

6. *Chetverukhin V. K.* Role of praeoptic recess ependyma in the formation and physiologic regeneration of the Nucleus praeopticus in amphibians. Neurosecretion and Neuroendocrine Activity: Evolution, Structure, Function / Ed by W. Bargmann, A. Okshe et al. Berlin, Heidelberg, New York, 1978. P. 145–151.
7. *Онищенко Л. С.* Исследование функциональной морфологии преоптического ядра лягушки (*Rana temporaria* L.) в связи с его физиологической регенерацией: Автореф. дис... канд. биол. наук. Л., 1984.
8. *Гомазков О. А.* Старение мозга и нейротрофическая терапия. М.: Икар, 2011.

Петрова Е. С., Исаева Е. Н., Коржевский Д. Э.

ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ В СУСПЕНЗИОННЫХ ТРАНСПЛАНТАТАХ ЭМБРИОНАЛЬНОГО СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОМ НЕРВЕ ВЗРОСЛЫХ ЖИВОТНЫХ

*Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (заведующий – д. м. н. Д. Э. Коржевский) Отдела общей и частной морфологии
ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины»
СЗО РАМН, Санкт-Петербург, e-mail: iemtmorphol@yandex.ru*

Для стимуляции регенерации периферических нервных проводников в последние полтора десятилетия в экспериментах на лабораторных животных активно разрабатываются экспериментальные подходы, в которых используются различные стволовые клетки (СК): мезенхимные СК, нейральные стволовые/прогениторные клетки, СК из волосяных фолликулов и другие [см. обзоры: 4,6,8]. С помощью морфометрических, физиологических и электрофизиологических методов установлено, что клеточная терапия может способствовать росту нервных волокон. При этом, несмотря на значительное число публикаций по данной тематике, судьба пересаживаемых стволовых клеток и клеток-предшественников до конца не ясна. Имеются данные, что нейральные стволовые/прогениторные клетки после введения в поврежденный нерв или кондуит, соединяющий проксимальный и дистальный сегменты перерезанного нерва, выживают и дифференцируются в нейроны [5, 7, 8]. При этом практически отсутствуют работы, в которых изучается медиаторная принадлежность таких нейронов. На эту тему имеются лишь единичные исследования [7]. Тем не менее изучение цитогенеза используемых в качестве терапии клеток поможет выявить молекулярные механизмы их влияния на регенерацию нервных волокон.

Цель работы – выяснить возможность дифференцировки холинергических нейронов в суспензионных трансплантатах эмбрионального спинного мозга крысы после пересадки в поврежденный нерв.

Работа выполнена на крысах Вистар ($n = 10$). Содержание животных и все эксперименты осуществляли с учетом правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. Седалищные нервы крыс-реципиентов повреждали путем

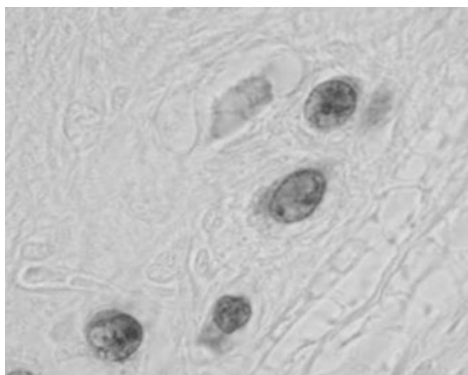


Рис. 1. Отдельные нейроны в толще нерва через 2 мес. после трансплантации. Иммуногистохимическая реакция на NeuN. Ув. 1000×

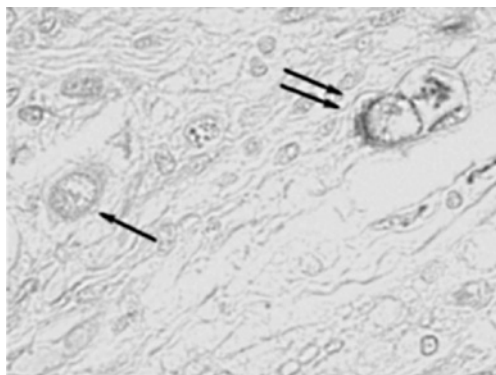


Рис. 2. Нейроны в нервном стволе через 2 мес. после трансплантации. Двойная стрелка – холинергический нейрон; стрелка – ChAT-негативный нейрон. Иммуногистохимическая реакция на ChAT. Ув. 1000×

