

УДК 57.085.2

СВОЙСТВА ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК НЕРВНОЙ ТКАНИ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС В КУЛЬТУРЕ

А. Н. Сукач^{1,2}
Т. Д. Ляшенко²
М. В. Шевченко²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
Харьков

²Харьковский национальный педагогический университет
им. Г. С. Сковороды, Украина

E-mail: an_sukach@yahoo.co.uk

Получено 10.10.2012

Показано, что изолированные клетки мозга новорожденных крыс являются гетерогенной суспензией, в состав которой наряду с окончательно дифференцированными входят стволовые и прогениторные клетки, способные пролиферировать и дифференцироваться в условиях культивирования *in vitro*. В процессе культивирования в присутствии сыворотки крови нервные клетки новорожденных крыс формируют агрегаты, в которых воссоздается утраченное при их выделении клеточное микроокружение и происходит восстановление клеток. После прикрепления к подложке клетки агрегатов мигрируют и распластаются, формируя монослой астроглии, на котором образуются нейробласты и колонии стволовых/прогениторных клеток. Полученные данные указывают на то, что культуру нервных клеток новорожденных крыс можно использовать в качестве модели постнатальной нервной ткани для исследования влияния клеточного окружения на процессы развития и восстановления дифференцированных нервных клеток, а также на пролиферацию и дифференциацию стволовых/прогениторных клеток.

Ключевые слова: дифференцированные нервные клетки, нервные стволовые/прогениторные клетки, новорожденные крысы, жизнеспособность, выживание, культивирование, многоклеточные агрегаты.

Исследование нервных стволовых/прогениторных клеток человека и животных имеет большое значение для выяснения особенностей развития нервной системы и возникновения нейродегенеративных заболеваний, а также разработки новых терапевтических подходов для их лечения. В настоящее время развитие нервной системы человека и животных в процессе эмбриогенеза достаточно хорошо изучено. При этом поведение нервных предшественников в процессе нейро- и глиогенеза в постнатальном и взрослом мозге во многом остается не изученным. Не вполне объяснимо также влияние клеточного микроокружения на пролиферацию и дифференциацию нервных стволовых/прогениторных клеток в постнатальном мозге. В качестве модели для изучения постнатального нейрогенеза, глиогенеза и их взаимосвязи, развития апоптоза клеток, возможного нейрогенного репарационного ответа клеток мозга при различных повреждениях мозга, механизмов нервного дифференцирования, экспрессии генов, а также влияния сигналов микроокруже-

ния, регулирующих фенотипическую специализацию в нервных тканях млекопитающих, могут быть использованы культуры клеток, изолированных из нервных тканей новорожденных лабораторных животных. В связи с этим актуальной является разработка способов получения нервных клеток новорожденных крыс, их характеристика и выяснение особенностей поведения в культуре *in vitro*.

Материалы и методы

Нервные клетки (НК) выделяли из тканей головного мозга новорожденных крыс. Для этого ткань, предварительно измельченную ножницами, инкубировали 5 мин в 0,5% -м растворе трипсина при 37 °С, затем механически дезагрегировали на единичные клетки с использованием вибрации [1]. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр, после чего отмывали от трипсина центрифугированием при 1500 об/мин. Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию витальным красителем

трипановым синим (0,4%; Sigma, США) и выражали в процентах [2]. Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева, размер НК определяли при помощи программы Axio Vision.

Клетки культивировали в 24-луночных планшетах (Corning, США) в среде DMEM/F12 (Sigma), обогащенной 0,6% глюкозы, 2 мМ глутамин, 3 мМ бикарбоната натрия. В среду добавляли 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO₂, 95% воздуха. Половину объема среды культивирования заменяли на свежую порцию каждые 4–5 суток.

Иммуноцитохимические исследования клеточных культур осуществляли после их предварительной фиксации в растворе 4%-го параформальдегида. Фиксированные клетки пермеабилizировали абсолютным спиртом, блокировали 5%-й сывороткой козы (Sigma) и инкубировали с первичными антителами в течение ночи при +4 °С. Затем клетки промывали и культивировали с вторичными антителами 40 мин. В качестве первичных антител были использованы β -Tubulin III (mouse, Sigma), GFAP (mouse, Abcam, Великобритания), Nestin (mouse, Abcam), Vimentin (rabbit, Abcam). Вторичными антителами служили IgG, конъюгированный с FITC (Sigma, США), Chromeo 546 (Abcam) и Chromeo 488 (Abcam). Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342 (Sigma).

