

УДК 611-013.7/8-018.8:615.012.6

Порівняльна цитоструктурна оцінка росту ембріональної нервової тканини людини в умовах культивування за різних способів її зберігання

Семенова В.М., Цимбалюк В.І., Пічжур Л.Д., Стайно Л.П.

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова АМН України, м. Київ

Проведене порівняльне дослідження особливостей росту культур ембріональної нервової тканини (ЕНТ), отриманої від ембріонів людини 7 та 9 тиж гестації за різних умов її зберігання. При порівняльному аналізі життєздатності культур нативної ЕНТ, отриманої через 1 год після її відбору, і культур ЕНТ після 24 год її зберігання в синтетичному поживному середовищі виявлений більш високий потенціал росту нейроклітин ЕНТ від ембріонів 9 тиж гестації у порівнянні з культурами від ембріонів 7 тиж гестації в аналогічних умовах експерименту. Активність росту культур нейроклітин попередньо криоконсервованої ЕНТ низька, виявляють їх ранню загибель з подальшою десквамацією.

Ключові слова: ембріональна нервова клітина, культура клітин.

Клінічне застосування методу трансплантації ЕНТ є фундаментальним напрямком сучасної реконструктивної нейрохірургії і альтернативним методом комплексного лікування різних нейродегенеративних захворювань ЦНС. Як різновид клітинної терапії нейротрансплантація може забезпечити замісний та протекторний ефект за органічного ураження головного мозку різної етіології. Це зумовлене наявністю в ЕНТ факторів росту нервів, трофічних чинників, нейромедіаторів, цитокінів, гормонів, ферментів та інших речовин, які забезпечують високу біологічну активність трансплантованої ЕНТ та клінічну ефективність її застосування при різних захворюваннях головного мозку [4, 5, 10–12].

У зв'язку з широким застосуванням трансплантації ЕНТ при різних захворюваннях нервової системи актуальним є вдосконалення методів підготовки ембріонального матеріалу, вибору оптимальних строків гестації та раціональних режимів зберігання ЕНТ від моменту її відбору до використання, що забезпечує досягнення позитивного клінічного ефекту.

З цією метою проведено порівняльне дослідження впливу різних умов зберігання ЕНТ, отриманої від ембріонів людини 7 і 9 тиж гестації, на особливості росту експлантатів ЕНТ в умовах культивування. Вибір такого методичного підходу обґрунтований тим, що фрагменти ізольованої ЕНТ добре адаптуються до умов культивування, продовжують функціонувати та диференціюватися в тому самому напрямку, що і в мозку *in vivo*. В культурах ЕНТ реалізуються запрограмовані в онтогенезі морфофункціональні властивості її клітин: регенерація аксонів, процеси синаптогенезу, формування мієлінових оболонок, секреція медіаторів, а також фенотипові ознаки нейронів та гліоцитів відповідно до мікрооточення *in vivo* з збереженням регіонарної біохімічної гетерогенності [1–3, 6, 8, 9, 12, 13]. Агрегати клітин, що утворюються в культурах ЕНТ, досягають високого ступеня морфофункціонального диференціювання з формуванням гістотипових нейрогліальних комплексів, характерних для нервової тканини *in vivo*. В таких агрегатах спостерігають ріст дендритів і аксонів. Поряд з тим, культури ЕНТ є незамінним об'єктом для дослідження морфологічних та метаболічних показників функціонування живих нейроклітин в умовах їх ізоляції від інтегруючого впливу цілісного організму [8]. Модель культивованої

ЕНТ застосовують з метою тестування біологічно активних та фармакологічних речовин, а також для дослідження тератогенезу [7, 14].