наложения лигатуры в течение 40 с. У эмбрионов крыс 15 сут развития выделяли фрагменты шейного отдела спинного мозга, содержащие нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК). Эмбриональные закладки диссоциировали с помощью химопсина по описанной ранее методике [5], и полученную взвесь клеток вводили под периневрий поврежденного седалищного нерва взрослых крыс. Через 2 мес. после операции фрагменты нерва фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [3] и после соответствующей обработки заливали в парафин. На парафиновых срезах толщиной 5 мкм проводили иммуногистохимические реакции для выявления специфических маркеров. Использовали моноклональные мышинные антитела к ядерному антигену нервных клеток NeuN (клон A60; Chemicon, США) в разведении 1:400. В качестве вторичных реагентов для белка NeuN использовали реактивы из набора EnVision+System Labeled Polymer-HRP Anti-Mouse (K4001) (Dako, Дания). Для выявления холинергических нейронов применяли моноклональные козы антитела к холинацетилтрансферазе (ChAT) и проводили реакцию по описанному ранее протоколу [2].

Исходным материалом для трансплантации служил шейный отдел спинного мозга эмбрионов крыс 15 сут развития. Ранее установлено, что в этот срок в области крыловидной пластинки спинного мозга в большом количестве представлены НСПК, содержащие специфические маркеры [5]. В области презумптивных передних рогов в этот срок развития присутствуют более дифференцированные клеточные элементы: нейробласты и молодые нейроны. Тест на жизнеспособность (с применением трипанового синего), который был проведен после диссоциации эмбриональных закладок, показал, что не менее 85 % клеток выживают после диссоциации. С помощью иммуногистохимического исследования мазков, приготовленных из полученной для трансплантации взвеси клеток, выявлено, что большинство составляющих ее клеток представляют собой НСПК, которые содержат маркер Msi 1 [5]. Через 2 мес. после операции определить пересаженные клетки в толще нервных

стволов реципиентов обычными гистологическими методами было весьма затруднительно. Некоторые отдельные дифференцирующиеся нейроны встречались между нервными волокнами реципиента, однако лишь иммуногистохимическое исследование позволило четко выявить одиночные NeuN-содержащие нейроны (рис. 1).

Порой они располагались небольшими группами, состоящими из двух-трех клеток. С помощью иммуногистохимической реакции на холинацетилтрансферазу среди нейронов трансплантатов удалось выявить холинергические. Одиночные клетки небольших размеров располагались между нервными волокнами реципиента. Они имели округлую или овальную форму, светлые ядра, небольшой ободок цитоплазмы и достигали размеров 15–18 мкм (рис. 2).

Следует отметить, что описанные клетки отличаются от холинергических мотонейронов спинного мозга крыс. Судя по размеру, объему цитоплазмы, интенсивности иммуногистохимической реакции и по отсутствию дендритов, визуализируемых на значительном расстоянии, клетки суспензионных трансплантатов не достигают уровня дифференцировки, характерного для ChAT-содержащих нейронов шейного отдела спинного мозга крыс, развивающихся *in situ* [1].

Таким образом, в работе показано, что диссоциированные клетки спинного мозга эмбрионов крыс 15 сут развития реализуют свои гистобластические потенции и дифференцируются в NeuN-иммунопозитивные нейроны после пересадки в поврежденный нерв. Установлено, что небольшое число таких нейронов является холинергическими, что свойственно мотонейронам спинного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колос Е. А., Коржевский Д. Э. Изучение распределения холинергических и нитроксидазических нейронов в спинном мозге новорожденных и взрослых крыс // Морфология. 2014. Т. 145. № 3. С. 45.
2. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П., Кирик О. В., Зеленкова Н. М., Сухорукова Е. Г. Метод иммуноцитохимического выявления холинергических нейронов в центральной нервной системе лабораторных животных // Морфология. 2013. Т. 144. № 6. С. 69–72.
3. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П., Отеллин В. А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях // Морфология. 2006. Т. 129. № 1. С. 85–86.
4. Петрова Е. С. Применение стволовых клеток для стимуляции регенерации поврежденного нерва // Цитология. 2012. № 7. С. 525–540.
5. Петрова Е. С., Исаева Е. Н., Коржевский Д. Э. Развитие диссоциированных клеток различных закладок ЦНС крысы в условиях пересадки в поврежденный нерв // Морфология. 2013. Т. 143. № 2. С. 30–34.
6. Чельшев Ю. А. Регенерация в нервной системе. Руководство по гистологии / Под ред. Р. К. Данилова. СПб.: СпецЛит., 2011. Т. 1. С. 656–665.
7. Baez J. C., Gajavelli S., Thomas C. K., Grumbles R. M., Aparicio B., Byer D., Tsoulfas P. Embryonic cerebral cortex cells retain CNS phenotypes after transplantation into peripheral nerve // Exp. Neurol. 2004. Vol. 189. № 2. P. 422–425.
8. Walsh S., Midha R. Use of stem cells to augment nerve injury repair // Neurosurgery. 2009. Vol. 65. № 4. P. 80–86.