

УДК 618.393.018.82:616.832-0011

*А.Н. Сукач, А.С. Лебединский, О.В. Оченашко, А.Ю. Петренко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

ВЛИЯНИЕ ФЕТАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ КОНЕЧНОСТЕЙ КРЫС С ТРАВМАТИЧЕСКИМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ СПИННОГО МОЗГА

Изучали эффективность и безопасность трансплантации фетальных нервных клеток крысам с экспериментальным травматическим повреждением спинного мозга. Было показано, что трансплантация криоконсервированных нервных клеток плодов крыс животным с экспериментальным повреждением спинного мозга оказывает стимулирующее воздействие на процессы восстановления спинного мозга крыс и не приводит к формированию злокачественных и доброкачественных образований, что позволяет говорить о безопасности их трансплантации.

Ключевые слова: фетальные нервные клетки, повреждение спинного мозга, трансплантация, безопасность.

Причиной возникновения нейродегенеративных болезней является гибель нейронов и клеток глии вследствие либо острых (инсульт, травматические повреждения головного и спинного мозга), либо хронических (болезнь Паркинсона, амиотрофический боковой склероз, болезнь Альцгеймера) повреждений мозга. Для восстановления потерянных нервных клеток можно использовать трансплантацию нервных стволовых клеток или их производных, например, нейробластов [1].

Одним из наиболее перспективных источников клеток для такой клеточной терапии являются фетальные нервные ткани. Последние представляют собой гетерогенную смесь, которая главным образом состоит из дифференцированных, прогениторных и стволовых клеток. Однако в связи с потенциальной плюрипотентностью фетальных клеток и их высокой пролиферативной активностью существует опасность возникновения аберрантных клеток, что может привести к образованию опухолей. Поэтому вопрос безопасности требует тщательного изучения до использования фетальных нервных клеток в терапевтических целях.

Исходя из этого, целью работы явилось изучение эффективности и безопасности трансплантации фетальных нервных клеток крысам с экспериментальным травматическим повреждением спинного мозга.

Материал и методы. Нервные клетки получали из тканей мозга плодов крыс 15–16 дней гестации. Для этого ткань мозга помещали в 0,25 % раствор трипсина, инкубировали 5 минут при 37 °С, затем переносили в питательную среду DMEM/F12, содержащую 10 % сыворотки крови крыс, и механически дезагрегировали на единичные клетки. Полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновый фильтр. Жизнеспособность клеток оценивали по исключению 0,4 % красителя трипанового синего. Подсчет жизнеспособности и количества нервных клеток производили в камере Горяева.

Замораживание нервных клеток проводили в среде культивирования при наличии 10 % ДМСО со скоростью 1 °С/мин до –80 °С, после чего контейнеры с клетками помещали в жидкий азот.

Для определения жизнеспособности нервных клеток культивировали в 24-луночных планшетах (Corning, США) в среде DMEM/F12 (Sigma), обогащенной 0,6 % глюкозы, 2 мМ глутамина, 3 мМ бикарбоната натрия, 10 % эмбриональной бычьей сыворотки.

Культуры нервных клеток иммуноцитохимически окрашивали на наличие специфического маркерного белка нейронов β -тубулин III [2].

Формирование модели травматического повреждения спинного мозга проводили на лабораторных крысах-самцах массой 250–

© А.Н. Сукач, А.С. Лебединский, О.В. Оченашко, А.Ю. Петренко, 2011

400 г. Операцию проводили в стерильных условиях под анестезией тиопенталом натрия. Повреждение формировали путем удаления правой сегмента спинного мозга длиной около 2 мм на уровне 10-го позвонка грудного отдела. После этого непосредственно после операции в зону повреждения трансплантировали: 50 мкл среды DMEM/F12 (контроль 1; n=18); 100 мкл 13 % альгинатного геля, смешанного в соотношении 1:1 со средой DMEM/F12 (контроль 2; n=15); 50 мкл деконсервированной суспензии нервных клеток, содержащей 15–20 млн клеток (клеточная терапия 1; n=14) и 100 мкл 13 % альгинатного геля, смешанного в соотношении 1:1 с деконсервированной суспензией НК, содержащей 15–20 млн клеток (клеточная терапия 2; n=17).

У прооперированных животных регистрировали двигательные функции и болевую чувствительность задних конечностей через 1 неделю, 1, 6 и 12 месяцев.

Результаты и их обсуждение. Жизнеспособность свежeweделенных нервных клеток, определенная по окрашиванию трипановым синим, составляла $(55 \pm 7) \%$. После замораживания–оттаивания жизнеспособность НК уменьшалась и составляла $(36 \pm 9) \%$. Через 7 суток культивирования клетки, посеянные в концентрации 4 млн/мл, формировали монослой на 100 % площади лунки. Морфологически большинство этих клеток представляли собой клетки глии. Однако в монослое также отмечалось небольшое количество β -тубулин-III-положительных клеток, которые характеризовались нейрональной морфологией.

