

В.І. ЦИМБАЛЮК, І.Г. ВАСИЛЬЄВА, Н.П. ОЛЕКСЕНКО,
Н.Г. ЧОПИК, О.І. ЦЮБКО, О.С. ГАЛАНТА, Н.Д. СНИЦАР

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова АМН України», Київ
E-mail: N.Oleksenko@gmail.com

СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ ЛЮДИНИ *IN VITRO*



Предметом дослідження були особливості росту в культурі фракції Nest-позитивних клітин головного мозку ембріонів людини. Наші дані демонструють вірогідне підвищення процентного вмісту Nest-позитивних клітин в клітинній популяції з 44,1 до 62,5 % у відповідь на наявність EGF та bFGF в поживному середовищі із термоінактивованою сироваткою. Подальше диференціювання в культурі призводить до зменшення чисельності Nest-позитивних клітин. Стимуляція нейроіндукції з використанням ретиноевої кислоти викликає зниження процентного вмісту цих клітин в популяції до 14,1 %. Результати роботи дозволять отримувати популяцію нервових клітин, більш ефективну для використання як матеріалу при клітинній терапії.

© В.І. ЦИМБАЛЮК, І.Г. ВАСИЛЬЄВА, Н.П. ОЛЕКСЕНКО,
Н.Г. ЧОПИК, О.І. ЦЮБКО, О.С. ГАЛАНТА, Н.Д. СНИЦАР,
2012

Вступ. Властивості популяції нервових клітин в культурі залежать від наявності в ній стовбурових клітин та їхньої загальної чисельності відносно інших клітинних елементів. В умовах *in vitro* цей показник визначає здатність до нарощування клітинної маси, формування нейросфер, направлено диференціювання під впливом нейроіндукторів. В умовах *in vivo* наявність достатньої кількості власних або трансплантованих стовбурових нервових клітин забезпечує регенерацію ушкоджених функцій нервової системи.

Маркери клітинних типів нервової системи є достатньо вивченими. Стовбурові клітини визначаються як нестин-позитивні (Nest⁺) [1]. Загальновизнаним маркером нейробластів є β-тубулін. Обидва маркери належать до білків проміжних філаментів, що забезпечують зв'язок між позаклітинним матриксом, цитоплазмою та ядром. Зміна типу проміжних філаментів відображує зміну функцій клітини та потреб клітинного транспорту.

Метою нашої роботи було дослідити чисельність згаданих клітинних типів у суспензійній культурі клітин ембріональної нервової системи людини та проаналізувати зміну їхнього співвідношення під впливом факторів-мітогенів та індукторів диференціювання.

Співвідношення між стовбуровими Nest⁺ клітинами та диференційованими β-тубулін⁺ нейробластами, на наш погляд, є важливим показником, що визначає пластичність популяції нервових клітин і дозволяє передбачити ефективність її застосування як матеріалу для нейротрансплантації та інших потреб.

Матеріали та методи. *Культивування клітин.* Для культивування використовували суспензію нервових клітин ембріонального мозку. Забір абортивного матеріалу здійснювали на підставі договору № 17 від 01.01.05 між Інститутом нейрохірургії АМН України та Київською міською клінічною лікарнею № 16. Тканину суспендували у розчині Хенкса («ПанЕко», РФ) шляхом механічного піпетування, доводили концентрацію клітин до 1–3 · 10⁶ в 1 мл. Суспензію розливали у стерильні чашки Петрі на скельця, вкриті поліетиленіміном.

Впродовж одного тижня зразки культивували на середовищі Ігла («ПанЕко», РФ) із додаванням термоінактивованої сироватки великої рогатої худоби («БіолоТ», РФ), збагаченому факторами EGF та bFGF в концентрації 20 нг/мл («Sigma», США) [2].

Стимуляцію направлено диференціювання клітин здійснювали додаванням ретиноевої кислоти («Sigma», США) в концентрації 1 мкМ [3]. При цьому контрольні зразки культивували на стандартному середовищі, збагаченому 10 % сироватки великої рогатої худоби (СВРХ). Заміну середовища здійснювали через 3–4 доби.

На 9-ту і 11-ту добу культуральні зразки фіксували для подальших досліджень.

Загальну кількість клітин підраховували в гемоцитометрі за допомогою забарвлення 0,2%-ним розчином трипанового синього («Janssen Chemica», Бельгія).

Імуногістохімія. Для подальшого проведення імуногістохімічних реакцій культуральні зразки фіксували 4%-ним параформальдегідом («Janssen Chemica», Бельгія) при 4 °С. Були використані первинні антитіла до нестину та β -тубуліну («Dako», Данія) у розведенні 1 : 200 та 1 : 50 відповідно та вторинні антитіла до мишиних та кролячих білків («Dako», Данія). Візуалізацію зв'язування проводили за допомогою системи Multivision Polymer Detection («Dako», Данія). Подальший аналіз препаратів здійснювали за допомогою світлового мікроскопу. Обчислення вмісту клітин різних типів проводили за результатами підрахунків їхньої чисельності в 10 полях зору.

