

Посттравматические реакции спинного мозга крысы при трансплантации клеток обонятельной выстилки человека

Г.Ф. Шаймарданова¹, Ю.А. Чельшев^{2,3}, С.В. Лебедев⁴, Е.А. Савченко⁴,
И.В. Викторов⁴, А.В. Карасёв⁴, В.П. Чехонин⁴

¹ Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, Казань

² Казанский государственный медицинский университет, Казань

³ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

⁴ Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского, Москва

Post-traumatic reactions of a rat spinal cord after transplantation of human olfactory mucosa cells

G.F. Shajmardanova¹, Yu.A. Chelyshev^{2,3}, S.V. Lebedev⁴, E.A. Savchenko⁴, I.V. Viktorov⁴,
A.V. Karasjov⁴, V.P. Chehonin⁴

¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics KSC RAS, Kazan

² Kazan State Medical University, Kazan

³ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

⁴ V.P. Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Moscow

На модели контузионной травмы спинного мозга крысы на уровне Th9 исследовано влияние на структуру спинного мозга немедленной трансплантации клеток обонятельной выстилки человека в область повреждения. Без иммуносупрессии введенные клетки присутствуют в белом веществе не менее 7 сут. после трансплантации на расстоянии 2 см от точек введения как в ростральном, так и в каудальном направлениях. Показана их миграция в область очага повреждения и скопление по его периферии. При введении клеток установлено значимое уменьшение области деструкции к 30 и 60 сут. эксперимента в сером и, особенно, в белом веществе. Трансплантация клеток к 30 сут. вызывает существенное снижение размеров патологических полостей в белом веществе с наибольшим проявлением эффекта в передних канатиках. В непосредственной близости от области введения клеток (на расстоянии 3 мм от эпицентра травмы) показано увеличение количества сохранённых миелиновых волокон белого вещества.

Ключевые слова: травма спинного мозга, клетки обонятельной выстилки, трансплантация.

Контузионная травма спинного мозга (КТСМ) вызывает комплекс патологических сдвигов, включающий гибель нейронов и глиальных клеток, дегенерацию нервных волокон, демиелинизацию, активацию микроглии и макрофагов. Эти нарушения являются причиной устойчивого функционального дефицита, усугубляемого естественными лимитирующими нейрорегенерацию факторами в ЦНС. Среди кажущихся перспективными немногочисленных экспериментальных подходов стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга одно из ведущих мест принадлежит клеточной терапии. Трансплантируемые клетки необходимы для восстановления тканевого матрикса и формирования направляющих путей для роста аксонов, поддержания выживания нейронов и глиальных клеток, удлинения аксонов, стимулирования процесса миелинизации. На сегодняшний день одним из критериев отбора клеток, предназначенных для трансплантации, становится возможность трансфекции терапевтическими генами с высокой эффективностью их экспрессии в ткани реципиента. Этим

в модели контузионной травмы спинного мозга крысы на уровне Th9 исследовано влияние на структуру спинного мозга немедленной трансплантации клеток обонятельной выстилки человека в область повреждения. Без иммуносупрессии введенные клетки присутствуют в белом веществе не менее 7 сут. после трансплантации на расстоянии 2 см от точек введения как в ростральном, так и в каудальном направлениях. Показана их миграция в область очага повреждения и скопление по его периферии. При введении клеток установлено значимое уменьшение области деструкции к 30 и 60 сут. эксперимента в сером и, особенно, в белом веществе. Трансплантация клеток к 30 сут. вызывает существенное снижение размеров патологических полостей в белом веществе с наибольшим проявлением эффекта в передних канатиках. В непосредственной близости от области введения клеток (на расстоянии 3 мм от эпицентра травмы) показано увеличение количества сохранённых миелиновых волокон белого вещества.

Key words: spinal cord injury, olfactory mucosa cell, transplantation.