Микрофотосъемку культур клеток производили на микроскопе Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты обрабатывали статистически по методу Стьюдента с использованием программы MS Excel.

Эксперименты были проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III конгрессом по биоэтике (Киев, 20.09.07) и согласованными с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985).

Результаты и обсуждение

Жизнеспособность свежесекретированных клеток мозга новорожденных крыс, определенная по окрашиванию витальным красителем трипановым синим, составляла в среднем 20–70%.

Полученные клетки были округлой формы с четко очерченной мембраной. Размер их колебался от 6 до 16 мкм (рис. 1, А).

Свежесекретированные НК высевали в концентрации 1, 2, 4, 6 и 8 млн/мл в 24-луночные планшеты и культивировали в среде DMEM/F12 в присутствии и при отсутствии 10%-й сыворотки крови крыс. В присутствии сыворотки уже в первые часы культивирования наблюдалось формирование плавающих многоклеточных агрегатов (рис. 1, Б), количество, структура и размеры которых зависели от концентрации и жизнеспособности высеванных клеток. В случае культивирования НК в концентрации 1 млн/мл формировалось небольшое количество мелких агрегатов. Культивирование клеток в концентрациях 6 и 8 млн/мл сопровождалось образованием агрегатов большого размера, которые активно сливались друг с другом. При этом плотность суспензии агрегатов была очень высокой, что затрудняло наблюдение за ними. Происходило также быстрое закисление среды культивирования. При культивировании НК в концентрации 2 и 4 млн/мл наблюдалось образование агрегатов, размер которых составлял в среднем 100 мкм (рис. 1, Б). Как правило, сформированные агрегаты имели неправильную форму и рыхлую структуру — клетки в них были упакованы неплотно (рис. 1, Б). При культивировании плавающих агрегатов, образованных клетками с жизнеспособностью выше 20% на протяжении 1–2 сут, упаковка клеток в них становилась более плотной, и они превращались в сфероиды (рис. 1, В). Количество образовавшихся сфероидов зависело прямо

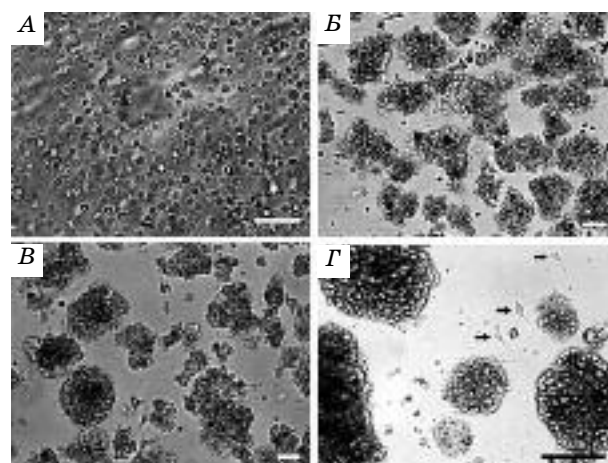


Рис. 1. Фазово-контрастная микроскопия культуры свежесекретированных НК, высеянных в концентрации 2 млн/мл:

А — НК через 10 мин после посева; Б — формирование плавающих многоклеточных агрегатов; В — образование сфероидов; Г — единичные распластаные клетки с морфологией фибробластов (стрелки). Масштаб 50 мкм

пропорціонально від вихідної життєспроможності висейнаних кліток. Якщо життєспроможність НК була нижче 10%, формувалося небагато кількості малих, рихлих агрегатів, які в процесі дальшого культивування не формували сфероїдів і не прикріплялися до підложки. При цьому єдиничні плаваючі клітки, не об'єднувавшись в агрегати, також не прикріплялися до підложки і при дальшому культивуванні погибали.

В процесі культивування НК в присутності сыворотки спостерігалося велике кількість єдиничних кліток, які не формували агрегатів. Деякі з цих кліток прикріплялися до підложки і розпластувалися (рис. 1, Г). Морфологічно вони були схожі на астроцити.

При відсутності в середі культивування сыворотки крові НК, як правило, не формували агрегатів, не прикріплялися до підложки і, в кінцевому підсумку, погибали.