Прооперированные животные характеризовались устойчивым нарушением двигательной функции задних конечностей.

Через 1 неделю после операции животные как контрольной группы, так и группы, которой вводили в зону повреждения альгинатный гель, характеризовались ограниченной подвижностью левой задней конечности и полной неподвижностью и отсутствием

болевой чувствительности — правой. Через 1 месяц после операции наблюдалось существенное восстановление чувствительности левой задней конечности вплоть до полной нормализации. При этом у животных обеих групп было отмечено восстановление болевой чувствительности правой задней конечности, однако ее подвижность или вообще не восстанавливалась, что сопровождалось атрофией мышц, или восстанавливалась в очень незначительной степени и ограничивалась появлением мышечного тонуса. У животных обеих групп также наблюдался парез правой половины брюшной стенки. В ходе дальнейшего наблюдения на протяжении 12 месяцев подвижность задних конечностей медленно восстанавливалась, но полного восстановления не происходило.

Животные, которым вводили в зону повреждения только суспензию деконсервированных нервных клеток и такую же суспензию, смешанную с альгинатным гелем, через 1 неделю после операции характеризовались отсутствием подвижности и чувствительности в правой задней конечности и слабым мышечным тонусом или ограниченной подвижностью — левой. Через 1 месяц после операции наблюдалось значительное восстановление чувствительности левой задней конечности, а также ограниченное восстановление подвижности правой — животные на нее опирались, наблюдался хватательный рефлекс пальцев. Через 6 месяцев после операции степень подвижности обеих конечностей прогрессивно восстанавливалась, также наблюдалось восстановление атрофированных мышц. На протяжении последующих 6 месяцев наблюдалось медленное восстановление подвижности задних конечностей. Однако незначительные нарушения подвижности правой задней конечности сохранялись спустя 12 месяцев после трансплантации.

За время наблюдений никаких злокачественных или доброкачественных образований ни у 1 из 35 прооперированных под-



Фрагменты спинного мозга крыс через 4 месяца после трансплантации в зону повреждения (стрелка) альгинатного геля с фетальными нервными клетками (а) и без них (б)

опытных животных, которым были трансплантированы фетальные клетки, выявлено не было.

В то же время при введении геля с клетками (рисунок, а) в зону повреждения улучшался процесс восстановления нервной ткани относительно такового при введении только альгинатного геля (рисунок, б).

Таким образом, трансплантация криоконсервированных нервных клеток плодов

крыс животным с экспериментальным повреждением спинного мозга оказывает стимулирующее воздействие на процессы восстановления спинного мозга крыс.

Трансплантация криоконсервированных нервных клеток плодов крыс не приводит к формированию ни злокачественных, ни доброкачественных образований, что позволяет говорить о безопасности их трансплантации.

Работа выполнена при поддержке гранта УНТЦ (проект № 4419).

Список литературы

1. Сукач А. Н. Клеточная терапия нейродегенеративных болезней: источники клеток и стратегия их применения / А. Н. Сукач, В. И. Грищенко // Успехи современной биологии. — 2007. — Т. 127, № 1. — С. 25–33.
2. Сукач А. Н. Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом / А. Н. Сукач // Цитология. — 2005. — Т. 47, № 3. — С. 207–213.

О.М. Сукач, О.С. Лебединський, О.В. Оченашко, О.Ю. Петренко

ВПЛИВ ФЕТАЛЬНИХ НЕРВОВИХ КЛІТИН НА ВІДНОВЛЕННЯ РУХЛИВОСТІ КІНЦІВОК ЩУРІВ З ТРАВМАТИЧНИМ УШКОДЖЕННЯМ СПИННОГО МОЗКУ

Вивчали ефективність і безпеку трансплантації фетальних нервних клітин щурам з експериментальним травматичним ушкодженням спинного мозку. Було показано, що трансплантація криоконсервованих нервних клітин плодів щурів тваринам з експериментальним ушкодженням спинного мозку чинить стимулюючу дію на процеси відновлення спинного мозку щурів і не призводить до формування злоякісних і доброякісних утворень, що дозволяє говорити про безпеку їх трансплантації.

Ключові слова: фетальні нервові клітини, ушкодження спинного мозку, трансплантація, безпека.

A.N. Sukach, A.S. Lebedinsky, O.V. Ochenashko, A.Yu. Petrenko

INFLUENCE OF FETAL NERVOUS CELLS ON RENEVAL OF MOBILITY OF EXTREMITIES OF RATS WITH THE TRAUMATIC DAMAGE OF SPINAL CORD

Efficacy and safety of transplantation of fetal neural cells to the rats with the experimental traumatic damage of spinal cord was studied. It was shown, that transplantation of cryopreserved neural cells from rat fetuses in rats with the experimental damage of spinal cord stimulates processes of renewal of spinal cord of animals and does not result either in malignant or innocent tumor growth, that allows to conclude safety of fetal cell transplantation.

Key words: fetal neural cells, damage of spinal cord, transplantation, safety.