

УДК 57.084-089.6:615.018.82.013.014.41



Сукач А. Н., Лебединский А. С., Оченашко О. В., Петренко А. Ю.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

e-mail: an_sukach@ukr.net

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ НЕЙРАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПЛОДОВ КРЫС В СОСТАВЕ СУСПЕНЗИИ И МНОГОКЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТОВ КРЫСАМ С ПОВРЕЖДЕНИЕМ СПИННОГО МОЗГА

РЕЗЮМЕ

Клеточная трансплантация является одним из перспективных подходов в лечении повреждений спинного мозга. Целью работы было изучение влияния трансплантации криоконсервированных нейральных клеток плодов крыс в составе суспензии и агрегатов на восстановление двигательной активности крыс с экспериментальным повреждением спинного мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Клетки выделяли из тканей головного мозга плодов крыс 15-16 дней гестации. Формирование агрегатов осуществляли в процессе краткосрочного культивирования клеток в концентрации $8 \cdot 10^6$ /мл среды в присутствии 10 % сыворотки крыс. Трансплантацию клеток проводили в зону повреждения спинного мозга в составе агрегатов и суспензии. Для фиксации трансплантированных клеток в зоне повреждения использовали альгинатный гель.

РЕЗУЛЬТАТЫ. При трансплантации в зону повреждения гетерогенной суспензии криоконсервированных нейральных клеток плодов крыс, заключенных в альгинатный гель, наблюдалась положительная динамика восстановления двигательной активности крыс, что проявлялось в обширной подвижности трех суставов одной конечности и ограниченной подвижности двух суставов другой, с одновременным восстановлением чувствительности задних конечностей.

ВЫВОДЫ. На модели повреждения спинного мозга у крыс криоконсервированные агрегаты фетальных нейральных клеток обладают более высоким терапевтическим потенциалом по сравнению с суспензией клеток, улучшая структуру формируемой нервной ткани и увеличивая скорость восстановления подвижности задних конечностей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: культура нейральных клеток, криоконсервирование клеток, повреждение спинного мозга, трансплантация клеток.

В настоящее время не существует эффективных методов лечения повреждений спинного мозга. Это объясняется отсутствием эффективных способов регенерации погибших нейронов и восстановления поврежденной структуры спинного мозга. Одним из методов, позволяющих надеяться на решение данной проблемы, является клеточная терапия. Однако на сегодняшний день положительный опыт применения стволовых клеток (СК) для лечения травматической болезни спинного мозга минимален. Это связано как с низкой степенью их выживания, вследствие неблагоприятного микроокру-

жения, так и с не вполне понятными механизмами их интеграции в поврежденную ткань спинного мозга. Эти проблемы перекликаются также с вопросом определения оптимального источника клеток [1] и выбором оптимального способа трансплантации клеток, способствующего их выживанию и восстановлению поврежденной цитоархитектоники ткани спинного мозга.

В настоящее время определенные надежды возлагаются на использование в клеточной терапии трехмерных клеточных систем [2-4]. В качестве таких систем, используемых для терапии повреждений

спинного мозга, могут выступать многоклеточные агрегаты, формируемые изолированными нейральными клетками (НК), в которых создаются условия для выживания и эффективного функционирования нейральных стволовых/прогениторных клеток [5-7].

Широкое применение СК в клеточной терапии повреждений спинного мозга также невозможно без создания доступного запаса клеток, что требует разработки способов их длительного хранения, наиболее предпочтительным из которых является криоконсервирование.

Таким образом, целью настоящего исследования явилось изучение влияния трансплантации агрегатов криоконсервированных нейральных клеток плодов крыс на восстановление двигательной активности задних конечностей крыс с экспериментальным повреждением спинного мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях были использованы новорожденные белые беспородные крысы, содержащиеся в условиях вивария Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Работа с животными проводилась в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (г. Киев, 2013 г.) и согласованными с положением IV Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS 123, Страсбург, 1986), и разрешением Комитета по биоэтике Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Нейральные клетки выделяли из тканей головного мозга плодов крыс 15-16 дней гестации (первым днем беременности считали выявление спермиев в вагинальных мазках после подсадки самок к самцам). Для этого ткань головного мозга извлекали из черепной коробки, промывали стерильной средой DMEM/F12 (*Sigma*, США), после чего помещали в 0,25 % раствор трипсина и инкубировали при 37 °C на протяжении 5 мин. После этого ткань переносили в среду DMEM/F12, содержащей 10 % сыворотки взрослых крыс (СВК), и механически дезагрегировали на единичные клетки с использованием вибрации [8]. Полученную суспензию фильтровали через стерильный фильтр одноразовой системы переливания крови и кровезаменителей (*Пластимед*, Украина). После этого клетки отмывали от трипсина центрифугированием при 150x g на протяжении 5 мин. Полученный осадок клеток ресуспендировали в среде DMEM/F12, содержащей 0,6 % глюкозы, 2 мМ глутамин, 3 мМ бикарбоната натрия, с 10 % СВК.

Для формирования агрегатов НК вносили в 24-луночный планшет (*Corning*, США) в концентрации $4 \cdot 10^6$ клеток/луночку

и культивировали на протяжении двух часов в 0,5 мл питательной среды DMEM/F12, содержащей 10 % СВК [9], каждые 15 мин ресуспендируя пипеткой осевшие клетки.

В качестве экспресс метода определения жизнеспособности использовали окрашивание клеток 0,4 % суправитальным красителем трипановым синим. Подсчет жизнеспособности и количества НК производили в камере Горяева. Определение жизнеспособности НК в составе агрегатов проводили после их дезагрегации на единичные клетки пипетированием.