условиям в разной степени удовлетворяют клетки нескольких типов, трансплантируемых при экспериментальной травме спинного мозга. Особый интерес вызывают работы, выполненные с трансплантацией мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и нейральных (глиальных) клеток обонятельных структур, обонятельной луковицы и особенно обонятельной выстилки (КОВ). Последние улучшают восстановление функции при травме спинного мозга у грызунов, что послужило основанием для проведения клинических испытаний в некоторых странах [15]. КОВ человека обладают способностью стимулировать регенерацию и миелинизацию поврежденных аксонов спинного мозга крысы и частично восстанавливать двигательную и чувствительную функции [1, 2, 6]. КОВ продуцируют комплекс нейротрофических факторов, белки внеклеточного матрикса и молекулы адгезии нервных клеток. Интерес к КОВ подкреплен возможностью аутоотрансплантации, не приводящей к длительному нарушению обоняния. Несмотря на значительное количество исследований с применением клеток дан-

e-mail: gulnara_kzn@rambler.ru

ного типа для трансплантаций в спинной мозг, многие вопросы их поведения в ткани реципиента, а также влияние на конкретные события посттравматической дегенерации спинного мозга остаются неясными.

Нашими предыдущими исследованиями на модели КТСМ крысы показано, что трансплантация КОВ человека в область травматического повреждения обеспечивает улучшение двигательной функции в среднем на 11% (по критерию BBB) [3]. В настоящей работе на той же экспериментальной модели проведена оценка эффективности трансплантации КОВ человека на основе морфологических критериев.

Материал и методы

Работа выполнена на 37 крысах весом 250–300 г. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и пище. Животных после КТСМ, проводимой на уровне Th9 под наркозом по ранее описанной методике [4], разделили на опытную ($n = 18$) и контрольную ($n = 19$) группы. Сразу после контузии животным опытной группы в две точки ростральнее и каудальнее от эпицентра травмы вводили КОВ человека в количестве 1,5 млн клеток на крысу. Животным контрольной группы проводили аналогичные инъекции, но без клеток. Методики получения, культивирования и введения КОВ описаны ранее [2, 3].

Через 7, 30 и 60 сут. после травмы животных наркотизировали и транкардиально перфузировали охлажденным (4°C) 4% раствором параформальдегида. Забирали фрагмент спинного мозга длиной 5 см вместе с позвонками. Через 12 ч от начала фиксации спинной мозг отделяли от позвонков, разделяли на 5 фрагментов длиной 1 см каждый, нумеровали их с рострального конца для дофиксации и последующей идентификации.

Материал, эксплантированный на 7 сут. после операции, выдерживали в 30% растворе сахарозы и использовали для изготовления криостатных срезов, в которых визуализировали меченые CFDA-SE трансплантированные КОВ с помощью микроскопа Zeiss Axio Imager A1 в режиме флуоресценции. Ядра клеток дополнительно окрашивали специфическим красителем ДНК – DAPI (Sigma) – в концентрации 10 мкг/мл в течение 10 мин. Срезы промывали в PBS (3 раза по 15 мин), заключали в глицерин и просматривали на конфокальном сканирующем микроскопе LSM 510-Meta (Carl Zeiss).

Материал, забранный на 30 и 60 сут. после операции, дофиксировали в глутаральдегиде и четырехокси осмия, обезвоживали и заливали в эпон 812. На ультрамикротоме LKB III получали полутонкие поперечные срезы спинного мозга для морфометрии и ультратонкие срезы для электронномикроскопического исследования.

На полутонких срезах, окрашенных метиленовым синим, измеряли площадь области деструкции серого и белого веществ в эпицентре и на расстоянии 3, 5, 16 и 24 мм; считали суммарную площадь патологических полостей и количество миелиновых волокон на расстоянии 3 и 5 мм ростральнее и каудальнее эпицентра травмы в 4 зонах белого вещества: 1 зона – вентро-медиальная часть переднего канатика, правая сторона; 2 – то же, левая сторона; 3 – латеральная часть бокового канатика в пределах фронтальной плоскости, проходящей через центральный канал, правая сторона; 4 – то же, левая

сторона. Суммарную площадь патологических полостей и количество миелиновых волокон оценивали в площади среза 0,09 мм² при увеличении $\times 250$. Суммарную площадь поврежденного серого и белого вещества измеряли при увеличении $\times 40$. Морфометрию осуществляли на микроскопе Carl Zeiss JENS NU2.

Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. В пределах тех же 4 зон с помощью электронного микроскопа JEM-1200 EX подсчитывали количество миелиновых волокон диаметром не более 9 мкм в трех полях зрения при увеличении $\times 8000$. Для статистической обработки результатов применяли t-критерий Стьюдента.

Результаты

КТСМ вызывает глубокие деструктивные изменения, как в сером, так и в белом веществе. Общая их картина на данной модели у крысы детально описана нами ранее [5]. Меченые CFDA-SE трансплантированные КОВ человека выявлены в дорсальном отделе белого вещества (рис. 1) через 7 сут. после КТСМ и одновременного введения клеток. Трансплантируемые КОВ выживают в поврежденной ткани и мигрируют из точки введения на расстояние до 2 см как в ростральном, так и в каудальном направлениях. Кроме того, они мигрируют в область очага и скапливаются преимущественно по его периферии. Меченые CFDA-SE клетки присутствуют в сохраненной ткани белого вещества, проникая также в формирующиеся патологические полости.

К 30 сут. эксперимента на всех изучаемых расстояниях от эпицентра травматического повреждения в группе животных с трансплантацией клеток установлено уменьшение области деструкции серого вещества. Так, в эпицентре площадь этой области на поперечных срезах спинного мозга в опыте более чем в 3 раза меньше, чем в контроле (рис. 2А). Различия по данному показателю к 60 сут. эксперимента уменьшается в большинстве исследованных плоскостей, проходящих на различном расстоянии от эпицентра травмы, площадь области повреждения серого вещества в опыте сохраняется достоверно меньшей, чем в контроле. Эта тенденция прослеживается как в ростральном, так и в каудальном фрагментах (рис. 2Б).

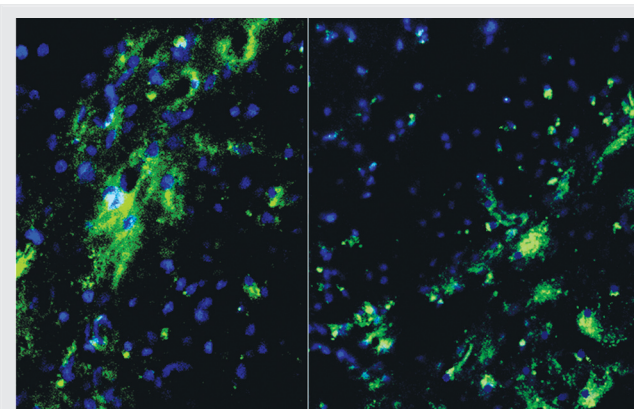


Рис. 1. КОВ человека, меченые CFDA-SE, на расстоянии 7 мм каудальнее эпицентра травмы, 7 сут. после их трансплантации в спинной мозг крысы. Свечение CFDA-SE (зеленый цвет), ядра окрашены DAPI (синий цвет). Конфокальная микроскопия. Ув. $\times 400$

На тех же сроках эксперимента наиболее выраженное уменьшение площади деструкции в опыте выявлено в белом веществе. Однако эти различия статистически значимы только в эпицентре травмы и в непосредственной близости от него (рис. 2В, Г).

Микрокисты формировались в первые сутки и к 5–7 сут. сливались, образуя патологические полости преимущественно в белом веществе. Ранее на данной экспериментальной модели нами отмечено увеличение суммарной площади полостей в ходе развития патологического процесса, что прослежено вплоть до 60 сут. эксперимента [5]. Обращает на себя внимание значительное увеличение этого показателя по мере приближения к эпицентру травмы, что в наибольшей мере проявляется в зонах 1 и 2.