Для вивчення впливу формуваних агрегатів на життєспроможність НК і їх поведінку в культурі використовували клітки з вихідною життєспроможністю $56,2 \pm 4,2\%$ ($n = 5$), які висівали в концентрації 4 млн/мл. В процесі культивування близько 80% висейнаних кліток формували агрегати. Через сутки культивування життєспроможність кліток в складі агрегатів збільшувалася в 1,5 рази і становила $87 \pm 5,4\%$ ($n = 5$). Частина агрегатів НК вже в перші сутки культивування прикріплялася до підложки. При цьому прикріплення агрегатів значно активізувалося в разі заміни 2/3 частини середі або після їх пересіву. Схожо на прикріплення клітки агрегатів формували велику кількість довгих β -tubulin III-позитивних відростків (рис. 2, А). Цими відростками агрегати з'єднувалися між собою і по ним мігрували недиференційовані клітки (рис. 2, В).

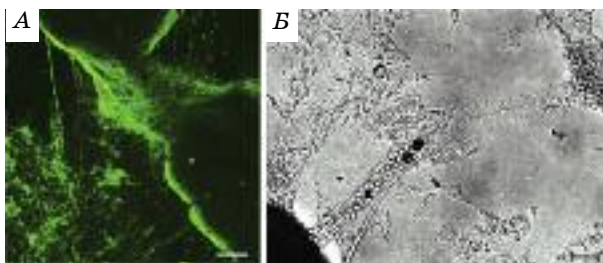


Рис. 2. Імуноцитохімічне фарбування антитілами на β -тубулін III кліток прикріпленого агрегата (А), по відросткам яких мігрують недиференційовані клітки (В): масштаб: А — 100 мкм, В — 50 мкм

Мігруючі від агрегатів клітки розпластувалися і утворювали ділянки моношару. На 4–6-й дні культивування на поверхні лунки формувалися великі ділянки моношару кліток (рис. 3, А), на яких спостерігалося велике кількість β -тубулін III-позитивних кліток з морфологією нейронів (рис. 3, Б). Як правило, β -тубулін III-позитивні клітки локалізувалися в місцях прикріплення агрегатів до поверхні лунки (рис. 3, Б).

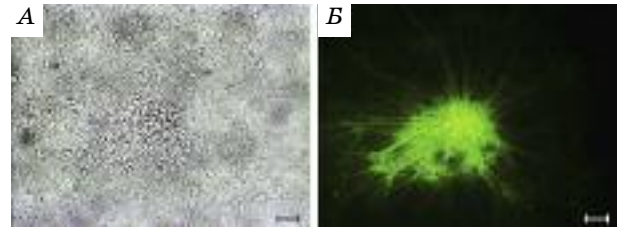


Рис. 3. Формування клітками прикріплених агрегатів моношару (А) і β -тубулін III-позитивних кліток з морфологією нейронів (Б): масштаб 50 мкм

В процесі культивування кількість кліток з морфологією нейронів зменшувалося, з гліальною морфологією — збільшувалося. На 7–9-й дні культивування β -тубулін III-позитивні клітки з морфологією нейронів практично зникли, але в той же час на поверхні GFAP-позитивного гліального моношару (рис. 4) з'являлися β -тубулін III-позитивні клітки, морфологічно схожі на нейробласти (рис. 5).

Кількість нейробластоподібних кліток в процесі дальшого культивування збільшувалося. На 15-й дні культивування на моношарі кліток глії з'являлися колонії недиференційованих β -тубулін III-позитивних кліток (рис. 5), більшість з яких були нестин- і виментин-позитивними (рис. 6).

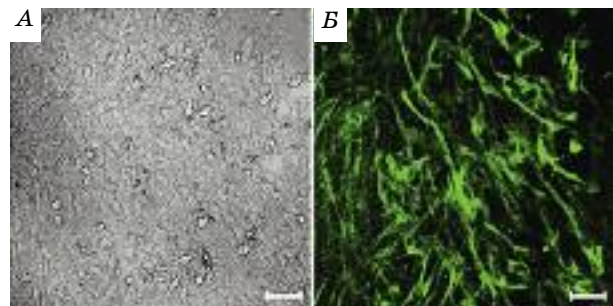


Рис. 4. Імуноцитохімічне фарбування кліток моношару (А), сформованого НК прикріплених агрегатів, на маркер астроцитів GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Б): масштаб 50 мкм