Криоконсервирование суспензий и многоклеточных агрегатов НК проводили в поликарбонатном контейнере для замораживания Nalgene Mr. Frosty (*Sigma-Aldrich*, США) со скоростью 1 °C/мин до -80 °C в криоконтейнерах (*Corning*, США) под защитой 10 % ДМСО в среде DMEM/F12 (*Sigma*, США) в присутствии 10 % СВК. При этом конечная концентрация клеток суспензии составляла $4 \cdot 10^6$ /мл, а их объем – 200 мкл. При криоконсервировании агрегатов в криоконтейнер помещали агрегаты, образованные в одной лунке в процессе краткосрочного культивирования исходных НК. Через сутки НК, замороженные до -80 °C, помещали в жидкий азот. Отогрев клеток проводили на водяной бане при +40 °C. После отогрева с целью отмывки от ДМСО ко всем пробам с клетками добавляли 10-кратное количество среды DMEM/F12, после чего суспензии НК центрифугировали при 100x g на протяжении 3 мин, а пробы с агрегатами подвергали мягкому центрифугированию на ручной центрифуге при 100 об/мин на протяжении 5 мин. Надосадок удаляли, а осадок суспензий и агрегатов НК ресуспендировали в 50 мкл DMEM/F12 и использовали для трансплантации. Для оценки функциональной активности НК исходные и криоконсервированные агрегаты, образованные в одной лунке, культивировали в обогащенной среде DMEM/F12 с 10 % СВК.

Для проведения иммунофлуоресцентных исследований клеточные культуры фиксировали на протяжении 20 мин при комнатной температуре в 4 % параформальдегиде. Фиксированные клетки пермеабилizировали в 100 % этиловом спирте, промывали в фосфатном буфере (ФБ) и инкубировали 60 мин при комнатной температуре в 5 % растворе нормальной козлиной сыворотки (НКС) в ФБ с 0,1 % Тритоном X-100. После этого клетки инкубировали на протяжении ночи при +4 °C с первичными антителами в растворе 1 % НКС в ФБ с 0,1 % Тритоном X-100. Затем клетки промывали в ФБ и культивировали с вторичными антителами в растворе 1 % НКС в ФБ с 0,1 % Тритоном X-100 в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. В качестве первичных были использованы мышинные антитела против β -тубулина III (*Sigma*, США), GFAP (*Abcam*, Великобритания), нестина (*Abcam*, Великобритания) и кроличьи против виментина (*Abcam*, Великобритания). В качестве вторичных антител использовали Chromo 546 goat anti-mouse и Chromo 488 goat anti-rabbit

НАРУШЕНИЯ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ *

ИНДЕКС НАРУШЕНИЙ

Обе конечности неподвижны	0
Слабая подвижность одной конечности, у другой сохранен тонус	1
Слабая подвижность обеих конечностей	2
Ограниченная подвижность одной конечности, слабая другой	3
Ограниченная подвижность одной конечности, волочение другой	4
Ограниченная подвижность одной конечности, на другую не опирается	5
Умеренная подвижность одной конечности, на другую слабо опирается	6
Обширная подвижность одной конечности, слабая подвижность другой	7
Обширная подвижность одной конечности, ограниченная подвижность другой	8
Обширная подвижность обеих конечностей	9
Полное восстановление подвижности	10

Таблица 1. Оценка нарушений двигательной активности задних конечностей крыс при повреждении спинного мозга (модифицированный метод Basso [11]).

Примечания:

слабая подвижность – слабая подвижность одного сустава;

ограниченная подвижность – ограниченная подвижность одного или двух суставов;

умеренная подвижность – ограниченная подвижность трех суставов;

обширная подвижность – обширная подвижность трех суставов или обширная подвижность двух суставов и ограниченная подвижность одного сустава.

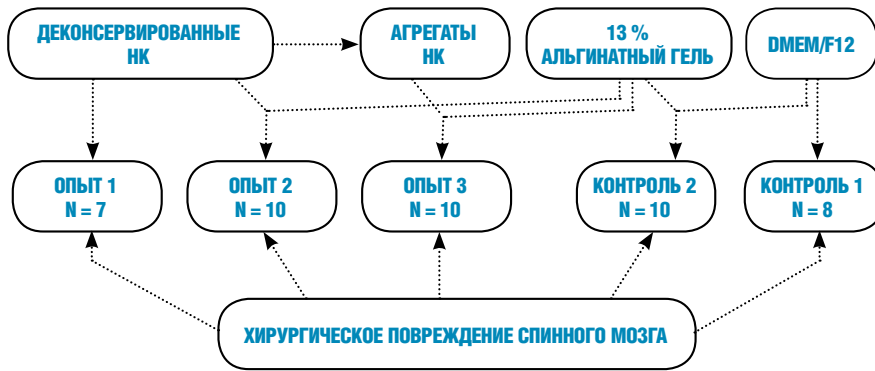


Рис. 1. Схема эксперимента по трансплантации крио-консервированных НК крысам с травматическим повреждением спинного мозга.

Рис. 2. Микрофотографии агрегатов, сформированных в процессе культивирования очищенной (А) и загрязненной эритроцитами (Б) суспензий НК. Световая микроскопия, масштабная линейка А – 100 мкм, Б – 50 мкм.

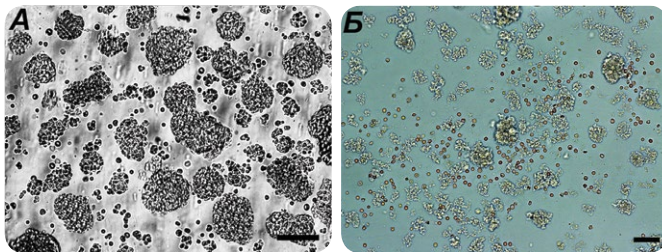
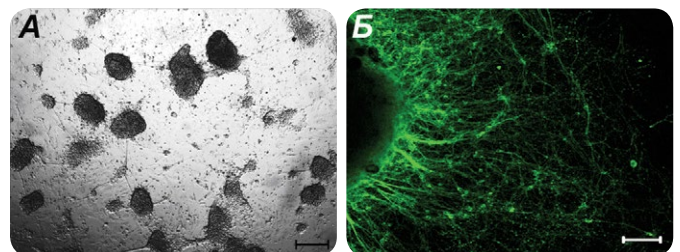


Рис. 3. Микрофотографии прикрепленных агрегатов НК, клетки которых формируют β-тубулин III положительные отростки (зеленая окраска); иммунофлуоресцентное окрашивание препарата. А – световая микроскопия, масштабная линейка – 200 мкм; Б – люминесцентная микроскопия, масштабная линейка – 50 мкм.



