

Оригінальні статті

УДК 611-013.7/.8-018.82:591.8.085.25

Длительное культивирование *in vitro* криоконсервированных и нативных нейроцитов эмбрионов человека

Зозуля Ю.А., Лисяний Н.И., Любич Л.Д., Грищенко В.И.,
Петренко А.Ю., Бабийчук Г.А.Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г.Киев
Институт криобиологии и криомедицины АН Украины, г.Харьков

При длительном культивировании *in vitro* нейроцитов-предшественников в бессывороточную среду ДМЕМ происходит сокращение их количества в 3–4 раза до 9-х суток культивирования, после чего содержание клеток стабилизируется, что свидетельствует о наличии в культуре популяции самоподдерживающихся стволовых клеток. Добавление в среду дополнительных факторов (ретинола ацетата) способствует пролиферации нейроцитов-предшественников. Разработанная методика длительного культивирования нейроцитов человека позволяет получить обогащенную популяцию нейроцитов-предшественников, способных к пролиферации *in vitro*.

Ключевые слова: *нервные стволовые клетки, предшественники нейроцитов, суспензионные культуры, ретинола ацетат.*

Введение. Нервные стволовые клетки (НСК) рассматриваются как многообещающие источники для клеточной и генной терапии заболеваний нервной системы, благодаря своей способности дифференцироваться во все клеточные типы структур нервной системы. В настоящее время внимание исследователей сосредоточено на проблемах идентификации, выделения, размножения и сохранения НСК и изучения их дифференцировки в культуре и при трансплантации в мозг.

На долю стволовых клеток приходится не более 0,1–0,01% клеток всей клеточной массы органа (в головном мозге и печени насчитывается примерно по 10 млрд. клеток, в иммунной системе — 300 млрд.) [4]. В отличие от мозга взрослых особей мозг эмбрионов человека I триместра беременности на 90% состоит из эмбриональных стволовых и прогениторных клеток [6]. Даже в постнатальном мозге человека и млекопитающих присутствуют два пула прогениторных нейроцитов, способных повторно интегрироваться в нейронные сети эмбриона после экспериментальной трансплантации. Стволовые и мультипотентные клетки присутствуют в герминативных областях (паравентрикулярной и субэпендимарной зонах) мозга не только в эмбриональном и раннем постнатальном периоде онтогенеза, но и в течение всей жизни млекопитающих и человека.

Разработаны несколько способов получения региональных стволовых клеток нервной ткани в культуре клеток [8, 9, 10]. Общий принцип заключается в том, что при добавлении ростовых факторов в специально подобранную культуру происходит деление стволовых клеток, тогда как убирая ростовые факторы, длительно культивируя и добавляя индукторы клеточной дифференцировки, можно получить обогащенную культуру нейроцитов. Цитодифференцировка нейроцитов сопровождается образованием агрегатов клеток с формированием нейритов, аксонов и специфических межклеточных контактов [1, 2, 7]. Значительная часть стволовых прогениторных клеток в условиях такого культивирования погибает, остальные приспособляются к условиям среды и длительно время переживают в культуре клеток.

Целью данного исследования явилось изучение влияния условий культивирования на динамику переживания нейроцитов-предшественников, полученных из различных источников, при длительном культивировании *in vitro* в бессывороточной среде ДМЕМ.

Материалы и методы. Материалом исследований служили: 1) криоконсервированные нейроциты человека 7, 8, 9, 10, 11–12 нед гестации, полученные из банка клеток Института криобиологии и криомедицины АН Укра-

ины (г.Харьков); 2) нейроклетки человека из нативного абортивного материала (табл.1).

Получение суспензионных культур клеток предшественников. Запечатанные контейнеры с криоконсервированными клетками извлекали из жидкого азота, помещали в водяную баню

Таблица 1. Серии экспериментальных наблюдений

Материал	Серия	Продолжительность культивирования, сут
Криоконсервированные нейроклетки человека (7–12 нед гестации), n=14	1	21–48
Нейроклетки человека из нативного абортивного материала (8–12 нед гестации), n=4	2	21

для оттаивания при температуре 38–40°C. Затем клетки переносили в стеклянные флаконы со средой ДМЕМ. Каждых 3 дня половина культуральной среды обновлялась.

Нативную эмбриональную мозговую ткань переносили в раствор СМГ или изотонический раствор натрия хлорида, освобождали от оболочек, помещали в среду ДМЕМ и суспендировали с помощью шприца с толстой иглой. Отстаивали 3 мин и надсадок переносили в стеклянные флаконы и чашки Петри. Каждых 3 дня половина культуральной среды обновлялась.

Изучение кинетики популяции клеток проводили путем тщательного суспендирования и отбора образцов клеточной взвеси из культурального объема. Определяли количество и жизнеспособность клеток согласно рекомендациям [5] по исключению трипанового синего.