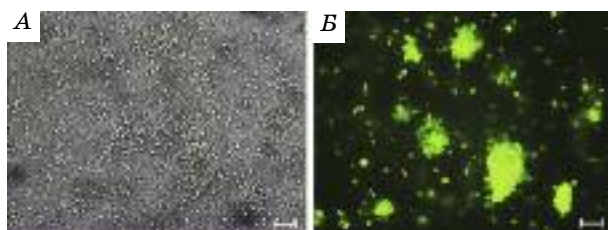


Рис. 5. Образование на монослое глии колоний и единичных нейробластоподобных β -тубулин III-положительных клеток:

A — фазовый контраст; *B* — флуоресценция β -тубулин III. Масштаб 100 мкм

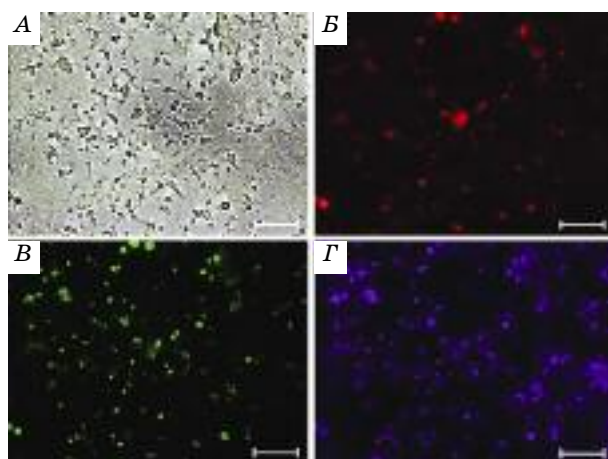


Рис. 6. Иммуноцитохимическое окрашивание культуры свежевыделенных НК новорожденных крыс после 15 сут культивирования (*A*) на маркер нервных стволовых клеток нестин (*B*) и прогениторных — виментин (*B*):

ядра клеток окрашены красителем Hoechst (*Г*). Масштаб 100 мкм

Нейробластоподобные клетки были способны формировать отростки, которые увеличивались в размерах и формировали клеточную сеть (рис. 7, *A*). Как следует из рис. 7, *A*, особенно активно процесс образования отростков нейробластоподобными клетками происходил на «голом» пластике. Колонии в процессе культивирования увеличивались в размерах и также формировали между собой контакты с помощью длинных отростков (рис. 7, *B*).

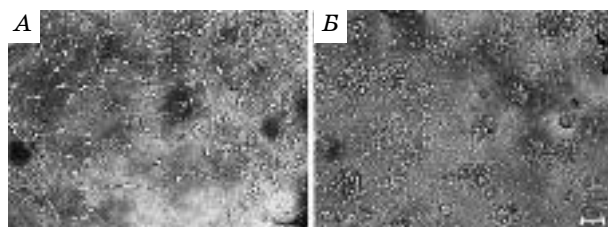


Рис. 7. Формирование нейробластоподобными клетками сети (*A*) и образование контактов между растущими колониями нервных стволовых/прогениторных клеток (*B*):

масштаб 50 мкм

Полученные результаты указывают на то, что изолированные из ткани мозга новорожденных крыс клетки представляют собой гетерогенную суспензию, состоящую из нейрональных и глиальных предшественников, а также окончательно дифференцированных и стволовых/прогениторных нервных клеток.

Проведенные исследования показали, что важным свойством свежееизолированных НК новорожденных крыс является формирование ими в процессе культивирования в присутствии сыворотки крови многоклеточных агрегатов.

Почему образуются агрегаты и какова их роль? В процессе выделения у клеток, с одной стороны, могут возникать микроповреждения, а с другой — может происходить потеря молекул адгезии (интегринов и е-кадгерина), что не позволяет клеткам эффективно прикрепляться к подложке при культивировании. Оставшихся молекул адгезии, вероятно, достаточно для образования межклеточных связей, и клетки, стремясь воссоздать утерянное при их выделении клеточное микроокружение, формируют агрегаты. При культивировании в агрегатах может формироваться внеклеточный матрикс, который необходим для обеспечения сигналов выживания изолированных клеток и предотвращает их апоптоз [3–6]. Наряду с этим в процессе культивирования агрегатов, с одной стороны, происходит репарация микроповреждений клеток, на что указывает увеличение их жизнеспособности, а с другой — в НК подобно гепатосферам [7] может происходить накопление е-кадгерина, что является главной причиной морфологического перехода от рыхлого клеточного агрегата к компактному сфероиду.