(Abcam, Великобритания). Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (Sigma, США).

Формирование модели травматического повреждения спинного мозга проводили на 6–8-месячных беспородных белых крысах-самцах весом 300–400 г. За сутки до операции животных не кормили. Анестезия осуществлялась внутримышечным введением животному 1 мл смеси, состоящей из 0,18 мл 2 % ксилазина, 0,36 мл 10 % кетамина и 0,46 мл 0,5 % раствора новокаина. Операции проводили в стерильных условиях. Повреждение формировали путем удаления правого сегмента спинного мозга длиной около 2 мм на уровне 10 позвонка грудного отдела [10]. После этого прилегающие участки спинного мозга изолировали от окружающих тканей подкожно-жировой клетчаткой и ушивали вначале глубокие слои мышц, а затем поверхностные мышцы и фасции. Трансплантацию НК проводили после ушивания мышц в область образовавшегося дефекта спинного мозга.

Регистрацию двигательной активности задних конечностей проводили через 1, 3, 14, 30, 60 и 180 суток после операции при помощи модифицированного метода оценки движения крыс в открытом пространстве Basso [11] (табл. 1).

Для приготовления альгинатного гидрогеля использовали 13 % раствор альгината натрия, приготовленный на физиологическом растворе, содержащем 25 мМ HEPES (pH 7,2). Альгинат натрия растворяли на водяной бане при температуре 100 °С и постоянном перемешивании. Все приготовления проводили в стерильных условиях. Растворы предварительно стерилизовали фильтрованием через 0,22 мкм фильтр (Millipore, США).

Исследование было проведено на 50 крысах, 5 из которых после операции умерли. Все экспериментальные животные были разделены на 5 групп: две контрольные и три опытные (рис. 1).

Сразу после операции животным контрольной группы 1 в область дефекта спинного мозга вводили 100 мкл среды DMEM/F12, животным контрольной группы 2 вводили 50 мкл 13 % альгинатного геля, предварительно смешанного с 50 мкл среды DMEM/F12. Животным опытной группы 1 в область дефекта спинного мозга вводили 50 мкл деконсервированной суспензии НК 15–16 дневных плодов крыс, содержащей $4 \cdot 10^6$ клеток, животным опытной группы 2 – 50 мкл 13 % альгинатного

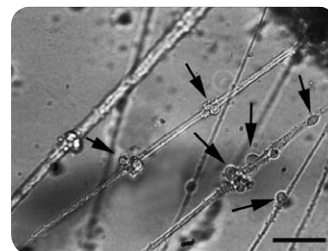


Рис. 4. Микрофотография недифференцированных НК (стрелки), мигрирующих по отросткам клеток из прикрепленных агрегатов. Световая микроскопия, масштабная линейка – 50 мкм.

геля, смешанного с 50 мкл суспензии деконсервированных НК, содержащей $4 \cdot 10^6$ клеток. Животным опытной группы 3 вводили 50 мкл 13 % альгинатного геля, смешанного с 50 мкл суспензии деконсервированных агрегатов, образованных в результате прекультивирования суспензии НК ($4 \cdot 10^6$ клеток). Для введения использовали шприц объемом 100 мкл (Hamilton, США) с диаметром иглы 0,5 мм.

Гистологическое исследование тканей спинного мозга проводили после их фиксации в 10 % растворе нейтрального формалина. Серийные срезы толщиной 6–8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для микросфотосъемки культур и гистологических препаратов использовали микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

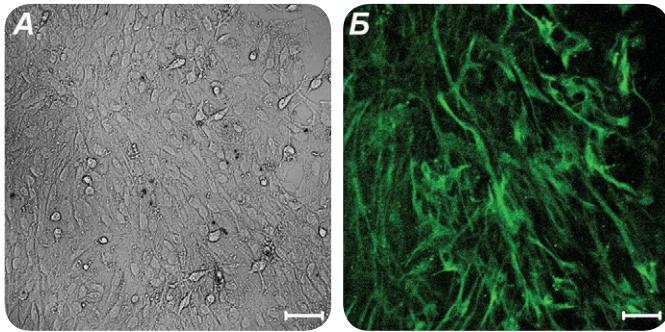
Статистическую обработку полученных данных и анализ результатов проводили с помощью программы Statistika (версия 6.0). Для сравнения и оценки различий использовали параметрический t-критерий Стьюдента. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

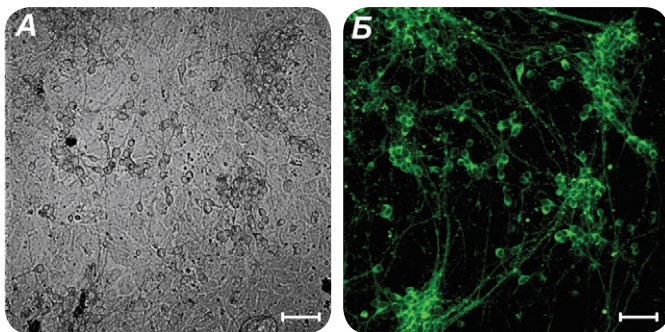
В экспериментах использовали суспензию изолированных НК со средней жизнеспособностью, равной 44,5 %. Краткосрочное культивирование таких клеток в присутствии 10 % СВК без митогенов приводило к формированию многоклеточных агрегатов (рис. 2, А).

При этом агрегаты формировали в основном жизнеспособные клетки, так как в составе агрегатов их жизнеспособность в среднем

- ❑ **Рис. 5.** Микрофотографии монослая, сформированного НК прикрепленных агрегатов, иммунофлуоресцентное окрашивание на маркер астроцитов GFAP (зеленая окраска). А – световая микроскопия, Б – люминесцентная микроскопия. Масштабная линейка – 50 мкм.