Изучение влияния состава культуральной среды на переживаемость предшественников нервных клеток осуществляли в бессывороточной среде ДМЕМ и при добавлении в культуральную среду ретинола ацетата (0,2 мг/мл, АО «Киевский витаминный завод»).

Результаты и их обсуждение. Кинетика суспензионных культур предшественников нейроклеток при культивировании в среде ДМЕМ представлена в табл.2 (данные приведены в процентном выражении от первоначального количества клеток, внесенных в питательную среду).

Как видно из табл.2, при культивировании нейроклеток человека 8–12 нед гестации в бессывороточной среде ДМЕМ происходило снижение количества клеток. На 5–7-е сутки культивирования количество клеток снизилось в 1,5–2 раза; на 9-е сутки — в 3–4 раза, в дальнейшем в культуре сохранялась тенденция к снижению количества клеток.

Кинетика суспензионных культур криоконсервированных нейроклеток человека 8–12 нед гестации представлена на рис.1 и в табл.3, из которых видно, что количество клеток, помещенных в среду ДМЕМ, на 9-е сутки культивирования снижалось в 5 раз по сравнению с первоначальным их количеством и продолжало снижаться до конца наблюдения (19-е сутки). При культивировании клеток в среде ДМЕМ+ретинола ацетат, который вводили в питательную среду на 5-е сутки, значительного снижения количества клеток в культуре не происходило, их количество начинало возрастать с 7-х суток культивирования и увеличивалось на 9–12-е сутки культивирования в 2 раза и больше, достигая исходного количества клеток. По мере увеличения срока культивирования количество жизнеспособных клеток возрастало. При этом количество клеток, культивируемых в среде ДМЕМ+ретинола ацетат, превышало содержание клеток, помещенных в среду ДМЕМ, в 3–4 раза на 5–7-е сутки (от начала добавления ретинола ацетата) и в 9 раз — на 14-е сутки. Таким образом, добавление в культуральную среду ретинола ацетата значительно увеличивало выживание и размножение нейрогенных клеток.

Кинетика суспензионных культур нативных нейроклеток человека 8–12 нед гестации (абортивный материал) представлена на рис.2 и в табл.4, из которых видно, что количество клеток, помещенных в среду ДМЕМ, снижалось в 3 раза на 9-е сутки культивирования по сравнению с первоначальным количеством, а на 19-е сутки — в 5 раз. При добавлении в среду ДМЕМ ретинола ацетата исходное содержание клеток сохранялось и несколько возрастало с

Таблица 2. Динамика количества клеток-предшественников в суспензионной культуре в бессывороточной среде ДМЕМ, %

Источник клеток	Продолжительность культивирования, сутки							
	0	1-е	3-и	5-е	7-е	9-е	12-е	19-е
Криоконсервированные нейроклетки человека, n=14	100,00±0,00	89,23±6,11	80,53±13,93	63,76±10,86*	50,20±12,40*	24,07±8,44*	35,29±7,34*	11,50±6,40*
Нативные нейроклетки человека, n=4	100,00±0,00	—	—	58,10±14,83*	—	30,94±11,76*	43,98±19,37*	22,43±10,19*

Примечание. * — различия достоверны по сравнению с показателем 0 сут культивирования (P<0,05).

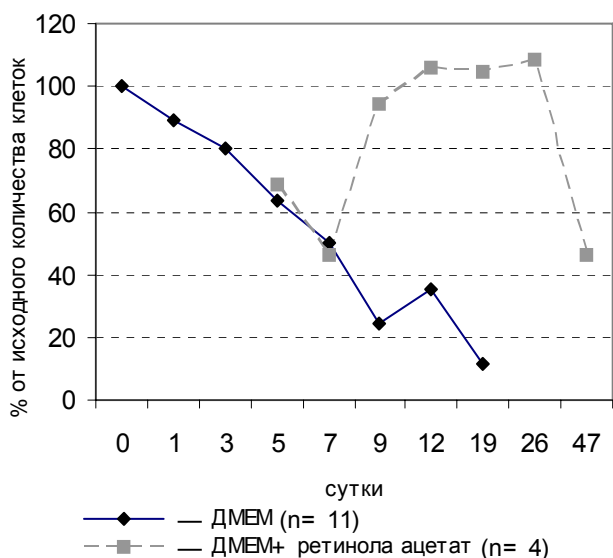


Рис.1. Динамика суспензионной культуры криоконсервированных нейроцитов человека 8–12 нед гестации в бессывороточной среде ДМЕМ и при влиянии ретинола ацетата

12-х по 21-е сутки культивирования. При этом количество клеток в культурах, помещенных в среду ДМЕМ+ретинола ацетат, превышало количество клеток в культурах, помещенных в среду ДМЕМ, в 1,7–1,8 раза на 3-и–7-е сутки (от начала добавления ретинола ацетата). Однако к 21-м суткам содержание нейроцитов уменьшалось.