Через 30 сут. после КТСМ на расстоянии 5 мм от эпицентра травмы в передних канатиках (зоны 1 и 2) у животных опытной группы выявлено существенное снижение суммарной площади патологических полостей, по сравнению с контрольной группой. Так, при трансплантации КОВ в зоне 1 каудального фрагмента этот показатель уменьшался в

8 раз ($P < 0,05$), а в зоне 2 – в 10 раз ($p < 0,05$). Различия по этому показателю в наружных отделах боковых канатиков (зоны 3 и 4) не зарегистрированы.

Наиболее явные сдвиги показателя суммарной площади патологических полостей в белом веществе спинного мозга прослежены в опытной группе на расстоянии 3 мм от эпицентра. Они наиболее выражены в белом веществе передних канатиков (зона 1 и особенно зона 2). В зоне 1 этот показатель при трансплантации клеток меньше в 3,6 раз ($p < 0,05$), в зоне 2 – в 16 раз, в зонах 3 и 4 – в 2 раза ($p < 0,05$).

На расстоянии 3 и 5 мм от эпицентра травматического повреждения, как в ростральном, так и каудальном направлении отмечена выраженная деструкция миелиновых волокон в белом веществе к 60 сут. после повреждения. Она характеризовалась глубокими нарушениями структуры миелиновой оболочки, расслоением миелина и образованием крупных вакуолей по периферии волокон большого диаметра (рис. 3А, В). Присутствовали остатки