- ❑ **Рис. 6.** Микрофотографии монослая, сформированного НК прикрепленных агрегатов; иммунофлуоресцентное окрашивание на маркер нейронов β-тубулин 3 (зеленая окраска). А – световая микроскопия, Б – люминесцентная микроскопия. Масштабная линейка – 50 мкм.



равнялась 85,4 %. Проведенные эксперименты также продемонстрировали, что эритроциты, которыми иногда были загрязнены суспензии НК, в состав агрегатов не включались (рис. 2, Б).

В процессе культивирования агрегаты прикреплялись к подложке (рис. 3, А), после чего, подобно нейросферам, наблюдалось опережающее формирование клетками длинных β-тубулин III положительных отростков (рис. 3, Б), по которым мигрировали недифференцированные клетки (рис. 4), формирующие после дифференциации монослой, состоящий из клеток глии (рис. 5) и нейронов (рис. 6).

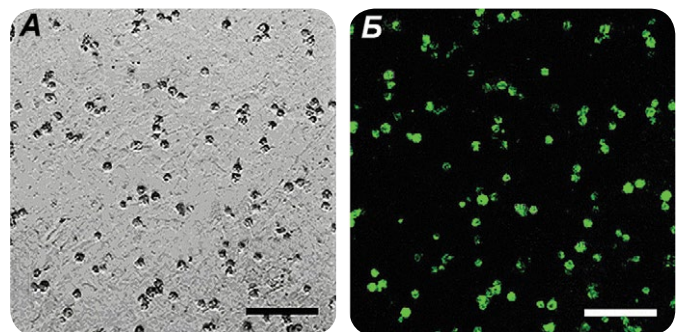
Когда площадь монослая достигала 70 % конфлюэнтности, появлялись вначале β-тубулин III положительные нейробластоподобные клетки (рис. 7) и затем колонии недифференцированных нестин- или виментин-положительных клеток (рис. 8).

Полученные данные указывают на то, что в агрегаты объединяются жизнеспособные стволовые/прогениторные и слабо дифференцированные клетки, которые более устойчивы к действию повреждающих факторов процедуры выделения по сравнению с дифференцированными клетками вследствие более простой морфологической структуры и более слабых межклеточных связей. Зрелые дифференцированные НК в процессе выделения, вероятнее всего, повреждаются и погибают.

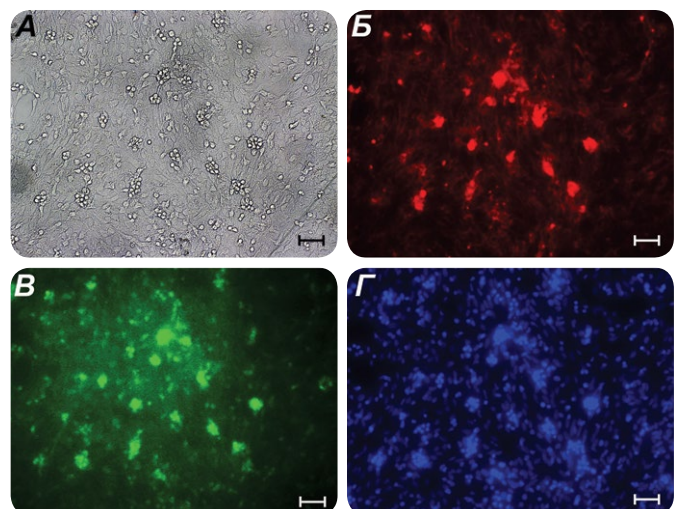
Таким образом, формирование многоклеточных агрегатов позволяет проводить селекцию жизнеспособных слабо дифференцированных и недифференцированных (стволовых/прогениторных) НК, решая вопрос их стандартизации и унификации перед использованием.

Криоконсервированные агрегаты после оттаивания и удаления ДМСО сохраняли свою целостность, структуру и размер (рис. 9).

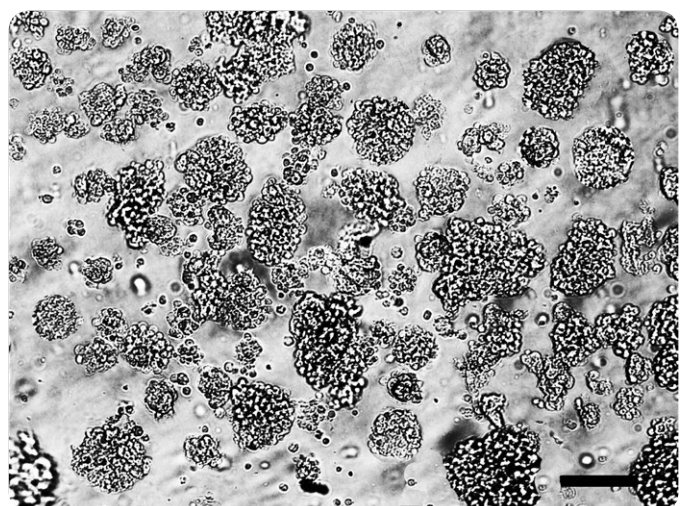
- ❑ **Рис. 7.** Микрофотографии нейробластоподобных клеток, образующихся на 6-е сутки культивирования агрегатов НК; иммунофлуоресцентное окрашивание на β-тубулин III (зеленая окраска). А – световая микроскопия, Б – люминесцентная микроскопия. Масштабная линейка – 50 мкм.



- ❑ **Рис. 8.** Микрофотографии иммунофлуоресцентного окрашивания колоний НК (10 суток культивирования агрегатов НК плодов крыс) на нестин (красная окраска) и виментин (зеленая окраска); ядра клеток окрашены красителем Hoechst 33342 (синяя окраска). А – световая микроскопия, Б-Г – люминесцентная микроскопия. Масштабная линейка – 50 мкм.



- ❑ **Рис. 9.** Микрофотография криоконсервированных агрегатов НК после удаления ДМСО. Световая микроскопия, масштабная линейка – 100 мкм.



