеток и поддержанию продукции ими терапевтических молекул. Способность к стимулированию миграции шванновских клеток в случае прямого введения плазмиды с генами *vegf* и *fgf2* также имеет место, однако более низкие показатели по сравнению с 1 опытной группой, могут быть связаны с их низкой трансфекционной активностью при этом способе доставки или кратковременной продукцией нейротрофических факторов.

Белок теплового шока HSP25 играет центральную роль в системе сигнализации, которая обеспечивает регенерацию нервных волокон [14]. Ранее показано, что HSP25 экспрессируется в глиальных клетках, в том числе реактивных астроцитах, находящихся в сером веществе [15]. По экспрессии белка теплового шока HSP25 в глиальных клетках можно судить о включении цитопротекторного механизма. Нами впервые обнаружена экспрессия белка теплового шока HSP25 в GFAP$^+$/Krox20$^+$-шванновских клетках, мигрировавших в белое вещество области повреждения. Отсутствие HSP25$^+$/GFAP$^+$/Krox20$^+$-клеток в области вхождения задних корешков и их наличие в белом веществе может свидетельствовать о возможном становлении реактивности шванновских клеток после их миграции в область демиелинизации, либо о приобретении ими дополнительных защитных свойств в связи с изменением микроокружения.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что доставка генов *vegf* и *fgf2* при помощи мононуклеарных клеток крови пуповины человека в большей степени поддерживает миграционный потенциал и стимулирует дифференцировку заселяющих область повреждения эндогенных шванновских клеток. Тем не менее, усилить влияние прямой генной терапии представляется возможным с помощью создания безопасных невирусных векторов с высокой трансфекционной активностью.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке государственного контракта ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации № 16.512.11.2101 и гранта ОПТЭК 2012 г. Работа частично выполнена на оборудовании Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Челышев Ю.А., Викторов И.В. Клеточные технологии ремиелинизации при травме спинного мозга. Неврологический вестник 2009; 41(1): 49–55.
2. Frostick S.P., Yin Q., Kemp G.J. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. Microsurgery 1998; 18(7): 397–405.
3. Boyd J.G., Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. Mol. Neurobiol. 2003; 27(3): 277–324.
4. Höke A., Mi R. In search of novel treatments for peripheral neuropathies and nerve regeneration. Discov. Med. 2007; 7(39): 109–12.
5. Jasmin L., Janni G., Moallem T.M. et al. Schwann cells are removed from the spinal cord after effecting recovery from paraplegia. J. Neurosci. 2000; 20(24): 9215–23.
6. Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Архипова С.С. и др. Экспрессия молекулярных детерминант шванновских клеток и периферического миелина в спинном мозге крысы при контузионной травме. Морфологические ведомости 2011; 6: 73–7.
7. Cao L., Zhu Y.L., Su Z. et al. Olfactory ensheathing cells promote migration of Schwann cells by secreted nerve growth factor. Glia 2007; 55(9): 897–904.
8. Hill C.E., Moon L.D., Wood P.M. Labeled Schwann cell transplantation: cell loss, host Schwann cell replacement, and strategies to enhance survival. Glia 2006; 53(3): 338–43.
9. Rizvanov A.A., Guseva D.S., Salafutdinov I.I. et al. Genetically modified human umbilical cord blood cells expressing VEGF and FGF2 differentiate into glial cells after transplantation into amyotrophic lateral sclerosis (ALS) transgenic mice. Exper. Biol. Med. 2011; 236(1): 91–8.
10. Haninec P., Kaiser R., Bobek V. et al. Enhancement of musculocutaneous nerve reinnervation after vascular endothelial growth factor (VEGF) gene therapy. BMC Neuroscience. In press 2012.
11. Shen B., Pei F.X., Chen J. et al. Effect of controlled release microspheres incorporating bFGF on Schwann cells. Sichuan Xue Ban. 2005; 36(6): 873–6.
12. Zujovic V., Thibaud J., Bachelin C. et al. Boundary cap cells are highly competitive for CNS remyelination: fast migration and Efficient differentiation in PNS and CNS myelin-forming cells. Stem Cells 2010; 28: 470–79.
13. Wang J., Zhang P., Wang Y. et al. The observation of phenotypic changes of Schwann cells after rat sciatic nerve injury. Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 2010; 38(1): 24–8.
14. Murashov A.K., Haq I.U., Hill C. et al. Crosstalk between p38, Hsp25 and Akt in spinal motor neurons after sciatic nerve injury. Brain Res. Mol. 2001; 93(2): 199–208.
15. Pieri I., Cifuentes-Diaz C., Oudinet J.P. Modulation of HSP25 expression during anterior horn motor neuron degeneration in the paralysé mouse mutant. J. Neurosci. Res. 2001; 65(3): 247–53.

Поступила 10.08.2012