Таким образом, суммируя результаты длительного культивирования *in vitro* нейроцитов-предшественников, полученных из различ-

ных источников, можно заключить, что к 9-м суткам в бессывороточной среде ДМЕМ происходит снижение их количества в 3–4 раза. Мы считаем, что к этому сроку все дифференцированные клетки погибают, а остаются преимущественно только жизнеспособные переживающие малодифференцированные или недифференцированные клетки, предположительно, НСК.

При добавлении в культуральную среду дополнительных факторов (ретинола ацетата), очевидно, происходит стимуляция пролиферации клеток-предшественников или дифференцировка стволовых клеток и увеличение их количества в 2–5 раз, причем прирост количества клеток был выше в культурах криоконсервированных нейроцитов по сравнению с таковым с культурами нативных нейроцитов эмбриона человека. Такое стимулирующее пролиферацию клеток-предшественников действие ретинола ацетата объясняется, по-видимому, известными биологическими свойствами препаратов витамина А, включающих ретинол, ретинол пальмитат. Известно, что ретинол необходим для роста, дифференцировки и сохранения функций эпителиальных и костных тканей, а также для их размножения, тогда как ретиноевая кислота — для клеточной дифференцировки и она в 10 раз активнее ретинола, но менее активна в процессах размножения.

Полученные результаты согласуются с известными данными коллектива авторов [3] о том, что при культивировании клеток мозга, полученных от 8–12-недельных плодов человека, в

Таблица 3. Динамика количества и жизнеспособности криоконсервированных нейроцитов человека в суспензионной культуре в бессывороточной среде ДМЕМ и при добавлении ретинола ацетата, %

Состав среды	Показатели	Продолжительность культивирования, сут						
		1-е (+ретинола ацетат)	3-и	5-е	7-е	14-е	21-е	42-е
ДМЕМ+ ретинола ацетат, n=14	Количество	68,71±10,66	46,40±14,42	94,61±18,44#	106,19±9,94#	104,73±30,36#	108,48±29,56	46,15±11,47
	Жизнеспособность	19,83±6,68	16,69±7,29	27,00±10,06	36,31±11,88	89,65±0,85	92,40±0,57	96,75±3,25
ДМЕМ, n=14	Количество	63,76±10,86	50,20±12,40	24,07±8,44*#	35,29±7,34#	11,50±6,40*#	—	—
	Жизнеспособность	19,08±7,58	20,95±0,05	16,88±4,54	22,68±9,87	50,00±50,00	—	—

Примечание:* — различия достоверны по сравнению с показателями 1-х суток культивирования (P<0,05).

— различия достоверны по отношению к соответствующей группе сравнения (P<0,05).

Таблица 4. Динамика количества нативных нейроцитов человека в суспензионной культуре в бессывороточной среде ДМЕМ при добавлении ретинола ацетата, %

Состав среды	Продолжительность культивирования, сут			
	1-е (+ ретинола ацетат)	3-и	7-е	21-е
ДМЕМ + ретинола ацетат, n=4	35,95±13,55	40,08±14,93	46,95±20,85	20,55±5,14
ДМЕМ, n=4	43,98±19,37	22,43±10,19	27,60±9,05	44,78±31,34

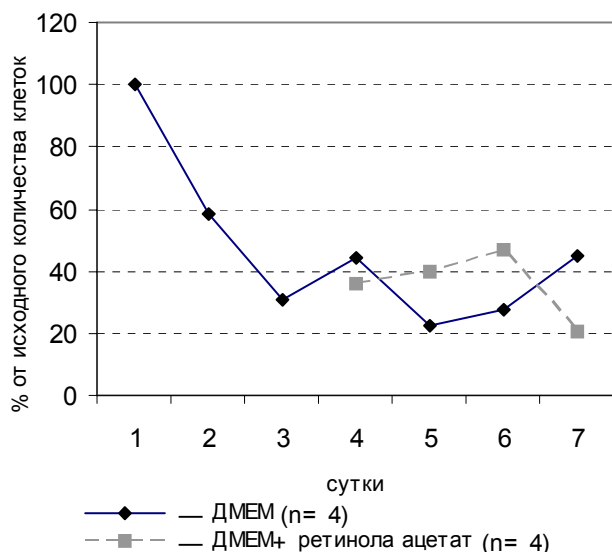


Рис.2. Динамика суспензионной культуры нативных нейроклеток человека 8–12 нед гестации в бессывороточной среде ДМЕМ и при влиянии ретинола ацетата

селективной бессывороточной среде количество клеток уменьшается в течение 1-й недели культивирования, а после добавления стандартного парепарата ростовых факторов (включающего hFGF, hEGF, NSF-1) восстанавливается до исходного уровня, сохраняя жизнеспособность и способность дифференцироваться в нейральные клетки.