Также они сохраняли способность прикрепляться к подложке. Через 3 суток культивирования прикреплялось более 70 % криоконсервированных агрегатов, после чего, как и у исходных агрегатов, наблюдалось опережающее формирование НК длинных β -тубулин III положительных отростков (рис. 10, А), по которым мигрировали недифференцированные клетки (рис. 10, Б).

В процессе культивирования отростки клеток агрегатов объединялись в сеть, при этом некоторые из них сливались между собой (рис. 11).

Таким образом, высокая криоустойчивость, а также способность в условиях *in vitro* НК в составе агрегатов формировать отростки, по которым мигрируют недифференцированные клетки, послужили основанием считать перспективным использование их трансплантации с целью восстановления поврежденной нервной ткани спинного мозга крыс.

Для фиксации трансплантированных НК в зоне повреждения спинного мозга мы использовали альгинат – линейный анионный полисахарид, который в присутствии двухвалентных катионов образует сетчатый гель [12]. Являясь биосовместимым гидрогелем, альгинаты широко используются для инкапсуляции клеток и срезов с целью иммуноизоляции [13–15]. При этом альгинатная матрица является проницаемой для питательных веществ, кислорода, углекислого газа, продуктов метаболизма и биологически активных веществ, которые могут секретироваться инкапсулированными клетками. Помимо этого было

показано, что альгинат увеличивает скорость роста аксонов нейронов и астроцитов в травмированном спинном мозге [16, 17]. Также было продемонстрировано, что трансплантированные нейральные стволовые клетки (НСК), инкапсулированные в альгинате, способны выживать, дифференцироваться, мигрировать и интегрироваться в ткань спинного мозга реципиента [18–19].

Через сутки после повреждения спинного мозга у всех животных отмечался паралич задних конечностей с уменьшением чувствительности тела. Задняя часть туловища была неподвижной. При этом наблюдалась резко выраженная гипотония мышц. Ответа задних конечностей на тактильные и болевые раздражения не отмечалось. К 3-м суткам после трансплантации НК у некоторых животных отмечалось появление мышечного тонуса задних конечностей. К 14-м суткам у животных всех исследуемых групп наблюдалась положительная динамика восстановления двигательной активности задних конечностей. Индекс движения при этом колебался в пределах 3,6–4,5 единиц (табл. 2) и характеризовался незначительными движениями в одном или двух суставах левой конечности и полным отсутствием движений или слабыми движениями одного сустава правой конечности при отсутствии болевой чувствительности.

На 30-е сутки у животных всех исследуемых групп наблюдалась незначительная положительная динамика улучшения движений задних конечностей по сравнению с 14-ми сутками. Индекс движения при этом увеличивался до 4,4–5,2 единиц (табл. 2).

На 60-е сутки наблюдалось достоверное увеличение индекса движений задних конечностей во второй и третьей экспериментальных группах по сравнению с контрольными группами. При этом индекс движений в опытной группе 2 увеличивался до 6,2, а в опытной группе 3 – до 6,8 (табл. 2), что характеризовалось умеренной подвижностью трех суставов одной ноги и одного сустава другой.

К 180-м суткам наблюдения индекс двигательной активности в контрольных группах 1 и 2 составлял 5,2 и 5,0 (табл. 2) соответственно, что характеризовалось заметным движением одного или двух суставов одной задней конечности и незначительными движениями одного сустава другой. Средний индекс движения задних конечностей животных опытной группы 1 (трансплантация суспензии НК) практически не изменялся и составлял 6,0, что не достоверно отличалось от показателей обеих контрольных групп. Данный индекс характеризовался умеренной подвижностью трех суставов одной ноги и одного сустава другой.

Средний индекс движения задних конечностей животных опытной группы 2 (трансплантация суспензии НК совместно с альгинатным гелем) к 180-м суткам наблюдения увеличивался до 6,8 (табл. 2), что достоверно отличалось от показателей обеих контрольных групп. При этом наблюдалась обширная подвижность всех трех суставов одной конечности и незначительная или умеренная подвижность двух суставов другой. Чувствительность задних конечностей при этом восстанавливалась, хотя реакция на болевое раздражение левой (поврежденной) стороны была отсрочена. Средний индекс движения задних конечностей животных опытной группы 3 (трансплантация деконсервированных агрегатов НК совместно с альгинатным гелем) к 180-м суткам наблюдения увеличивался до 7,7 (табл. 2), что также достоверно превышало показатели контрольных групп. При этом наблюдалась обширная подвижность всех трех суставов одной конечности и ограниченная подвижность двух суставов другой. Чувствительность задних конечностей и их реакция на болевое раздражение при этом восстанавливалась.

Через 120 суток после операции некоторых животных опытных и контрольных групп выводили из эксперимента путем декапитации. Фрагменты спинного мозга извлекали и проводили морфологический анализ их срезов. Как видно из рис. 12, структура нервной ткани, которая формировалась в области повреждения, у различных экспериментальных групп животных отличалась между собой. При этом наиболее упорядоченные структуры нервной ткани в области повреждения формировались после трансплантации криоконсервированных агрегатов НК совместно с альгинатным гелем (рис. 12).

Рис. 10. Микрофотография иммунофлуоресцентного окрашивания β -тубулин III положительных отростков (зеленая окраска), образованных в процессе культивирования прикрепленных криоконсервированных агрегатов НК, по которым мигрируют недифференцированные клетки (стрелки).

А – люминесцентная микроскопия, масштабная линейка – 100 мкм;
Б – световая микроскопия, масштабная линейка – 20 мкм.