Таким образом, в процессе культивирования агрегатов происходит репарация микроповреждений клеток и, возможно, восстанавливаются утерянные молекулы адгезии, что позволяет агрегатам прикрепляться к подложке, а их составляющим клеткам мигрировать и расплываться.

Очевидно, в агрегатах создаются условия для поддержания жизнеспособности нейронов, клеток глии, а также стволовых/прогениторных клеток, что требует присутствия различных известных или неизвестных, растворимых либо мембранно-связанных факторов роста [8]. На это указывают результаты краткосрочного культивирования агрегатов, в процессе которого вначале наблюдается образование нейронов и клеток астроглии, а затем на монослое, сформированном астроцитами, появляются нейробла-

сты и стволовые/прогениторные клетки. При этом нейробласты и колонии стоволовых/прогениторных клеток, как правило, образуются на подложке, сформированной клетками астроглии. Это свидетельствует о том, что клетки глии играют роль фидерного слоя для нервных стоволовых/прогениторных клеток, обеспечивая их интактным и функциональным внеклеточным матриксом и связанными с матриксом факторами, а также секретируют регуляторные протеиновые факторы, необходимые для выживания и экспансии. В связи с этим можно предположить, что в данной ситуации клетки глии выполняют функцию ниши для нервных стоволовых/прогениторных клеток. Это предположение подтверждается тем, что клетки нейросфер или индуцированных в нейрональном направлении эмбрионидных тел [9, 10] после прикрепления также вначале формируют подложку из нейромезенхимальных клеток, на которых позднее появляются нейробласты и нейроны.

Следует также отметить схожесть поведения клеток агрегатов и нейросфер. Как и нейросферы [11], большинство клеток поверхностного слоя агрегатов являются β -тубулин III-положительными. При этом после прикрепления агрегатов миграция этих клеток предшествует миграции глиальных клеток, что отдаленно напоминает ситуацию в эмбриональном мозге, где нейрогенез предшествует глиогенезу [12]. По отросткам, которые образуют β -тубулин III-положительные клетки, подобно отросткам клеток радиальной глии, происходит активная миграция недифференцированных клеток. Все это свидетельствует о существовании подобных механизмов функционирования гетерогенных нервных клеток, объединенных в агрегаты с нейросферами, образованными стволовыми клетками.

Проведенные исследования показали, что в процессе культивирования β -тубулин III-положительные клетки с морфологией нейронов, которые мигрировали от прикрепленных агрегатов сразу после их прикрепления к подложке, исчезали. Возмож-

но, из-за отсутствия соответствующего микроокружения в процессе первых суток культивирования они погибали.

Из представленных данных также следует, что не во всех случаях НК способны восстанавливать свои повреждения. Суспензии НК с низкой жизнеспособностью, очевидно, помимо значительных повреждений плазматической мембраны характеризуются низким количеством молекул адгезии. Поэтому эти клетки формируют агрегаты небольшого размера с очень рыхлой структурой упаковки. К подложке такие агрегаты не прикрепляются и в процессе дальнейшего культивирования деградируют.

Таким образом, НК, изолированные из ткани головного мозга новорожденных крыс представляют собой гетерогенную суспензию, в состав которой входят окончательно дифференцированные и стволовые/прогениторные клетки, способные пролиферировать и дифференцироваться в нейроны и клетки глии в условиях культивирования *in vitro*.

В процессе культивирования в присутствии сыворотки крови НК новорожденных крыс формируют агрегаты, структура которых зависит от жизнеспособности, а размер — от жизнеспособности и концентрации посеянных клеток.

Агрегаты выполняют роль микротканей, в которых происходит восстановление повреждений нервных клеток, а также создаются условия для их выживания и функционирования.

Агрегаты НК новорожденных крыс можно использовать в качестве 3-мерной модели постнатальной нервной ткани для исследования влияния клеточного окружения и сигналов микроокружения на процессы развития и восстановления дифференцированных нервных клеток, а также на пролиферацию и дифференциацию нервных стоволовых/прогениторных клеток.

Авторы выражают благодарность к. б. н. Коваленко И. Ф. и к. б. н. Холодному И. С. за помощь в проведении микрофотосъемки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Petrenko A. Yu., Sukach A. N. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Anal. Biochem.* — 1991. — V. 194, N 2. — P. 326–329.
2. Seglen P. O. Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell Biol.* — 1976. V. 13. — P. 29–83.
3. Frisch S. M., Ruoslahti E. Integrins and anoikis // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 1997. — V. 9, N 5. — P. 701–706.
4. Frisch S. M., Screaton R. A. Anoikis mechanisms // *Ibid.* — 2001. — V. 13, N 5. — P. 555–562.
5. Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer // *Cell.* — 2000. — V. 100, N 2. — P. 57–70.

