

Р. Г. ВАСИЛЬЕВ¹, А. Е. РОДНИЧЕНКО¹, С. Н. ШАМАЛО²,
А. С. ДЕМИДЧУК^{1,2}, И. Ф. ЛАБУНЕЦ¹, Ю. Б. ЧАЙКОВСКИЙ², Г. М. БУТЕНКО¹

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК – ПРОИЗВОДНЫХ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОВРЕЖДЕННЫХ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ У МЫШЕЙ

Поступила 25.06.14

Исследовано влияние трансплантации мультипотентных стволовых клеток – производных нервного гребня (МСК–ПНГ), полученных из вибрисс, на восстановление травмированного (перерезанного) седалищного нерва у взрослых мышей линии FVB. После трансплантации клеток в область травмы регенерация поврежденного нерва усиливалась по сравнению с таковой у мышей, которым трансплантация не производилась. Увеличивалась также интенсивность новообразования кровеносных сосудов и возобновления эндоневрия. Плотность нервных волокон в дистальном отрезке поврежденного нерва мышей после трансплантации МСК–ПНГ ($10522.8 \pm 1044.0 \text{ мм}^{-2}$) была достоверно большей, чем у мышей с травмой нерва, но без трансплантации ($8409.5 \pm 739.5 \text{ мм}^{-2}$). Обсуждаются возможные механизмы ускорения регенерации поврежденного периферического нерва в условиях трансплантации стволовых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стволовые клетки, нервный гребень, периферический нерв, трансплантация, регенерация.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка подходов, обеспечивающих регенерацию поврежденных периферических нервных стволов, привлекает внимание многих исследователей [1]. Широкое использование новых хирургических технологий и фармакологических препаратов для лечения подобных повреждений позволило значительно улучшить клинические результаты, однако задача полного восстановления структуры и функции нервов после таких травм пока полностью не решена.

В настоящее время для стимуляции регенеративных процессов в поврежденных периферических нервах активно разрабатываются экспериментальные подходы с применением клеточной терапии [2, 3]. Продемонстрирована способность стволовых клеток различных типов содействовать восстановлению травмированного седалищного нерва [2, 4]. При этом стволовые клетки, имплантированные в

зону дефекта нерва, дифференцируются, превращаясь в шванновские клетки, что эффективно ускоряет рост и миелинизацию регенерирующих аксонов.

Перспективным типом стволовых клеток для восстановления повреждений периферических нервов с использованием методов клеточной терапии и тканевой инженерии могут быть мультипотентные стволовые клетки – производные нервного гребня (МСК–ПНГ) из бульбарного региона (БР) волосяного фолликула (ВФ). МСК–ПНГ обладают способностью к самообновлению и направленной мультилинейной дифференциации, превращаясь в том числе в шванновские клетки [4–6].

В настоящей работе мы исследовали возможности усиления восстановительных процессов в травмированном седалищном нерве взрослых мышей после трансплантации МСК–ПНГ, полученных из БР ВФ.

МЕТОДИКА

Исследование было проведено на мышах линии FVB – «диких» и трансгенных по гену GFP. Животные были получены из вивария Института генетической и регенеративной медицины НАМН Украины.

¹ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», Киев (Украина).

²Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца МЗ Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: rvasiliev@ukr.net (Р. Г. Васильев);
yuchaiko@i.ua (Ю. Б. Чайковский).

Мыши упомянутой линии были разделены на следующие группы. У животных первой группы ($n = 5$) правый седалищный нерв только выделяли на определенном протяжении, но не пересекали (ложнооперированный контроль). Мышам второй группы ($n = 5$) правый седалищный нерв перерезали в участке средней трети его протяженности. Мышам третьей группы ($n = 5$) в день операции в область перерезки седалищного нерва подсаживали МСК–ПНГ в носителе (фибриновом геле; 10^6 клеток в 20 мкл геля). Для этого смешивали 10 мкл 2 %-ного раствора фибриногена и 10 мкл среды DMEM:F12, содержащей в себе клетки и 0.5 междунар. ед. тромбина. Полимеризация раствора и образование фибринового геля происходили непосредственно после внесения в область дефекта.