Матеріали і методи дослідження. Проведені 3 серії дослідів: в 1-й серії культивували ЕНТ від ембріонів людини 7 та 9 тиж гестації, отриману через 1 год після відбору абортівного матеріалу. У 2-й серії ЕНТ культивували після попереднього зберігання її в інкубаційному поживному середовищі DMEM (виробництва Київського підприємства «Біофарма») протягом 24 год. У 3-й серії культивували ЕНТ, криоконсервовану у стандартному режимі. Для отримання первинних культур ЕНТ промивали в збалансованому сольовому розчині, вільному від іонів кальцію і магнію, інкубували в цьому самому розчині протягом 15–30 хв при температурі 37°C, подрібнювали мікроножицями, дисоціювали шляхом багаторазового піпетування, центрифугували протягом 1 хв при швидкості 3000 об./хв. Отриманий осад ресуспензували в середовищі DMEM з вмістом телячої ембріональної сироватки (40%), глюкози (80 г/л), інсуліну (0,2 ОД/мл) і наносили по 1–2 краплі суспензії з вмістом 2–5×10⁶ клітин в 1 мл на покривні скельця, попередньо вкриті поліетиленімінном, які вміщували в пластикові чашки Петрі. Всі маніпуляції проводили з дотриманням вимог стерильності. Культури зберігали в стандартних умовах при температурі 36,5°C, при постійному газовому складі (5% CO₂) і вологості (95%) у CO₂-інкубаторі УЛІ-20 (виробництва ОКПО НАН України). Для гістологічного дослідження складу клітин, загальної структури росту і проліферативної активності культур частину з них на покривних скельцях фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну і фарбували гематоксиліном Караччі та тіоніном за Нісслем. Ідентифікацію фенотипу культивованих клітин і мікрофотодокументування здійснювали за допомогою цитоаналізатора зображення «IBAS-2000» (Німеччина).

Результати та їх обговорення. У 1-й серії дослідів при культивуванні ЕНТ від ембріонів людини 9 тиж гестації у перші дні спостерігали поступове розрідження мікроексплантатів з утворенням моншарових комплексів з мозаїчним розташуванням нейробластів. Навколо мікроексплантатів з'являлися радіальні пучкові структури, утворені з регенеруючих відростків, які на 4–5-ту добу помітно подов-

жувалися, зона росту розширювалася, набуваючи сіткоподібного вигляду (рис.1).

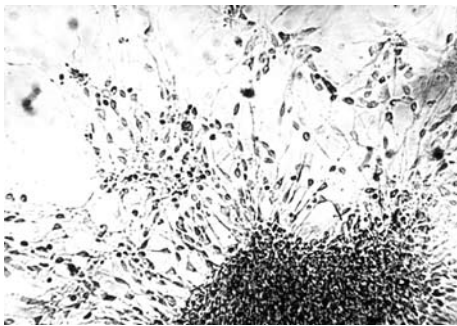


Рис. 1. Мікрофото. Жива культура ЕНТ людини 9 тиж гестації. Загальний вигляд зони росту з формуванням сіткоподібних структур. 5-та доба культивування. Забарвлення гематоксиліном Караччі. 36.×100.

У подальшому серед культивованих клітин зони росту переважали гліоцити, виявляли також нейробласти та нейроноти, які набували трикутної або ромбоподібної форми. Нейроноти відрізнялися від гліоцитів підвищеною рефрактерністю цитоплазми та полярним розподілом відростків (рис. 2).

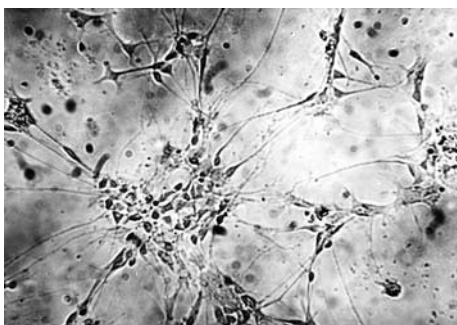


Рис. 2. Мікрофото. Жива культура ЕНТ людини 9 тиж гестації. Розростання гліоцитів з довгими відростками і нейробластів на місці первинного тканинного мікроагрегату. 8-ма доба культивування. Забарвлення гематоксиліном Караччі. 36.×100.

За даними гістологічного дослідження препаратів культур ЕНТ у деяких гліоцитах спостерігали різні стадії мітотичного поділу. В подальшому (9–12-та доба спостереження) розростання гліоцитів поширювалися на значну площу покривного скельця. Серед них визначали протоплазматичні астроцити характерної мультиполярної форми, а також фіброзні біполярні астроцити з більш вузькою цитоплазмою (рис. 3). На відміну від гліоцитів, в нейронах фігури мітозу не

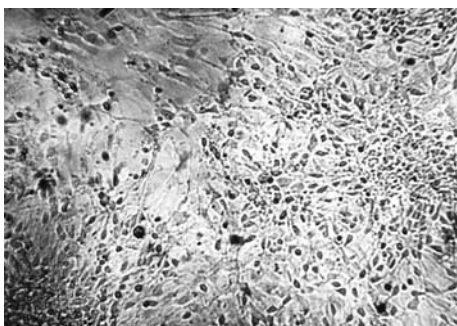


Рис. 3. Мікрофото. Жива культура ЕНТ людини 9 тиж гестації. Розростання клітин ЕНТ на 12-ту добу культивування. Забарвлення гематоксиліном Караччі. 36.×100.

