

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

УДК 576.5

№ ИС ГЗ 0108-2015-0061



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«27» января 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА НОВОЙ БИМЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ ЛЕЧЕНИЯ
ПОВРЕЖДЕНИЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ, ОСНОВАННОЙ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ КЛЕТОК
ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА, ПРОИСХОДЯЩИХ ИЗ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ

Программы Президиума РАН П.1П «Фундаментальные исследования для разработки
медицинских технологий»

(отчет за 2016 г.)

Руководитель темы,
член-корреспондент РАН., в.н.с.

Е.А. Воротеляк

подпись, дата

Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, д-р биологических наук



Е.А. Воротеляк

подпись, дата

Исполнители:
Доктор биол. наук



М.А. Александрова

подпись, дата

Доктор биол. наук



В.В. Терских

подпись, дата

Младший научный сотрудник



А.В. Косых

подпись, дата

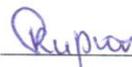
Младший научный сотрудник



Е.П. Калабушева

подпись, дата

Младший научный сотрудник



К.К. Сухинич

подпись, дата

СОДЕРЖАНИЕ

Реферат	4
Введение	5
Обозначения и сокращения	6
Результаты	7
Заключение	10
Публикации по теме	11

Реферат

Отчет 11 с., 1 ч., 6 рис.. 3 источника (публикации).

Ключевые слова: клетки нервного гребня, волосяной фолликул, трансплантат, область балдж, дермальная папилла

Целью данного проекта является создание компонента из клеток нервного гребня волосяного фолликула человека для разработки биотехнологического продукта, предназначенного для стимуляции восстановления нервной ткани и ее функций.

Проведен молекулярный анализ культур клеток области балдж человека, усовершенствована модель нейротрансплантации, исследовано влияния наличия различных матриксов в составе трансплантата, влияния предварительной дифференцировки культур на интеграцию и продолжительность жизни клеток трансплантата.

Исследованы потенции трансплантатов культуры клеток нервного гребня, переведенной в форму клеточных сфероидов, а также трансплантатов, комбинированных из двух областей волосяного фолликула: балдж и дермальной папиллы.

Введение

Целью данного проекта является создание компонента из клеток нервного гребня волосяного фолликула человека для разработки биотехнологического продукта, предназначенного для стимуляции восстановления нервной ткани и ее функций.

Задачи этапа: исследование приоритетных направлений дифференцировки (нейроны, глия) клеток НГВФ в контакте с нейральными тканями, анализ взаимодействия клеток нервного гребня из волосяного фолликула (НГВФ) с тканями центральной и периферической нервной системы, изучение взаимодействия клеток дермальной папиллы (ДП) с клетками НГВФ при совместной трансплантации, исследование влияния антиапоптотических агентов на клетки трансплантата.

Результаты

Показана нейральная дифференцировка интактных клеток НГВФ в контакте с тканями головного мозга в культуре. Исследовано влияние эмбрионального спинного и головного мозга (центральная нервная система (ЦНС)), а также седалищного нерва (периферическая нервная система (ПНС)) на клетки НГВФ. Показано стадийспецифическое поведение клеток НГВФ в культуре с эмбриональными клетками ЦНС. Продемонстрировано, что в культуре с клетками ПНС потенции клеток НГВФ выше.

Во всех исследованиях клеток НГВФ мыши были использованы культуры ранних пассажей, полученные из вибрисс трансгенных мышей, несущих ген GFP под промотером актина.

Для более подробного анализа взаимодействия клеток НГВФ со структурами головного мозга была продолжена работа с моделью культивирования клеток на переживающих срезах головного мозга мыши. В серии экспериментов было показано, что клетки НГВФ в непосредственном контакте с тканями головного мозга постепенно теряют экспрессию характерных маркеров нервного гребня (НГ) (nestin, p75), их пролиферация постепенно снижается (Рис. 1). На 7 сутки эксперимента была показана экспрессия даблкортина (маркера нейральных предшественников и незрелых нейронов) клетками НГВФ (Рис. 2), что означает, что для начала дифференцировки постнатальных клеток нервного гребня (ПКНГ) в нейральном направлении достаточно микроокружения клеток головного мозга.

Обозначения и сокращения:

DAPI - 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид

ГМ – головной мозг

ДП - дермальная папилла

МТТ-тест — колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток, используется краситель МТТ – желтый тетразол (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразол)

НГ – нервный гребень

НГВФ - нервный гребень из волосяного фолликула

ПКНГ - постнатальные клетки нервного гребня

ПНС – периферическая нервная система

СКНГ-ВФ - стволовые клетки, происходящие из нервного гребня и области балдж волосяного фолликула

СМ – спинной мозг

СН – седалищный нерв

ЭПО - эритропоэтин

Результаты

Для исследования взаимодействия клеток НГВФ с различными типами тканей нервной системы был проведен ряд экспериментов с образцами тканей эмбрионального головного мозга (ГМ), спинного мозга (СМ) разных стадий развития и постнатального седалищного нерва (СН) в модели миграции.