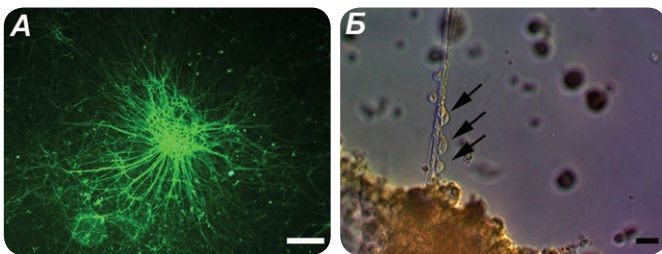
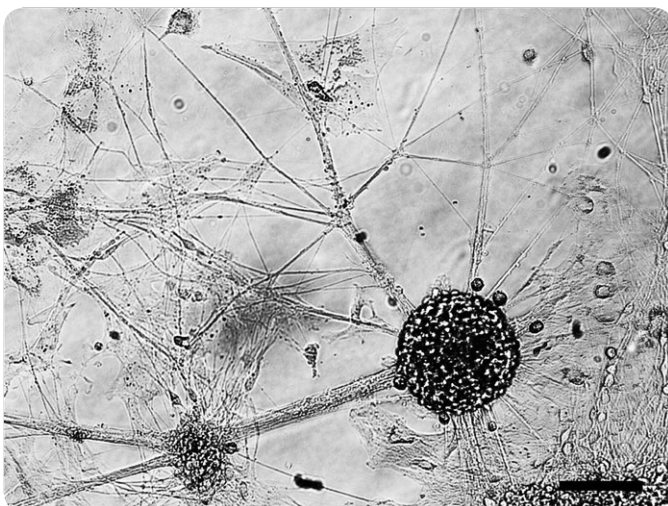


Рис. 11. Микрофотография прикрепленных криоконсервированных агрегатов НК с длинными отростками клеток, формирующими сеть. Световая микроскопия, масштабная линейка – 100 мкм.



ВРЕМЯ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ	ИНДЕКС ДВИЖЕНИЯ ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ				
	КОНТРОЛЬ 1 (N = 8)	КОНТРОЛЬ 2 (N = 10)	ОПЫТ 1 (N = 7)	ОПЫТ 2 (N = 10)	ОПЫТ 3 (N = 10)
1 сутки	0,2±0,2	0,7±0,4	0,7±0,5	0,8±0,7	0,7±0,6
3 суток	0,7±0,3	1,0±0,01	0,8 ±0,4	0,8±0,5	0,9±0,5
14 суток	4,3±0,5	4,0±0,5	3,6±0,5	3,8±0,8	4,5±0,9
30 суток	4,6±0,6	4,4±0,4	5,0±0,4	4,4±0,7	5,2±0,6
60 суток	5,0±0,5	4,9±0,5	5,2±0,4	6,2±0,4**	6,8±0,5**
180 суток	5,2±0,5	5,0±0,1	6,0±0,9	6,4±0,7**	7,8±0,6**#

Таблица 2. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс после повреждения спинного мозга.

Примечания: контроль 1 – без трансплантации; контроль 2 – введение раствора альгината; опыт 1 – трансплантация суспензии НК; опыт 2 – трансплантация суспензии НК в растворе альгината; опыт 3 – трансплантация агрегатов НК в растворе альгината.
* – различия достоверны по сравнению с контролем 1, $p < 0,05$;
* – различия достоверны по сравнению с контролем 2, $p < 0,05$;
– различия достоверны по сравнению с опытом 2, $p < 0,05$.

Таким образом, проведенные эксперименты продемонстрировали, что введение альгинатного геля практически не оказывало положительного действия на восстановление двигательной активности животных и на процесс формирования нервной ткани в области повреждения. При введении суспензии НК, начиная с 60-х суток, наблюдалась тенденция к улучшению двигательной активности животных по сравнению с контролями. Однако при этом также не наблюдалось выраженного положительного влияния введения суспензии НК на формирование нервной ткани в области повреждения.

Трансплантация в зону повреждения спинного мозга суспензии или многоклеточных агрегатов НК, смешанных с альгинатным гелем, достоверно улучшала восстановление двигательной активности животных, начиная с 60-х суток после введения.

При этом в случае введения альгинатного геля с агрегатами НК наблюдалась тенденция к увеличению двигательного индекса задних конечностей животных по сравнению с животными, которым вводили альгинатный гель с суспензией НК. Также при введении альгинатного геля с агрегатами НК формирующаяся нервная ткань характеризовалась более упорядоченной структурой по сравнению с животными, которым вводили альгинатный гель с клетками в составе суспензии.

Отсутствие достоверного улучшения двигательной активности у экспериментальных животных после трансплантации суспензии НК можно объяснить тем, что трансплантированные клетки не фиксируются в зоне повреждения, вследствие чего их действие проявляется минимальным образом. Использование же НК, смешанных с альгинатным гелем, позволяет, с одной стороны, зафиксировать трансплантированные клетки в зоне повреждения, а с другой – посредством инкапсуляции достигается защита клеток от действия не-

благоприятных условий в зоне трансплантации. Помимо этого, альгинатный гель может в некоторой степени заменять изолированным НК утраченный внеклеточный матрикс, способствуя их выживанию и нормализации функционирования.

Проведенные исследования показали, что трансплантация альгинатного геля с агрегатами НК приводит к более эффективному восстановлению двигательной активности экспериментальных животных, а также способствует формированию более упорядоченных тканевых структур в области повреждения по сравнению с трансплантацией альгинатного геля с суспензией НК. Эти данные указывают на важную роль клеточного микроокружения для эффективного функционирования трансплантированных НК. Как известно, для нормального функционирования трансплантированных клеток (как стволовых/прогениторных, так и дифференцированных) очень важным является их микроокружение – как клеточное, так и внеклеточное. Нейральные СК без своего микроокружения (стволовой ниши) функционировать не могут. Если в зону повреждения трансплантировать «очищенную» суспензию НСК, то, скорее всего, в связи с отсутствием адекватного микроокружения, они погибнут, либо будут функционировать неправильно. Вероятно, этим и объясняется низкая клиническая эффективность трансплантации «очищенных» суспензий НСК при клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний.