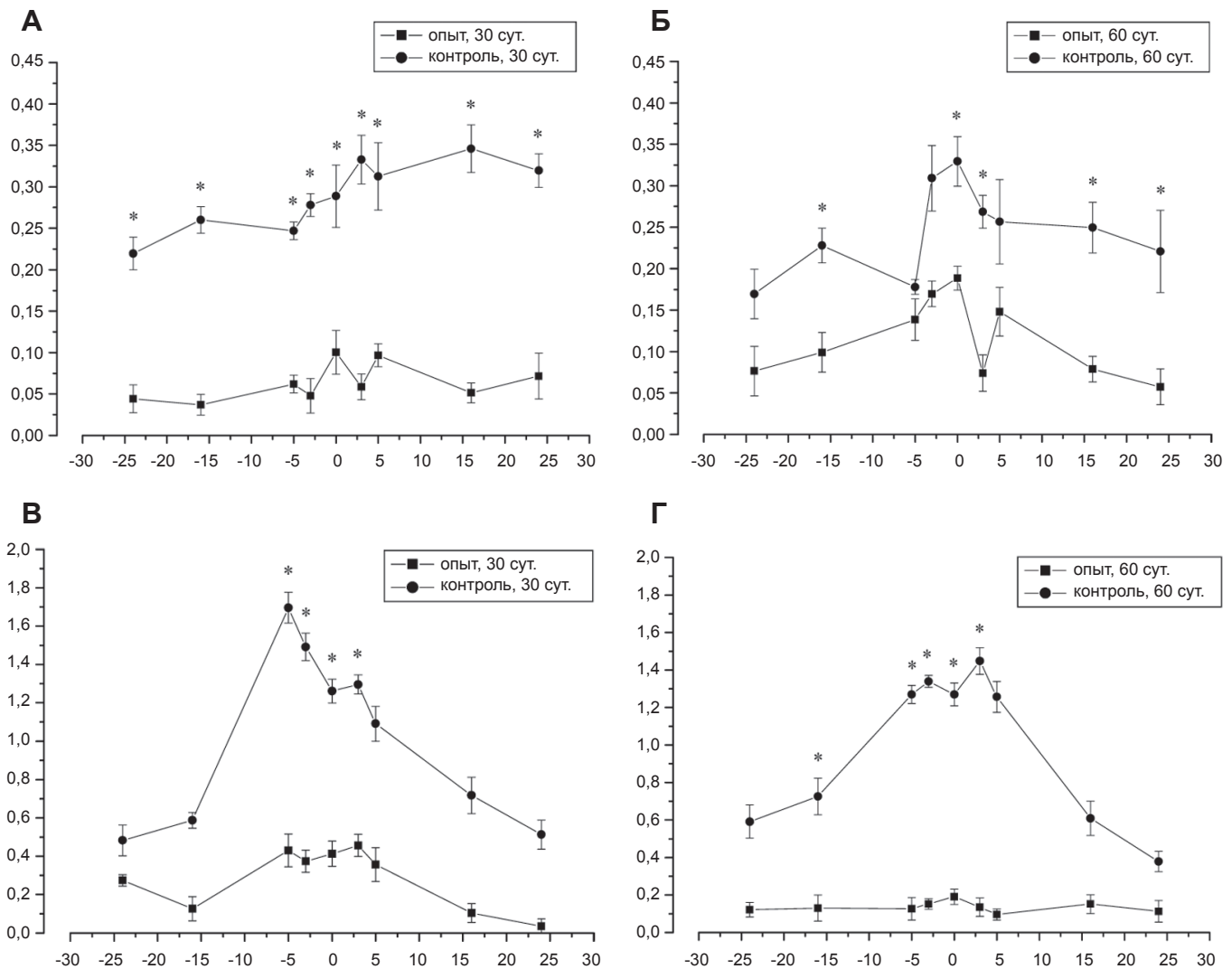


Рис. 2. Площадь (по оси ординат, мм²) области деструкции в сером (А, Б) и (В, Г) белом веществе в поперечном срезе спинного мозга на различном расстоянии от эпицентра травмы, 30 и 60 сут. после травмы.

По оси абсцисс: слева от «0» – в каудальном, справа от «0» – в ростральном направлении.

* – $p < 0,05$ при сравнении показателей групп опыта и контроля

миелиновой оболочки с фрагментами аксонов или с полностью разрушенными аксонами. В большинстве миелиновых волокон аксоны сохранены, их структура значительно изменена. Считается, что подобные волокна могут проводить импульсы, но с существенно меньшей скоростью [12]. К 60 сут. в опыте, т.е. при введении КОВ, практически во всех зонах и особенно в боковых канатиках, чаще встречались миелиновые волокна небольшого диаметра и безмиелиновые волокна с незначительными структурными изменениями в виде редких областей повышенной электронной плотности миелина, некоторой его нечеткостью и незначительными участками расслоения, появления небольших вакуолей в периаксональном пространстве с редкими фрагментами внутренних мембран миелина или островков гомогенного материала (рис. 3Г).

На расстоянии 5 мм каудальнее эпикала не выявлено достоверного преобладания количества миелиновых волокон в опытной группе животных. В этой группе сохраненные миелиновые волокна имели больший диаметр. В зонах 2 и 4 (левая сторона, соответственно передние и боковые канатики) количество сохраненных миелиновых волокон в группе животных с введением клеток меньше, чем в соответствующем контроле. Это уменьшение может быть следствием дополнительной травмы в ходе

осуществления процедуры введения КОВ в данную точку.

Однако на расстоянии 3 мм от эпикала травмы практически во всех исследованных областях белого вещества количество миелиновых волокон в опытной группе превышало их количество в контроле. В зоне 1 этот показатель при трансплантации клеток больше в 1,5 раза ($p < 0,05$), в зоне 3 – в 2 раза ($p < 0,05$). Аналогичная позитивная картина соотношения количества сохраненных миелиновых волокон в контроле и опыте отмечена на соответствующих расстояниях в ретроградном направлении от эпикала травматического повреждения.