6. Grossmann J. Molecular mechanisms of «detachment-induced apoptosis-anoikis» // Apoptosis. — 2002. — V. 7, N 3. — P. 247–260.
7. Lin R. Z., Chou L. F., Chien C. C., Chang H. Y. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β 1-integrin // Cell Tissue Res. — 2006. — V. 324, N 3. — P. 411–422.
8. Zaheer A., Zhong W., Ue E. Y. et al. Expression of mRNAs of multiple growth factors and receptors by astrocytes and glioma cells: detection with reverse transcription-polymerase chain reaction // Cell. Mol. Neurobiol. — 1995. — V. 15, N 2. — P. 221–237.
9. Caldwell M. A., He X., Wilkie N. et al. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres // Nat. Biotechnol. — 2001. — V. 19, N 5. — P. 475–480.
10. Bain G., Kitchens D., Yao M. et al. ECS express neuronal properties *in vitro* // Dev. Biol. — 1995. — V. 168, N 2. — P. 342–357.
11. Suslov O. N., Kukekov V. G., Ignatova T. N., Steindler D. A. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — V. 99, N 22. — P. 14506–14511.
12. Qian X., Shen Q., Goderie S. K. et al. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells // Neuron. — 2000. — V. 28, N 1. — P. 69–80.

ВЛАСТИВОСТІ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ НОВОНАРОДЖЕНИХ ЩУРІВ У КУЛЬТУРИ

О. М. Сукач^{1,2}
Т. Д. Ляшенко²
М. В. Шевченко²

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Харків

²Харківський національний педагогічний
університет ім. Г. С. Сковороди, Україна

E-mail: an_sukach@yahoo.co.uk

Показано, що ізольовані клітини мозку новонароджених щурів є гетерогенною суспензією, до складу якої крім остаточно диференційованих входять стовбурові та прогеніторні клітини, здатні проліферувати та диференціюватися в умовах культивування *in vitro*. У процесі культивування в присутності сироватки крові нервові клітини новонароджених щурів формують агрегати, в яких відтворюється втрачене в процесі їх виділення клітинне мікрооточення і відбувається відновлення клітин. Після прикріплення до підкладки клітини агрегатів мігрують і розпластуються, формуючи моношар астроглії, на якому утворюються нейробласти та колонії стовбурових/прогеніторних клітин. Одержані дані вказують на те, що культуру нервових клітин новонароджених щурів можна використовувати як модель постнатальної нервової тканини для дослідження впливу клітинного оточення на процеси розвитку й відновлення диференційованих нервових клітин, а також на проліферацію і диференціацію стовбурових/прогеніторних клітин.

Ключові слова: диференційовані нервові клітини, нервові стовбурові/прогеніторні клітини, новонароджені щури, життєздатність, виживання, культивування, багатоклітинні агрегати.

PROPERTIES OF ISOLATED NEURAL CELLS FROM NEWBORN RAT IN TISSUE *in vitro*

A. N. Sukach^{1,2}
T. D. Liashenko²
M. V. Shevchenko²

¹Institute for Problems of Cryobiology and
Cryomedicine of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kharkiv

²Skovoroda National Pedagogical University,
Kharkiv, Ukraine

E-mail: an_sukach@yahoo.co.uk

It is shown that isolated brain cells of newborn rats are heterogeneous suspension consisted of differentiated cells, stem and progenitor cells, which can proliferate and differentiate in conditions of *in vitro* cultivation. During cultivation in presence of serum the neural cells of the newborn rats form aggregates, where reconstitution of cellular microenvironment lost in isolation takes place followed by cell reparation. After attachment to a substrate the aggregate cells migrate and spread, form a monolayer of astroglia, which the neuroblasts and colonies of stem/progenitor cells are formed on. The findings show feasible application of newborn rat neural cells as model of postnatal neural tissue for studying the influence of cellular environment on process of development and recovery of differentiated neural cells, as well as proliferation and differentiation of stem/progenitor cells.

Key words: differentiated nervous cells, nervous stem/progenitor cells, new-born rats, viability, survival, cultivation, multicellular aggregates.