При отсутствии соответствующих вспомогательных клеток НСК не способны мигрировать в необходимом направлении. Например, в эмбриогенезе миграция НСК и их коммитированных потомков осуществляется по отросткам клеток радиальной глии. Поэтому для эффективного восстановления нервной ткани целесообразным является воссоздание условий эмбриогенеза в поврежденной области, при котором возможно образование не только всего комплекса клеток,

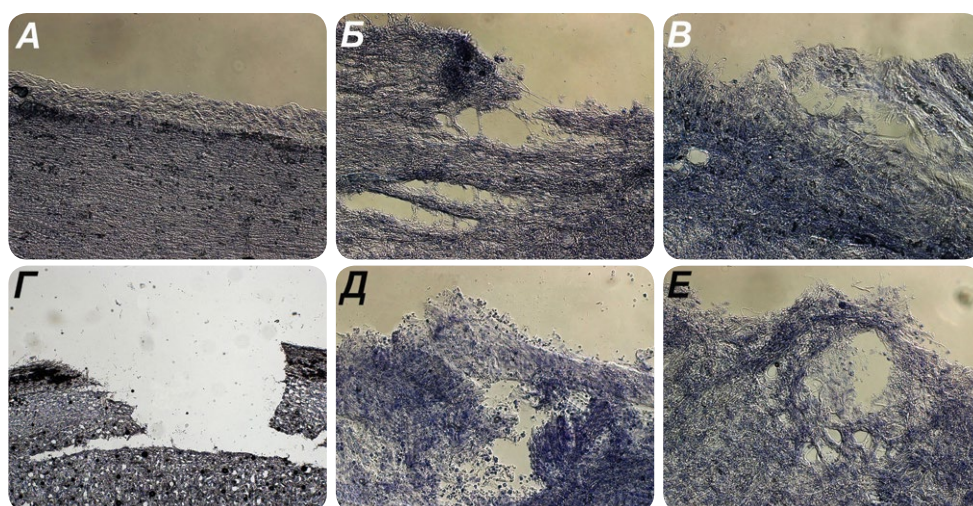


Рис. 12. Микрофотография гистологических срезов участков ткани спинного мозга в норме (А), после повреждения (Б) и через 120 суток в экспериментальных группах крыс после трансплантации в зону повреждения альгинатного геля с криоконсервированными НК в составе агрегатов (Б), альгинатного геля с криоконсервированными НК в составе суспензии (В), альгинатного геля (Д) и криоконсервированных НК в составе суспензии (Е). Г – микрофотография участка ткани спинного мозга крысы после травматического повреждения. Световая микроскопия.

необходимых для восстановления поврежденной нервной ткани, но и путей, по которым происходит миграция этих клеток. Для воссоздания таких условий ранее уже использовали трансплантацию нейросфер в область повреждения [19, 20]. Но, как показали наши эксперименты, такими структурами могут быть также и агрегаты, сформированные изолированными гетерогенными суспензиями НК. При этом, в отличие от нейросфер, в агрегатах микроокружение НСК (клеточное и внеклеточное) является более приближенным к микроокружению в условиях *in vivo*, что позволяет надеяться на более эффективную и адекватную дифференциацию НСК в необходимые клетки.

В экспериментах для трансплантации мы использовали гетерогенную суспензию клеток головного мозга плодов, состоящую из стволовых, прогениторных и дифференцированных НК. Преимуществом такой суспензии перед очищенными стволовыми или дифференцированными НК является присутствие не только нейральных стволовых/прогениторных клеток, но и клеток, составляющих их нишу, что позволяет надеяться на более эффективное функционирование трансплантированных СК в травмированном спинном мозге. Процесс формирования агрегатов, по нашему мнению, как раз и сопровождается воссозданием микроокружения, подобного нервной ткани *in vivo*, что позволяет НСК выживать и более эффективно функционировать не только в культуре, но и после трансплантации.

Следует также отметить, что помимо замены погибших нейральных клеток трансплантация функциональных НК может также оказывать влияние на регенерацию поврежденных спинного мозга посредством секреции нейротрофических факторов [21-23], а также факторов, приводящих к разрушению молекул, ингибирующих рост аксонов [24, 25]. Было показано, что НСК, полученные из различных источников, секретировали фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF) и матричную металлопротеазу -2 (matrix metalloprotease-2), которая разрушает хондроитинсульфат протеогликан (молекулу, ингибирующую рост аксонов) [21-26]. Таким образом, трансплантированные нейральные стволовые/прогениторные клетки могут не только выполнять функцию замещения ткани, но и могут оказывать терапевтический эффект.

Проведенные исследования показали, что трансплантация криоконсервированной гетерогенной суспензии НК плодов крысам с повреждением спинного мозга является эффективной при условии их фиксации в зоне повреждения. Также проведенные исследования продемонстрировали перспективность использования для трансплантации многоклеточных агрегатов, которые, являясь трехмерной микро моделью нервной ткани, увеличивают клиническую эффективность пересаженных клеток.