Результати досліджень та їх обговорення. Загальний підрахунок чисельності та визначення життєздатності клітин в культурі не дозволяє в повній мірі передбачити властивості клітинної популяції. Сучасні потреби клітинної терапії вимагають характеристики клітинних типів, які присутні в ній, зокрема стовбурових клітин.

В роботі ми використовували суспензійну культуру клітин головного мозку ембріонів людини 9–10 тиж гестації з 12 зразків емб-

ріонального матеріалу. Співвідношення стовбурових клітин нервової системи та нейробластів оцінювали в умовах моделювання мітогенезу та направлено диференціювання за нейрональним типом.

За нашими даними, що наведені в таблиці, на момент отримання тканини в ній містилися нервові елементи в такому співвідношенні: Nest⁺ клітини становили 44,1 %, β -тубулін⁺ клітини – 17,1 %.

Гістологічний аналіз препаратів показав, що нервові клітини після суспендування протягом першої доби в культурі формували агрегати змішаної структури. Nest⁺ елементи були розташовані групами і являли собою малі та середні округлі клітини з великим світлим центрально розташованим ядром та вузьким обідком цитоплазми (рис. 1, див. вклейку в кінці номера). Nest⁺ активність була добре виражена та зосереджена по периферії клітини. β -тубулін⁺ клітини також мали округлу форму та велике незабарвлене ядро (рис. 1). Такий фенотип властивий клітинам, що не досягли кінцевих етапів диференціювання, внаслідок чого здатні до поділу та міграції.

Для збільшення чисельності в клітинній популяції стовбурових клітин та клітин – попередників нейрогенезу її піддавали впливу факторів-мітогенів EGF та bFGF, використовуючи поживне середовище з термоінактивованою сироваткою. За один тиждень чисельність клітинної популяції збільшилася в 12–14 разів, а вміст живих клітин досяг 92 % (таблиця). Можливо ці процеси стали результатом інтенсивного розмноження життєздатних клітин і, руйнування клітин, не здатних до існування в культурі.

Найперше місце серед клітинних типів, здатних розмножуватися в таких умовах, належить Nest⁺ клітинам. Статистично вірогідне збільшення чисельності з 42,1 до 62, 5 % свідчить про значне зростання їхнього вмісту в клітинній популяції (таблиця). Згідно з літературними даними під впливом bFGF відбувається активний поділ стовбурових нейрональних клітин [4].

Слід також зазначити, що спостерігалася тенденція до збільшення чисельності вже сформованих нейронів (β -тубулін⁺) (таблиця). Результати наших досліджень підтверджуються даними літератури. Зокрема, Shambra et al. [5] показали наявність фігур мітозу в холінергічних нейронах *in vivo*. Вірогідно, що подібні процеси мають місце в умовах *in vitro*, і сформовані нейробласти деякий час після диференціювання зберігають здатність до поділу та міграції.

Аналіз гістологічних препаратів показав, що Nest-позитивні клітини були розташовані маленькими групами по 2–6 клітин, що в свою чергу формували великий клітинний агрегат, у склад якого входили інші клітинні типи (рис. 2, див. вклейку). Часто Nest⁺-клітини знаходилися по периферії такого агрегату, і зона росту була сформована переважно ними. Вони збільшувалися у розмірах, мали велике світле ядро, часто розташоване асиметрично, та інколи набували овальної або полігональної форми (рис. 2). Такі морфологічні зміни свідчать про те, що незважаючи на відсутність агентів диференціювання в поживному середовищі, в популяціях стовбурових клітин відбувається не тільки активний поділ, а також реалізується програма диференціації.

Для стимуляції диференціювання подальше культивування здійснювали на повному

поживному середовищі із 10 % СВРХ та додаванням ретиноевої кислоти.

Результати проведених досліджень показали, що вже в контрольній групі заміна середовища спричиняла різке зниження вмісту Nest⁺ клітин із одночасним збільшенням β -тубулін⁺ фракції до 34,7 % на 9-ту добу та до 36,5 % на 11-ту добу культивування (таблиця). На гістологічних препаратах спостерігали значне зниження чисельності Nest⁺ клітин в зонах росту, які були сформовані переважно β -тубулін⁺ нейронами та незабарвленими клітинами гліального ряду (рис. 3, див. вклейку).

Додавання ретиноевої кислоти в культуральне середовище спричиняло ще більш значне зниження вмісту Nest⁺ клітин з одночасним підвищенням чисельності β -тубулін⁺ клітин до 44,8 % (таблиця). Відомо, що ця сполука здійснює нейроіндукцію шляхом регуляції рівня таких білків, як профілін-1 та статмін, які в свою чергу впливають на стан актинових філаментів та мікротрубочок [6]. Кінцевим результатом каскаду реакцій, які запускаються при наявності ретиноевої кислоти, є реорганізація цитоскелету та ріст аксонів.