Выводы. 1. При длительном культивировании *in vitro* нейроклеток-предшественников в обедненной бессывороточной среде ДМЕМ происходит резкое (в 3–4 раза) снижение их количества к 9-м суткам культивирования, после чего отмечается стабилизация содержания клеток в течение 10–12 сут, что свидетельствует о наличии в культуре длительноживущей популяции стволовых клеток.

2. Добавление в среду дополнительных факторов (ретинола ацетата) способствует пролиферации клеток-предшественников: в течение 7 сут содержание клеток увеличивается в 1,3–1,5 раза, причем количество клеток в культурах, помещенных в среду ДМЕМ+ретинола ацетат, превышало количество клеток в культурах, помещенных в среду ДМЕМ, в 3–4 раза на 5–7-е сутки (от начала добавления ретинола ацетата) в культурах криоконсервированных нейроклеток и в 1,7–1,8 раза в культурах нативных нейроклеток эмбриона человека.

Разработанная методика длительного культивирования нейроклеток человека позволяет получать обогащенную популяцию нейроклеток-предшественников, способных к пролиферации *in vitro*.

Список литературы

1. Анализ развития стволовых нейральных клеток человека *in vitro* / Полтавцева Р.А., Марей М.В., Дубровина И.В. и др. // Цитология. — 2001. — Т.43, №9. — С.884–885.
2. Морфологические аспекты дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в культуре / Гордеева О.Ф., Мануилова Е.С., Гуляева Д.В. и др. // Цитология. — 2001. — Т.43, №9. — С.851.
3. Развитие и дифференцировка мультипотентных нейральных клеток человека *in vitro* / Полтавцева Р.А., Марей М.В., Дубровина И.В. и др. // Докл. РАН. — 2001. — Т.379, №6. — С.845–849.
4. Ретин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология. — М.: БЭБиМ, 1998. — 199 с.
5. Руководство по культивированию нервной ткани: Методы. Техника. Проблемы // В.П. Божкова, Л.А. Брежетовский, В.М. Буравлев и др. — М.: Наука, 1988. — 318 с.
6. Сухих Г.Т. Трансплантация фетальных клеток в медицине: настоящее и будущее // Бюл. эксперим. биол. — 1998. — Т.126. Прил.1. — С.3–13.
7. Эмбриональные стволовые клетки: плюрипотентность, коммитирование, регуляция дифференцировки / Мануилова Е.С., Гордеева О.Ф., Зиновьева Р.Д. и др. // Цитология. — 2001. — Т.43, №9. — С.876.
8. Barami K., Zhao J., Kiaz F.G., Lyman W.K. Comparison of neural precursor cell fate in second trimester human brain and spinal cord // *Neurol. Res.* — 2000. — 23(2–3). — P.260–266.
9. Caldwell M.A., He X., Wilkie N. et al. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres // *Nat. Biotech.* — 2001. — 19(5). — P.475–479.
10. Ciccolini F. Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development // *Mol. Cell Neurosci.* — 2001. — 17(5). — P.895–907.

Тривале культивування *in vitro* криоконсервованих і нативних нейроклітин ембріонів людини

Зозуля Ю.П., Лисяний М.І., Любич Л.Д., Грищенко В.І., Петренко А.Ю., Бабийчук Г.А.

При тривалому культивуванні *in vitro* нейроклітин-попередників у збідненому безсироватковому середовищі ДМЕМ зменшується їх кількість у 3–4 рази до 9-ї доби культивування, після чого зміст клітин стабілізується, що свідчить про наявність у культурі популяції стовбурових клітин, які самопідтримуються. Додавання до середовища ретинола ацетату сприяє проліферації нейроклітин-попередників. Розроблена методика тривалого культивування нейроклітин людини дозволяє отримати збагачену популяцію нейроклітин-попередників, здатних до проліферації *in vitro*.

The long-term cultivation *in vitro* of the cryopreserved and native nerve cells of human embryo

Zozulya Yu.P., Lisyany N.I., Lyubych L.K., Grischenko V.I., Petrenko A.Yu., Babiychuk G.A.

The long-term cultivation *in vitro* of neuroprecursors in KMEM without serum lead to the 3–4-fold decrease of the number of cells on the 9-th day of cultivation. Then the number of cells become consistent evidencing about the presence in culture of self-renewing population of stem cells. Retinolacetate stimulate the proliferation of precursors. The method of long-term cultivation of human nerve cells allow to get the enriched population of neuroprecursors with capacity to proliferation *in vitro*.