На сроке 60 сут. после операции в зонах 2 и 3 на расстоянии 3 мм от эпикала травмы, как в ретроградном, так и в каудальном направлении, с помощью электронного микроскопа установлено увеличение количества миелиновых волокон в опытной группе в 1,6 раза ($p < 0,05$) с преобладанием волокон диаметром менее 2 мкм.

Обсуждение

В отношении миграционного потенциала и способности поддерживать рост аксонов КОВ не проявляют уникальных свойств [14]. Будучи введенными в грудной отдел интактного спинного мозга иммунодефицитных крыс, КОВ к 7 сут. мигрируют

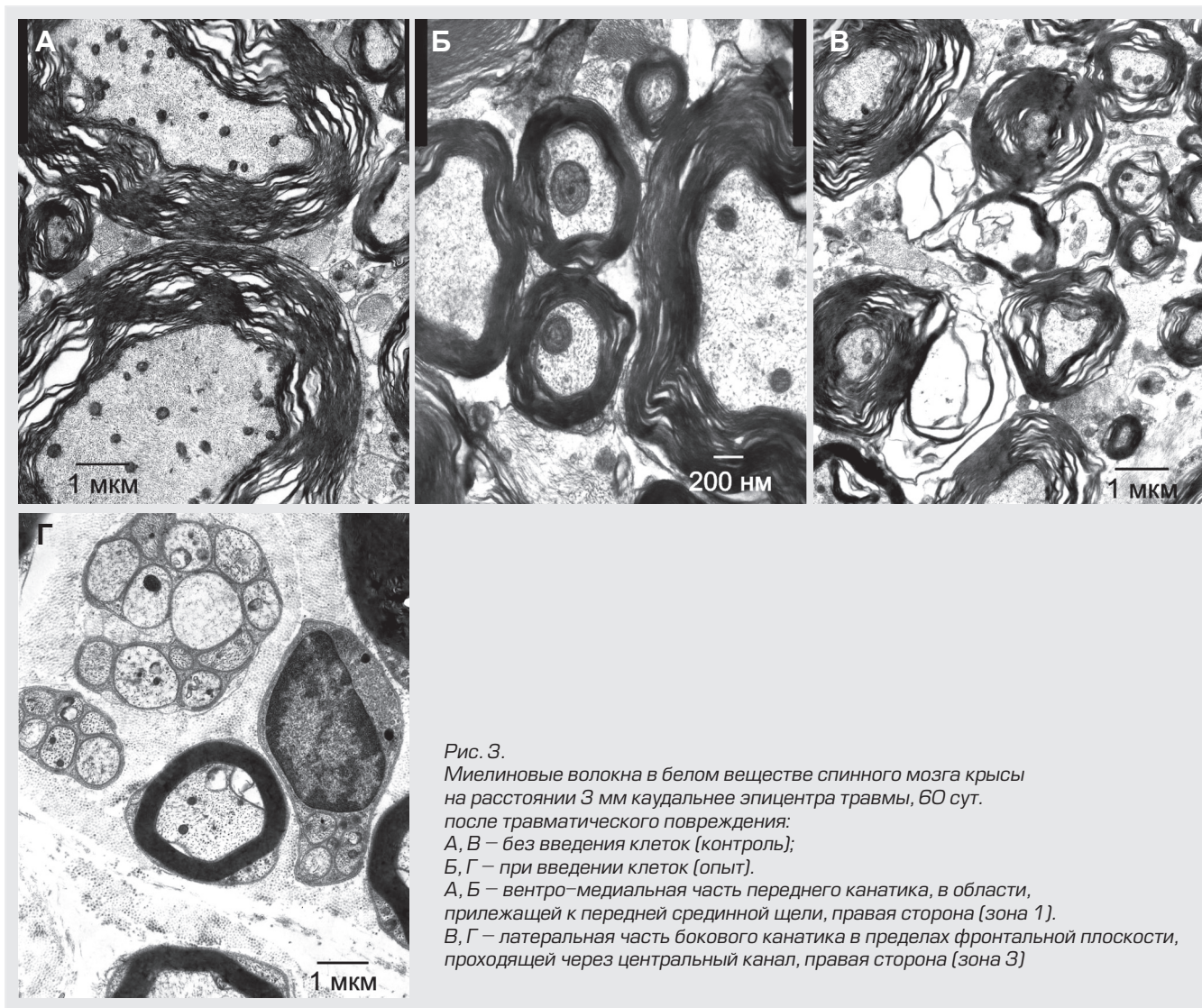


Рис. 3.