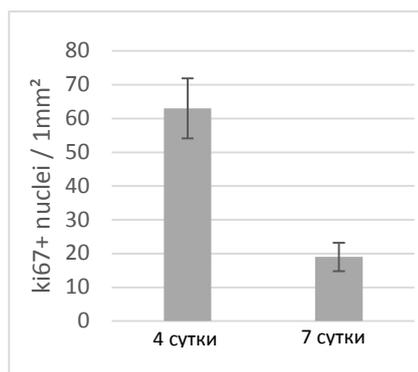


Рисунок 1. Пролиферация клеток НГВФ на переживающих срезах головного мозга мыши

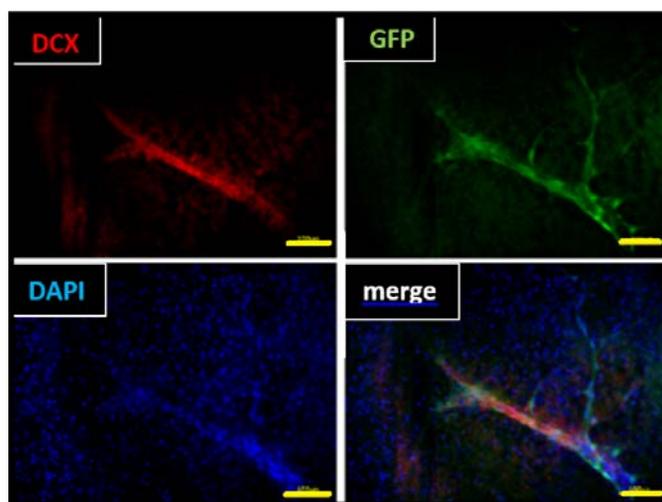


Рисунок 2. Экспрессия даблкортина GFP+ клетками НГВФ на переживающих срезах головного мозга мыши. 7 сутки культивирования. Ядра окрашены DAPI.

Суспензию GFP+ клеток НГВФ помещали в центр лунки культурального плато, а на периферии – в случае эмбриональных тканей (ГМ и СМ), суспензию клеток в капле коллагенового геля или биопсию СН (Рис. 3). Далее измеряли площадь покрытия клетками пластика каждые три дня. В контрольных группах клетки НГВФ культивировали без нейральных клеток, в культуральных средах клеток НГВФ, нейральных клеток, а также в присутствии коллагена.

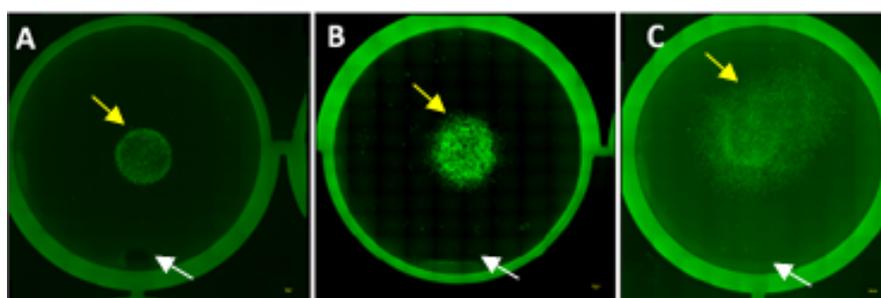


Рисунок 3. Миграция GFP+ клеток НГВФ (желтая стрелка) в присутствии СМ, ГМ или СН (белая стрелка). (А) 0 сутки, (В) 4 сутки, (С) 14 сутки.

Показано, что в присутствии суспензии клеток ГМ и СМ стадии развития E18.5 миграция клеток НГВФ значительно снижена, в то время как для стадии E12.5 ингибирование скорости миграции меньше или она совпадает с контрольными группами (Рис. 4). Это соответствует поведению клеток НГ в ходе эмбрионального развития: в 12.5E стадию идет активная миграция НГ, тогда как на 18.5E и далее в постнатальном периоде происходит заселение целевых органов, дифференцировка, формирование ниши.

Лидирующих направлений миграции выявлено не было.