Все вмешательства выполняли под авертиновым наркозом (0.4 мл 2.5 %-ного раствора, внутривенно).

МСК–ПНГ получали из БР ВФ вибрисс мышей, трансгенных по гену GFP, и культивировали в среде DMEM:F12 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 5 нг/мл bFGF, 2 мМ глутамина (все препараты «Sigma», США) в мультигазовом инкубаторе с газовой средой из 5 % CO_2 , 5 % O_2 и 90 % N_2 . Для трансплантации использовали клетки третьего пассажа. Биологические свойства МСК–ПНГ, культивируемых *in vitro*, были детально описаны нами ранее [6].

Через четыре недели после начала эксперимента мышам всех групп подвергали эвтаназии (эфирный наркоз); пробы биологических материалов (участки интактного седалищного нерва и фрагменты регенерационных невром с прилегающими отрезками поврежденного нерва) изучали с применением стандартной морфологической методики. Гистологический материал для световой микроскопии фиксировали в течение суток в 10 %-ном растворе нейтрального формалина; после промывания изготавливали криостатные срезы, которые позже импрегнировали азотнокислым серебром [7].

Для морфометрического анализа результатов световой микроскопии гистологических препаратов использовали компьютерную программу «UTHSCSA Image Tool for Windows» (Version 2.00); микроскоп «Олимпус» снабжался стандартной окулярной вставкой. Препараты гистологических срезов фотографировали с помощью цифровой фотокамеры и определяли плотность распределения нервных волокон в дистальном участке травмированного нерва.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Свойства МСК–ПНГ ВФ. Полученные нами МСК–ПНГ в культуре *in vitro* имели типичную звездчатую форму (рис. 1, А). Они проявляли характерные для

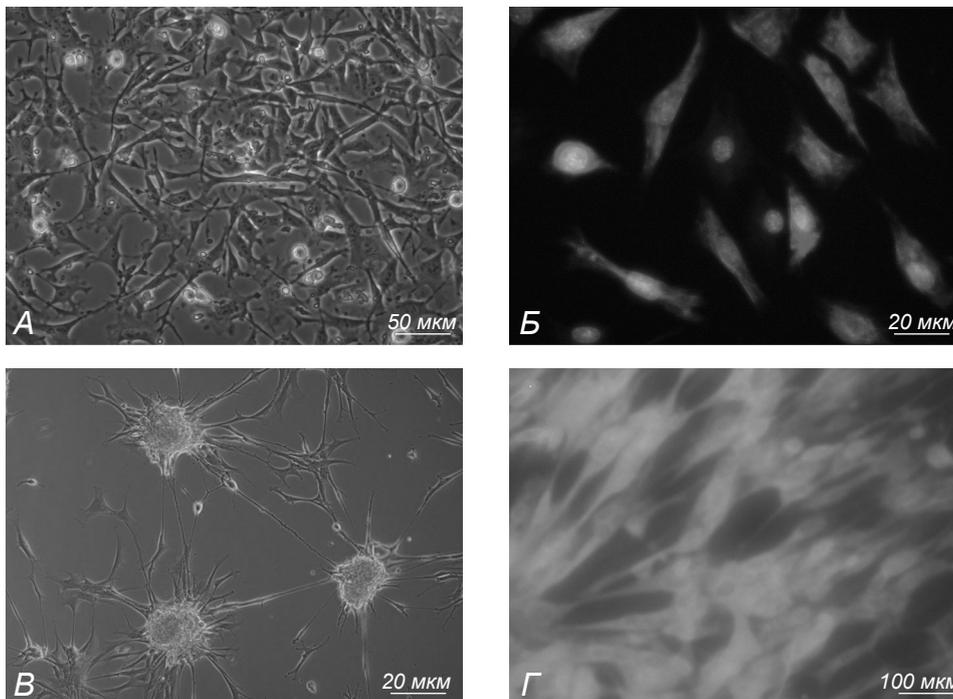


Рис. 1. Биологические свойства мультипотентных стволовых клеток – производных нервного гребня (МСК–ПНГ) из бульбарного региона волосяного фолликула взрослых мышей.

