

Gelmatris av hyaluronsyra förbättrar neuronal överlevnad i ryggmärgskulturer från möss

Schizas, N1; Rojas, R2; Kootala S2; Andersson, B1; Pettersson, J1; Hilborn, J2; Hailer, NP1
1SpineLab, Institutionen för kirurgiska vetenskaper, Uppsala Universitet 2Division för polymerkemi,
Institutionen för materialkemi, Ångströmlaboratoriet, Uppsala Universitet

Introduktion

Organotypiska ryggmärgskulturer (ORK) är en ny och spännande in vitro-modell för ryggmärgsskada. Dock har begränsningar såsom tidig förlust av motorneuroner observerats i dessa kulturer vilket lämnar utrymme för förbättringar. Extracellulär matris (ECM) är en viktig vävnadskomponent som upprätthåller cellulära interaktioner, och många syntetiska biomaterial är baserade på ECM-komponenter. Syftet med denna studie var att undersöka om ORK odlade på ett substrat bestående av hyaluronsyregel resulterar i förbättrad neuronal överlevnad.

Material och metoder

ORK erhöles från möss mellan den 6:e och 9:e postnatala dagen och odlades under fyra dagar in vitro, antingen på ett substrat av hyaluronsyregel (HA-gel-grupp), på ett substrat av kollagengel (kollagen-grupp), direkt på polyetylentereftalat (PET) membran (kontroll-grupp) eller i närvaro av lösligt hyaluronsyra. Histokemi för "neuronal nuclei" (NeuN) följt av konfokal lasermikroskopi och kvantitativ analys utfördes. Detta kompletterades med histokemi för cholin-acetyltransferas (ChAT), glial fibrillary acidic protein (GFAP) och Griffonia simplicifolia isolectin B4 (IB4) följt av fluorescensmikroskopi och kvantitativ analys för att utvärdera och karakterisera neuronala celler och gliapopulationer.

Resultat

Konfokalmikroskopi analys visade en 4-faldig ökning av antalet NeuN-positiva neuroner i HA-gel gruppen jämfört med både kollagen ($p < 0,001$) och kontrollgruppen ($p < 0,001$). Jämfört med kulturer på PET-membran, uppvisade ORK odlade på hyaluronsyregel signifikant förbättrad vävnadskvalité och neuronal överlevnad, inklusive en 5,9-faldig ökning av överlevnaden av ChAT-positiva motorneuroner ($p = 0,008$), en 2-faldig ökning av antalet vilande mikroglia-celler i vita substansen ($p = 0,031$), och en 61,4% minskning av antalet aktiverade mikroglia-celler inom den gråa substansen ($p = 0,05$). Kvalitativ analys visade att ORK som odlades i närvaro av löslig hyaluronsyra inte såg bättre ut än kontrollgruppen. Hyaluronsyregelen hade en skjuvmodul (G') på ≈ 1.200 Pascal (Pa) vilket var väsentligt högre än de ≈ 25 Pa uppmätta för kollagengel.

Diskussion

Sammanfattningsvis finner vi att hyaluronsyregel som odlingssubstrat resulterar i en avsevärt förbättrad neuronal överlevnad i ORK från postnatala möss. I synnerhet överlever de ytterst känsliga och svårkultiverade motoneuronerna. Dessutom begränsas aktiveringen av mikroglia-celler både inom den vita och gråa substansen. De positiva effekterna av hyaluronsyrebaserad gel verkar åtminstone delvis bero på dess mekaniska egenskaper.