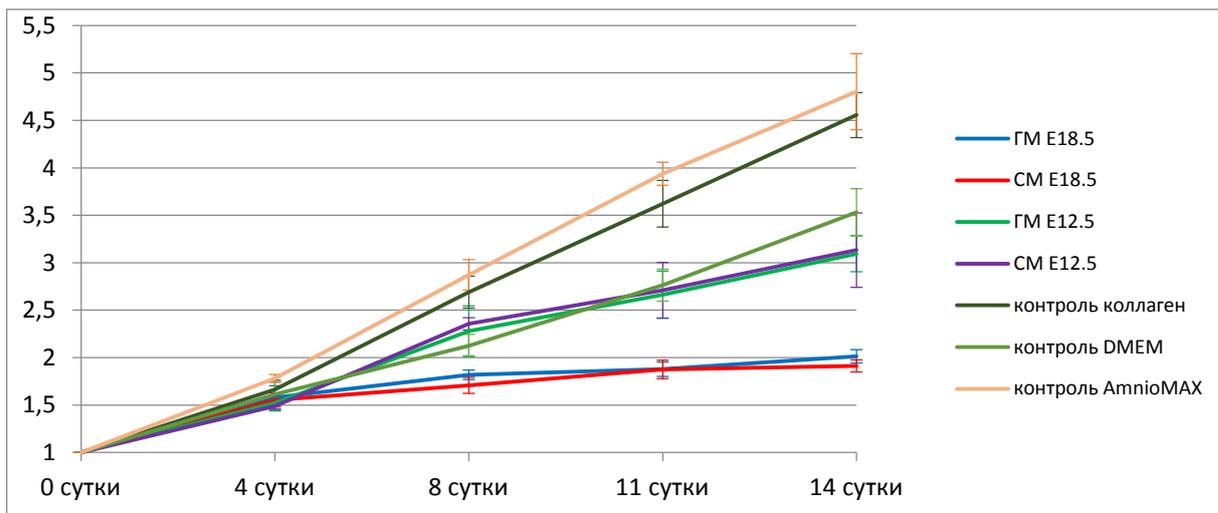


Рисунок 4. Миграция клеток НГВФ в присутствии клеток ГМ и СМ 12.5E и 18.E стадии развития.

В эксперименте с СН было показано, что ингибирования не происходит, клетки НГВФ сохраняют свои миграционные потенциалы (Рисунок 5).

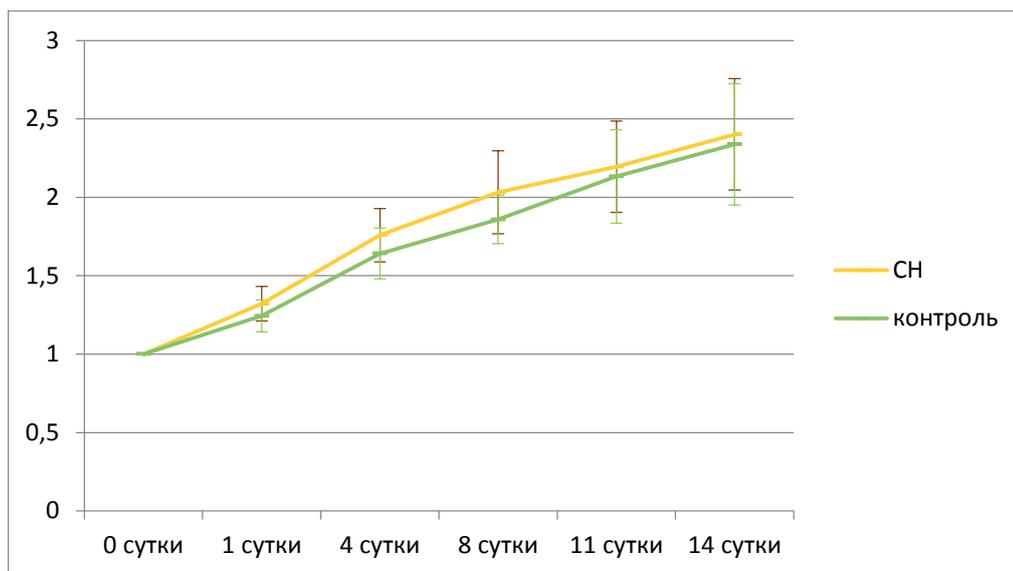


Рисунок 5. Миграция клеток НГВФ в присутствии клеток СН.

Была продолжена работа по усовершенствованию состава нейротрансплантата. Была проведена серия трансплантаций с использованием клеток дермальной папиллы ДП для определения оптимального соотношения двух культур волосяного фолликула в составе трансплантата. Было показано, что, если доля клеток ДП составляла 10-20% от общего объеме трансплантируемой суспензии ($5 \cdot 10^5$ клеток), GFP+ клетки НГВФ интегрировали в ткань мозга реципиента, срок жизни трансплантата превышал 20 суток.

Было исследовано влияние эритропоэтина (ЭПО) (гемопоэтический фактор, антиапоптотический агент) на клетки НГВФ. По результатам МТТ-теста показано, что ЭПО способен стимулировать пролиферацию клеток НГВФ в культуре в концентрации 1 нг/мл (Рисунок 6).