А – МСК–ПНГ в культуре *in vitro* (фазово-контрастная микроскопия); Б – экспрессия маркера стволовых клеток нестина в МСК–ПНГ (флуоресцентная микроскопия); В – МСК–ПНГ в условиях бессывороточного культивирования (фазово-контрастная микроскопия); Г – дифференциация МСК–ПНГ с превращением в шванновские клетки (экспрессия клетками белка S-100; флуоресцентная микроскопия).

Рис. 1. Біологічні властивості мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребеня з бульбарного регіону волосяного фолікула дорослих мишей.

нейральных стволовых клеток свойства, экспрессируя специфический маркер – белок промежуточных филаментов нестин (*B*) и формируя нейросферы в специфических условиях бессывороточного культивирования (*B*) [6]. При культивировании в среде, обеспечивающей индукцию глиальной дифференциации, МСК–ПНГ дифференцировались, превращаясь в шванновские клетки. Это подтверждалось характерными изменениями их морфологических характеристик и экспрессией специфического белка S-100 (*Г*) [6].

Особенности регенерации поврежденного седалищного нерва мышей. После перерезки нерва в области травмы у экспериментальных животных формировалась регенерационная неврома, включающая в себя нервные волокна, кровеносные сосуды, клеточные элементы (преимущественно фибробласты), коллагеновые волокна и основное вещество соединительной ткани (рис. 2). При этом у мышей третьей группы (*B*) регенерирующие нервные волокна располагались заметно более компактно, чем у мышей второй группы (*Б*). У животных второй группы (без имплантации МСК) многие волокна были ориентированы косо или поперечно по отношению к продольной оси нерва. У мышей же третьей группы ориентация волокон была более строгой – в основном они располагались в продольном направлении. Дистальный отрезок поврежденного нерва содержал в себе миелинизированные и безмиелиновые нервные волокна.

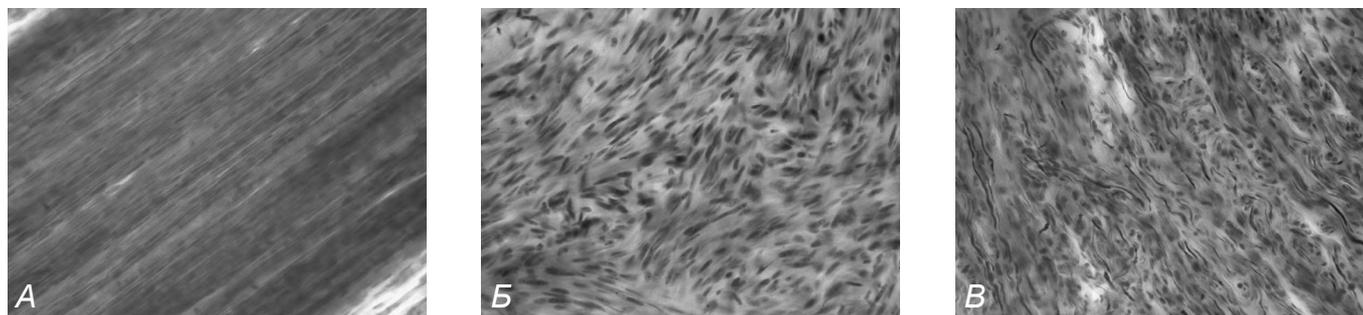
Результаты морфометрического исследования дистальных отрезков поврежденного нерва показали, что плотность нервных волокон в зоне травмы у мышей второй группы была существенно ниже, чем у животных первой группы (соответственно 8410 ± 740 и $11024 \pm 628 \text{ мм}^{-2}$, $P < 0.05$). В то же

время у мышей третьей группы плотность ($10523 \pm 1044 \text{ мм}^{-2}$) практически не отличалась от контроля (у ложнооперированных мышей первой группы).