На гістологічних препаратах β -тубулін⁺ клітини зустрічалися як у вигляді агрегатів, так і поодиноці в процесі формування відростків і встановлення контактів (рис. 4,

Імуногістохімічне виявлення різних типів нервових клітин в культурі клітин ембріональної нервової тканини людини

Строк культивування	Поживне середовище	Кількість клітин в полі зору, %		Вміст живих клітин, %
		Nest ⁺	β -тубулін ⁺	
Вихідний контроль	—	44,1 ± 3,6	17,1 ± 3,6	80
Фаза розмноження 7 діб	DMEM, 10 % терм. СВРХ, EGF, bFGF 20 нг/мл	62,5 ± 3,6*	28,1 ± 6,8	92
Фаза диференціювання 9 діб	Контроль	27,6 ± 9,2	34,7 ± 5,3	90
	Додавання ретиноевої кислоти	17,5 ± 6,7	42,3 ± 5,0	91
Фаза диференціювання 11 діб	Контроль	31,4 ± 4,4	36,5 ± 5,4	87
	Додавання ретиноевої кислоти	14,1 ± 6,3*	44,8 ± 5,0	90

* P < 0,05.

див. вклейку). Вони були поліморфними: зустрічалися округлі, зерноподібні та полігональні форми клітин. Окремі Nest⁺ клітини розташовувалися поодинокі, інтенсивність забарвлення була слабкою, центральна частина цитоплазми часто залишалася незабарвленою (рис. 4). Така зміна співвідношення клітин нервової тканини *in vitro* свідчить про інтенсивні процеси диференціювання та встановлення функціональних зв'язків між ними.

Отже, дослідження в культурі ембріональної нервової тканини вмісту Nest⁺ та β-тубулін⁺ клітин, а також співвідношення між ними дозволяє отримати інформацію стосовно ступеня диференціювання клітинної популяції, її пластичності і можливості використання як матеріалу для нейротрансплантації.

V.I. Tsymbaluk, I.G. Vasilyeva, N.P. Olexenko,
N.G. Chopic, O.I. Tsybko, E.S. Galanta, N.D. Snitcar
HUMAN NERVE STEM CELLS *IN VITRO*

The expansion of Nest-positive nerve stem cells fraction in the culture of human fetal brain was investigated in this work. Our results demonstrated the valuable increase of the percentage of Nest-positive cells from 44.1 to 62.5 % of cell population at the response to the presence of EGF and bFGF and using the heat-inactivated serum in the culture medium. Further differentiation in culture tended to decrease of Nest-positive cell amount. Stimulation of the neuroinduction with retinoic acid resulted in decrease of the percentage of these cells in the population to 14.1 %. This data allowed obtaining the nerve cell population more effective for using as a graft material in cell therapy.

В.І. Цимбалюк, І.Г. Васильєва, Н.П. Олексенко,
Н.Г. Чопик, О.І. Цюбко, Е.С. Галанта, Н.Д. Сницар

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ НЕРВНОЙ ТКАНИ
ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Предметом исследования были особенности роста в культуре фракции Nest-положительных клеток головного мозга эмбрионов человека. Наши данные демонстрируют достоверное повышение про-

центного содержания Nest-положительных клеток в клеточной популяции с 44,1 до 62,5 % в ответ на присутствие EGF и bFGF в культуральной среде с термоинактивированной сывороткой. Дальнейшая дифференцировка в культуре приводит уменьшению количества Nest-положительных клеток. Стимуляция нейроиндукции с использованием ретиноевой кислоты вызывает падение процентного содержания этих клеток в популяции до 14,1 %. Результаты работы позволяют получать популяцию нервных клеток, более эффективную для использования в качестве материала при клеточной терапии.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Викторов И.В. Стволовые клетки млекопитающих: биология стволовых клеток *in vivo* и *in vitro* // Изв. АН. Сер. биол. – 2001. – № 6. – С. 645–655.
2. Vescovi A.L., Parati E.A., Gritti A. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation // Exp. Neurol. – 1999. – **156**, № 1. – P. 71–83.
3. Takahashi J., Palmer T.D., Gage F.H. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived NSC cultures // J. Neurobiol. – 1999. – **38**. – P. 65–81.
4. Ostensfeld T., Svendsen C.N. Requirement for neurogenesis to proceed through the division of neuronal progenitors following differentiation of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2- responsive human neural stem cells // Stem Cells. – 2004. – **22**, № 5. – P. 798–811.
5. Schammbra U.B., Sulik K.K., Petrusz P., Lauder J.M. Ontogeny of cholinergic neurons in the mouse forebrain // J. Comp. Neurol. – 1989. – **288**, № 1. – P. 101–122.
6. Maltman D.J., Christie V.B., Collings J.C., Barnard J.H., Fenyk S., Marder T.B., Whiting A., Przyborski S.A. Proteomic profiling of the stem cells response to retinoic acid and synthetic retinoid analogues: identification of major retinoic-inducible proteins // Mol. BioSyst. – 2009. – **5**. – P. 458–471.

Надійшла 21.12.10