ВЫВОДЫ

1. У крыс с травматическим повреждением спинного мозга, начиная с 60-х суток после трансплантации в зону повреждения гетерогенной суспензии криоконсервированных нейральных клеток плодов крыс, заключенных в альгинатный гель, наблюдается положительная динамика восстановления двигательной активности.
2. Криоконсервированные агрегаты из суспензии нейральных клеток плодов обладают более высоким терапевтическим потенциалом при клеточной терапии травм спинного мозга крыс по сравнению с криоконсервированной суспензией нейральных клеток, улучшая структуру формируемой нервной ткани и достоверно увеличивая скорость восстановления подвижности задних конечностей через 180 суток после трансплантации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сукач А. Н. Клеточная терапия нейродегенеративных болезней: источники клеток и стратегия их применения [Текст] / А. Н. Сукач, В. И. Грищенко // Успехи современной биологии. – 2007. – Т. 127, № 1. – С. 25-33.
2. Emmerta M. Y. Cell therapy, 3D culture systems and tissue engineering for cardiac regeneration [Text] / M. Y. Emmerta, R. W. Hitchcock, S. P. Hoerstrupa // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2014. – Vol. 69. – P. 254-269.
3. Stabenfeldt S. E. Biomimetic Microenvironment Modulates Neural Stem Cell Survival, Migration, and Differentiation [Text] / S. E. Stabenfeldt, G. Munglani, A. J. Garcia, et al. // Tissue engineering: Part A. – 2010. – Vol. 16, № 12. – P. 3747-3758.
4. Xu C. J. The Neural Stem Cell Microenvironment: Focusing on Axon Guidance Molecules and Myelin-Associated Factors [Text] / C. J. Xu, J. L. Wang, W. L. Jin // Journal of Molecular Neuroscience. – 2015. – Vol. 56, № 4, 3. – P. 887-897.
5. Сукач А. Н. Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом [Текст] / А. Н. Сукач // Цитология. – 2005. – Т. 47, № 3. – С. 207-213.
6. Сукач А. Н. Роль формирования агрегатов в процессе выживания изолированных нервных клеток новорожденных крыс после криоконсервирования [Текст] / А. Н. Сукач, Т. Д. Ляшенко // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, № 4. – С. 395-405.
7. Сукач А. Н. Свойства изолированных клеток нервной ткани новорожденных крыс в культуре [Текст] / А. Н. Сукач, Т. Д. Ляшенко, М. В. Шевченко // Biotechnologia Acta. – 2013. – Т. 6, № 3. – С. 63-68.
8. Petrenko A. Yu. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration [Text] / A. Yu. Petrenko, A. N. Sukach // Analytical Biochem. – 1991. – Vol. 194, № 2. – P. 326-329.
9. Sukach A. N. Comparative study of influence on fetal bovine serum and serum of adult rat on cultivation of newborn rat neural cells [Text] / A. N. Sukach, M. V. Shevchenko, T. D. Liashenko // Biopolymers and Cell. – 2014. – Vol. 30, № 5. – P. 394-400.
10. Woerly S. Spinal cord reconstruction using NeuroGelTM implants and functional recovery after chronic injury [Text] / S. Woerly, V. D. Doan, F. Evans-Martin, et al. // J. of Neuroscience Res. – 2001. – Vol. 66. – P. 1187-1197.
11. Basso D. M. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [Text] / D. M. Basso, M. S. Beattie, J. C. Bresnahan // Journal of neurotrauma. – 1995. – Vol. 12, № 1. – P. 1-21.
12. Leea K. Y. Alginate: Properties and biomedical applications [Text] / K. Y. Leea, D. J. Mooneya // Progress in Polymer Science. – 2012. – Vol. 37, № 1. – P. 106-126.
13. Lim F. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas [Text] / F. Lim, A. M. Sun // Science. – 1980. – Vol. 210, № 4472. – P. 908-910.
14. Goren A. Encapsulated human mesenchymal stem cells: a unique hypoinmunogenic platform for long-term cellular therapy [Text] / A. Goren, N. Dahan, E. Goren, et al. // FASEB J. – 2010. – Vol. 24, № 1. – P. 22-31.

15. *Gimi B.* Advances in alginate gel microencapsulation of therapeutic cells [Text] / *B. Gimi, K. V. Nemani* // Crit Rev Biomed Eng. – 2013. – **Vol. 41, № 6.** – P. 469–481.
16. *Matyash M.* Novel soft alginate hydrogel strongly supports neurite growth and protects neurons against oxidative stress [Text] / *M. Matyash, F. Despang, R. Mandal, et al.* // Tissue Engineering. Part A. – 2012. **Vol. 18, № 1-2.** – P. 55–66.
17. *Suzuki K.* Regeneration of transected spinal cord in young adult rats using freeze-dried alginate gel [Text] / *K. Suzuki, Y. Suzuki, K. Ohnishi, et al.* // NeuroReport. – 1999. – **Vol. 10, № 14.** – P. 2891–2894.
18. *Prang P.* The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels [Text] / *P. Prang, R. Muller, A. Eljaouhari, et al.* // Biomaterials. – 2006. – **Vol. 27, № 19.** – P. 3560–3569.
19. *Wu S.* Migration, integration, and differentiation of hippocampus-derived neurosphere cells after transplantation into injured rat spinal cord [Text] / *S. Wu, Y. Suzuki, M. Kitada, et al.* // Neuroscience Letters. – 2001. – **Vol. 312, № 3.** – P. 173–176.
20. *Nori S.* Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice [Text] / *S. Nori, Y. Okada, A. Yasuda, et al.* // Proc Natl Acad Sci USA. – 2011. – **Vol. 108, № 40.** – P. 16825–16830.
21. *Llado J.* Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors [Text] / *J. Llado, C. Haenggeli, N. J. Maragakis, et al.* // Mol Cell Neurosci. – 2004. – **Vol. 27, № 3.** – P. 322–331.
22. *Lu P.* Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury [Text] / *P. Lu, L. L. Jones, E. Y. Snyder, et al.* // Exp Neurol. – 2003. – **Vol. 81, № 2.** – P. 115–129.
23. *Cao Q.* Transplantation of ciliary neurotrophic factor-expressing adult oligodendrocyte precursor cells promotes remyelination and functional recovery after spinal cord injury [Text] / *Q. Cao, Q. He, Y. Wang, et al.* // J Neurosci. – 2010. – **Vol. 30, № 8.** – P. 2989–3001.
24. *Heine W.* Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically denervated peripheral nerves [Text] / *W. Heine, K. Conant, J. W. Griffin, et al.* // Exp Neurol. – 2004. – **Vol. 189, № 2.** – P. 231–240.
25. *Liu H.* Matrix metalloproteinase-9 controls proliferation of NG2+ progenitor cells immediately after spinal cord injury [Text] / *H. Liu, V. Shubayev* // Exp Neurol. – 2011. – **Vol. 231, № 2.** – P. 236–246.
26. *Li X.* Effect of neural stem cells on apoptosis of PC12 cells induced by serum deprivation [Text] / *X. Li, T. Liu, K. Song, et al.* // Biotechnol prog. – 2007. – **Vol. 23, № 4.** – P. 952–957.



СТАТЬЯ НА САЙТЕ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Авторы подтверждают отсутствие возможных конфликтов интересов.

Поступила в редакцию 07.12.2015 г.

Принята к печати 12.05.2016 г.