Таким образом, у мышей с травмой нерва после трансплантации МСК–ПНГ наблюдалось достаточно четко выраженное усиление процессов регенерации и восстановления структурных элементов поврежденного нерва по сравнению с таковыми у мышей с травмой нерва, но без пересадки МСК. Более качественная регенерация нервных волокон у мышей после трансплантации МСК–ПНГ отражалась не только в более значительном восстановлении волокон травмированного седалищного нерва; новообразование кровеносных сосудов и возобновление эндоневральных оболочек вокруг отдельных групп нервных волокон были у этих животных более интенсивными.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что регенерация периферического нерва существенно зависит от влияний клеточных, сосудистых и гуморальных факторов на дистальный участок поврежденного нерва, в котором происходят регенерация и удлинение аксонов [1]. Механизмы влияния стволовых клеток на восстановление поврежденного периферического нерва изучены недостаточно [2]. Можно полагать, что интенсификация регенерации травмированного седалищного нерва у мышей после трансплантации МСК–ПНГ связана как с трофическим влиянием этих клеточных элементов, так и с их прямой дифференцировкой в шванновские клетки. Показано, что шванновские клетки являются источником трофических и ростовых факторов, способствующих росту нерв-



Р и с. 2. Дистальный участок седалищного нерва через четыре недели после операции. *A* – при ложной операции, *Б* – при травме нерва и *В* – при травме и трансплантации мультипотентных стволовых клеток – производных нервного гребня – в область травмы нерва. Импрегнация нитратом серебра. $\times 400$.

Р и с. 2. Дистальна ділянка сідничного нерва через чотири тижні після операції.

ных волокон [8]. Стволовые клетки, трансплантированные в область травмы нерва, дифференцируются с превращением в шванновские клетки, и это усиливает миелинизацию регенерирующих аксонов [4]. В дальнейшем мы предполагаем провести исследования с детекцией трансплантированных GFP-положительных клеток в регенерирующем седалищном нерве мышей.

В условиях трансплантации МСК–ПНГ параллельно с упомянутыми выше процессами происходило усиление ангиогенеза в поврежденном нерве. Как было обнаружено, через 30 дней после перерезки седалищного нерва гемато-эндоневральный барьер у мышей нарушается [9]. Кроме того, оказалось, что сосуды периферического участка нерва, несмотря на ряд изменений после травмы, продолжают функционировать и участвуют в процессе регенерации [1]. При этом восстановление элементов гемато-эндоневрального барьера в травмированном нерве происходит только при достаточном повышении содержания трофических факторов в ходе упомянутого регенерационного процесса.

Очевидно, что для объективизации степени регенерации поврежденных периферических нервов следует использовать комплексный подход, применяя морфологические и электрофизиологические методы, анализируя функциональное состояние нейронов спинного мозга и т. д. [2]. Необходимо также принимать во внимание феномен пролиферации эндогенных шванновских клеток после повреждения нерва и трансплантации МСК–ПНГ.

Как уже упоминалось, МСК–ПНГ обладают выраженной способностью к направленной трансформации *in vitro* в шванновские клетки. Трансплантация МСК–ПНГ в область травмы (перерезки) седалищного нерва у мышей обеспечивает его более успешную регенерацию, что проявляется в повышении количества нервных волокон в дистальном отрезке нерва и оптимизации их пространственной ориентации. Наши наблюдения свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований биологических свойств этих клеток с целью использования в будущем в регенеративной медицине.

Все работы с животными проводили согласно положениям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и другой научной целью, а также положениям Комитетов по биоэтике ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины» и Национального медицинского университета им. А. А. Богомольца МЗ Украины.