Миелиновые волокна в белом веществе спинного мозга крысы на расстоянии 3 мм каудальнее эпикала травмы, 60 сут.

после травматического повреждения:
А, В – без введения клеток (контроль);

Б, Г – при введении клеток (опыт).

А, Б – вентро-медиальная часть переднего канатика, в области, прилежащей к передней срединной щели, правая сторона (зона 1).

В, Г – латеральная часть бокового канатика в пределах фронтальной плоскости, проходящей через центральный канал, правая сторона (зона 3)

на расстояние не более 1 мм. При этом в условиях гемисекции спинного мозга, на контралатеральной от места введения клеток стороне их способность к миграции уменьшается в 1,5–2 раза [8]. Это снижение миграционного потенциала трансплантируемых клеток может быть следствием формирования глиального рубца. Однако на модели передавливания дорсального отдела спинного мозга крысы показана миграция трансплантируемых КОВ на расстояние в 25 мм в условиях введения клеток через 2 нед. после травмы [7], когда рубец уже сформирован. В наших экспериментах появление трансплантированных в спинной мозг КОВ на удалении от места инъекции может быть связано с их пассивным перемещением вследствие развития отека и напряжения ткани в области травматического повреждения. В отношении КОВ при их трансплантации в спинной мозг допускается возможность подобного неактивного перемещения [7]. В отношении способности к миграции трансплантированных в спинной мозг КОВ наши данные более близки результатам исследования Li et al. [13], полученным на модели бокового амиотрофического склероза у трансгенных по супероксиддисмутазе SOD1(G93A) крыс при трансплантации КОВ в область дорсальных канатиков. Авторы этой работы показали возможность миграции трансплантированных КОВ в спинном мозге реципиента на расстояние 4,2 мм при их выживании в течение более 4 нед. При этом зарегистрировано существенное снижение гибели мотонейронов и стимулирование процесса ремиелинизации.

При травме спинного мозга, при которой область повреждения достаточно обширна, миграционный по-

тенциал трансплантируемых клеток представляется крайне важным для нейрорегенерации. Он особенно значим для сдерживания процесса дегенерации миелиновых волокон и для стимулирования их ремиелинизации на всем протяжении области деструкции, начиная от эпицентра травмы и заканчивая зоной сохраненной ткани с интактными волокнами.

Выявленное нами уменьшение патологической кавитации при трансплантации КОВ человека в спинной мозг крысы согласуется с результатами трансплантации подобных клеток от человека, приматов и грызунов в спинной мозг крысы на моделях контузионной травмы [9], фотохимического повреждения [17], компрессии дорсо-латерального отдела [16] и полной перерезки [10, 11].

Представляется достаточно вероятным, что КОВ человека, благодаря своей способности продуцировать нейротрофические факторы, молекулы адгезии и внеклеточного матрикса, а также стимулировать миграцию шванновских клеток в очаг повреждения спинного мозга, создают благоприятные условия для ремиелинизации и восстановления функции.

Механизм позитивного влияния трансплантации КОВ при травме спинного мозга остается неясным. В последнее время высказывается предположение о проявлении со стороны КОВ свойств иммунокомпетентных клеток и их способности модулировать выраженность процесса воспаления и вторичного повреждения в области травмы спинного мозга [9, 11].

Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ (№ 07-04-00746, № 08-04-01167) и Минобрнауки РФ РНП-2.1.1/6183.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Викторов И.В., Савченко Е.А., Чехонин В.П. Спонтанная нейральная дифференциация стволовых клеток в культуре обонятельного эпителия человека. Клеточные технологии в биологии и медицине 2007; 4: 183–8.
2. Викторов И.В., Савченко Е.А., Чехонин В.П. Глиальные и мультипотентные стволовые клетки: перспективы их использования в нейротрансплантологии. В: Пальцев М.А., редактор. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Том 2. Москва: «Медицина», «Шико»; 2009. С.190–210.
3. Лебедев С.В., Карасев А.В., Чехонин В.П. и др. Исследование эффективности трансплантации нейральных стволовых клеток человека крысам с травмой спинного мозга: применение функциональных нагрузочных тестов и метода ВВВ. Бюлл. эксп. биол. и мед. 2010; 149(3): 355–60.
4. Лебедев С.В., Тимофеев С.В., Жарков А.В. и др. Нагрузочные тесты и метод ВВВ при оценке двигательных нарушений у крыс после контузионной травмы спинного мозга. Бюлл. эксп. биол. и мед. 2008; 145(10): 471–6.
5. Масгутова Г.А., Чельшев Ю.А., Жарков А.В. и др. Динамика морфологических изменений спинного мозга крысы после контузионной травмы различной степени тяжести. Морфологические ведомости 2008; 1-2: 80–3.
6. Чельшев Ю.А., Викторов И.В. Клеточные технологии ремиелинизации при травме спинного мозга. Неврологический вестник 2009; 1: 49–55.
7. Andrews M.R., Stelzner D.J. Evaluation of olfactory ensheathing and schwann cells after implantation into a dorsal injury of adult rat spinal cord. Neurotrauma 2007; 24(11): 1773–92.
8. Deng C., Gorrie C., Hayward I. et al. Survival and migration of human and rat olfactory ensheathing cells in intact and injured spinal cord. J. Neurosci. Res. 2006; 83(7): 1201–12.

9. Gorrie C.A., Hayward I., Cameron N. et al. Effects of human OEC-derived cell transplants in rodent spinal cord contusion injury. Brain Res. 2010; 1337: 8–20.

10. Guest J.D., Herrera L., Margitich I. et al. Xenografts of expanded primate olfactory ensheathing glia support transient behavioral recovery that is independent of serotonergic or corticospinal axonal regeneration in nude rats following spinal cord transection. Exp. Neurol. 2008; 212: 261–74.

11. Kalincik T., Jozefcikova K., Sutharsan R. et al. Selected changes in spinal cord morphology after T4 transection and olfactory ensheathing cell transplantation. Auton. Neurosci. 2010; 158(1-2): 31–8.

12. Lasiene J., Shupe L., Perlmutter S. et al. No evidence for chronic demyelination in spared axons after spinal cord injury in a mouse. J. Neurosci. 2008; 28(15): 3887–96.

13. Li Y., Bao J., Khatibi N.H., Chen L. et al. Olfactory ensheathing cell transplantation into spinal cord prolongs the survival of mutant SOD1(G93A) ALS rats through neuroprotection and remyelination. Anat Rec (Hoboken). 2011; 294(5): 847–57.

14. Lu P., Yang H., Culbertson M. et al. Olfactory ensheathing cells do not exhibit unique migratory or axonal growth-promoting properties after spinal cord injury. J. Neurosci. 2006; 26(43): 11120–30.

15. Radtke C., Sasaki M., Lankford K.L. et al. Potential of olfactory ensheathing cells for cell-based therapy in spinal cord injury. J. Rehabilitation Research & Development. 2008; 45(1): 141–52.

16. Richter, M.W., Fletcher, P.A., Liu, J. et al. Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord. J. Neurosci. 2005; 25: 10700–11.

17. Verdú E., García-Álías G., Forés J. et al. Effects of ensheathing cells transplanted into photochemically damaged spinal cord. Neuroreport 2001; 12(11): 2303–09.

Поступила 20.03.2011