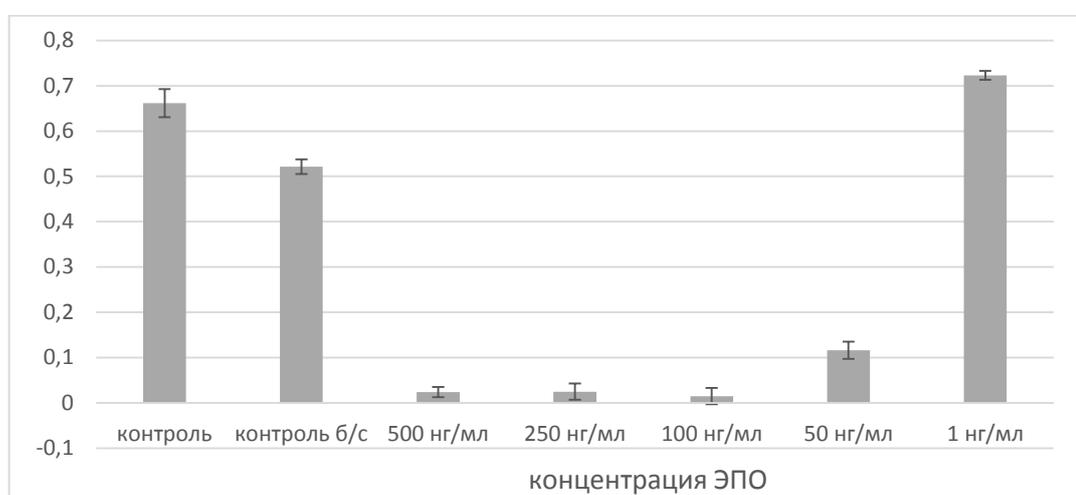


Рисунок 6. Влияние ЭПО на пролиферацию клеток НГВФ. МТТ-тест.

В ходе проведения данного этапа проекта нами было продемонстрировано, что интактные клетки НГВФ способны дифференцироваться в нейральном направлении под влиянием тканей головного мозга.

Показано, что периферическая нервная система (на примере СН) является наиболее перспективной областью применения клеток НГВФ в рамках данного проекта. Факторы, выделяемые клетками СН позволяют клеткам НГВФ дольше сохранять свои потенции.

Кроме того, было выявлено оптимальное соотношение клеток ДП и НГВФ в составе трансплантата для увеличения срока его жизни, а также продемонстрировано, что ЭПО является перспективным его компонентом.

Заключение

В дальнейшем представляется перспективным изучить взаимодействие клеток НГВФ с периферической нервной системой (например, на модели повреждения седалищного нерва), в соответствии с полученными данными по составу трансплантата, а также подробнее изучить влияние антиапоптотических факторов на повышение качества трансплантируемого материала.

При выполнении исследований планируется разработать протоколы направленной дифференцировки стволовых клеток, происходящих из нервного гребня из области балдж волосяного фолликула (СКНГ-ВФ) в нейральном и/или глиальном направлении; исследовать возможность заселения СКНГ-ВФ скэффолда (каркаса) с целью создания трехмерной конструкции для последующей трансплантации; разработать модель повреждения периферического нерва и микрохирургические подходы для проведения трансплантаций полученных конструкций в поврежденный периферический нерв лабораторных животных; после проведенных операций с помощью современных методов визуализации и иммуногистохимического окрашивания проследить судьбу трансплантированных клеток и произвести анализ их взаимодействия с тканью реципиента.

Публикации по теме

Количество научных публикаций в журналах, индексируемых в международной информационно-аналитической системе научного цитирования **Web of Science**

- 1 Файзулин А.К., Поддубный И.В., Кононов А.В., Врублевский С.Г., Шмыров О.С., Федорова Е.В., Колосова П.А., Роговая О.С., Стрелкина Л.А. Пластика мочеиспускательного канала с использованием аутологичных кератиноцитов на биodeградирующем матриксе у детей с проксимальными формами гипоспадии // Андрология и генитальная хирургия. 2016. Т 17. С. 85-97.

Прочие публикации

1. Kosykh A., A. Beilin A., E. Vorotelyak E. Hair follicle neural crest stem cells interaction with mouse brain // 17th meeting of the European hair research society, Tbilisi, Georgia, 2016. P. 45-46
2. Косых А.В., Воротеляк Е.А. Взаимодействие клеток нервного гребня волосяного фолликула с головным мозгом мыши // XVII конференция-школа с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития», Владимирская обл., АО «Генериум», 2016. С. 23-24

Запланированный в ГЗ на 2016 год показатель, характеризующий объем работ, выполнен.

Отчет по Программе Президиума РАН утвержден решением Ученого совета ИБР РАН « 27 »
декабря 2016 г., протокол № 14