Авторы настоящей работы, Р. Г. Васильев, А. Е. Род-

ниченко, С. Н. Шамало, А. С. Демидчук, И. Ф. Лабунец, Ю. Б. Чайковский и Г. М. Бутенко, подтверждают, что при выполнении исследования и публикации его результатов отсутствовали какие-либо конфликты, касающиеся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями и/или лицами, которые могли быть связаны с исследованием, и взаимоотношений соавторов статьи.

Р. Г. Васильев¹, А. Е. Родниченко¹, С. М. Шамало², А. С. Демидчук^{1,2}, И. Ф. Лабунец¹, Ю. Б. Чайковский², Г. М. Бутенко¹

ВПЛИВ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН – ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ УШКОДЖЕНИХ ПЕРИФЕРИЧНИХ НЕРВІВ У МИШЕЙ

¹ДУ «Інститут генетичної і регенеративної медицини НАМН України», Київ (Україна).

²Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця МОЗ України, Київ (Україна).

Резюме

Досліджено вплив трансплантації мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребеня (МСК–ПНГ), отриманих із вібрисів, на відновлення травмованого (перерізаного) сідничного нерва у дорослих мишей лінії FVB. Після трансплантації клітин у ділянку травми регенерація ушкодженого нерва посилювалася порівняно з такою у мишей, котрим дана трансплантація не виконувалася. Збільшувалася також інтенсивність новоутворення кровоносних судин і відновлення ендоневрія. Щільність нервових волокон у дистальному відрізку ушкодженого нерва мишей після трансплантації МСК–ПНГ ($10522.8 \pm 1044.0 \text{ мм}^{-2}$) була вірогідно більшою, ніж у мишей із травмою нерва, але без трансплантації ($8409.5 \pm 739.5 \text{ мм}^{-2}$). Обговорюються можливі механізми прискорення регенерації ушкодженого периферичного нерва в умовах трансплантації стовбурових клітин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ю. Б. Чайковский, О. І. Дельцова, С. Б. Герашенко, *Міжтканинні взаємодії периферійного нерва в нормі та патології*, Лілея-НВ, Івано-Франківськ (2009).
2. Е. С. Петрова, “Применение стволовых клеток для стимуляции регенерации поврежденного нерва”, *Цитология*, **54**, № 7, 525-540 (2012).
3. Г. М. Бутенко, Ю. Б. Чайковский, “Стовбурові клітини і проблема відновлення периферичних нервів”, *Мистецтво лікування*, **101**, № 5, 56-58 (2013).
4. Y. Amoh, L. Li, R. Campillo, et al., “Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves,” *PNAS*, **102**, No. 49, 17734-17738 (2005).
5. M. Sieber-Blum, M. Grim, and Y. F. Hu, “Pluripotent neural

- crest stem cells in the adult hair follicle,” *Dev. Dynamics*, **231**, 258-269 (2004).
6. R. G. Vasyliev, A. E. Rodnichenko, D. A. Zubov, et al., “*In vitro* properties of neural crest-derived multipotent stem cells from a bulge region of whisker follicle,” *Biotechnol. Acta*, **7**, No. 4, 71-79 (2014).
 7. А. К. Коломийцев, Ю. Б. Чайковский, Т. Л. Терещенко, “Быстрый метод импрегнации азотнокислым серебром элементов периферической нервной системы, пригодный для парафиновых и целлоидиновых срезов”, *Арх. анатомии*, **81**, № 8, 93-96 (1981).
 8. S. Madduri and B. Gander, “Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration,” *J. Peripheral. Nerv. System*, **15**, 93-103 (2010).
 9. R. Seitz, K. Reiners, F. Himmelmann, et al., “The blood-nerve barriers in Wallerian degeneration: a sequential long-term study,” *Muscle Nerve*, **12**, No. 8, 627-635 (1989).