виявляються. Популяція олігодендроцитів в таких культурах представлена невеликою кількістю дрібних клітин з компактними цитоплазматичними тілами павукоподібної форми та короткими відростками.

Таким чином, в дисоційованих культурах ЕНТ 9 тиж гестації протягом 10–12 діб відбувається регенерація відростків нейронотів, відзначають високу міграційну та проліферативну активність гліальних нейроклітин з ознаками їх диференціювання в протоплазматичні та фіброзні форми. При цьому період адаптації до умов культивування ЕНТ досить короткий, оскільки початкові прояви міграції клітин та регенерацію їх відростків виявляють вже у 1-шу добу після експлантації.

Порівняно з ЕНТ 9 тиж гестації більшість експлантатів ЕНТ від ембріонів людини 7 тиж гестації виявляють меншу активність росту, про що свідчить, насамперед, більш тривалий період адаптації експлантатів (3–4 доби) до умов культивування. При цьому численні експлантати ЕНТ залишалися «оголеними», без ознак розпушування та міграції клітин під час прижиттєвого спостереження за культурами тривалістю до 14 діб. Лише у 33% експлантатів ЕНТ цього строку гестації на 4–5-ту добу культивування виявляли початкові ознаки крайового розпластування мікроексплантатів з виселенням окремих нейроклітин з короткими конусоподібними відростками. В подальшому лише навколо окремих культур крайова зона експлантатів мала тенденцію до утворення вузького моношару малодиференційованих клітин (рис. 4). При цьому ознаки регенерації нейритів були мало виражені (рис. 5). Такий стан культур зберігався протягом усього періоду прижиттєвого спостереження.

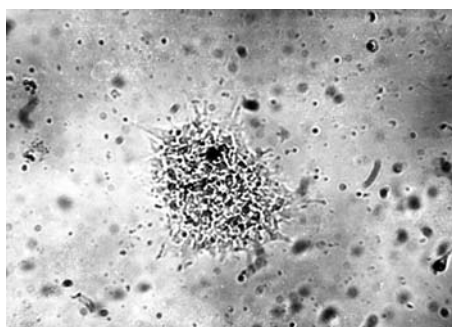


Рис. 4. Мікрофото. Жива культура ЕНТ 7 тиж гестації. Фрагмент ЕНТ з ознаками початкового формування моношару клітин. 5-та доба культивування. Забарвлення гематоксиліном Караччі. 36.×100.



Рис. 5. Мікрофото. Жива культура ЕНТ 7 тиж гестації. Регенерація відростків елементів клітин в окремих експлантатах. 9-та доба культивування. Забарвлення гематоксиліном Караччі. 36.×100.

Лише у 33% спостережень культури ЕНТ від ембріонів 7 тиж гестації виявляли більшу життєздатність: на 3-тю добу після експлантації відзначали розпушення дрібних фрагментів з утворенням острівців радіарного росту, в основному за рахунок малодиференційованих гліоцитів і окремих нейробластів. Такі комплекси клітин були оточені короткими відростками, довжина яких не змінювалася у динаміці спостереження за відсутності помітної активності росту.

Таким чином, за даними порівняльного аналізу життєздатності культивованої ЕНТ від ембріонів людини 7 та 9 тиж гестації без попереднього зберігання тканини в синтетичному поживному середовищі виявлений більш високий потенціал росту ЕНТ від ембріонів 9 тиж гестації.

У 2-й серії досліджень при культивуванні ЕНТ людини 9 тиж гестації після попередньої інкубації в синтетичному поживному середовищі протягом 24 год спостерігали послідовні стадії адаптації мікроексплантатів: їх розпушення, регенерацію відростків з утворенням радіарних структур навколо мікроагрегатів клітин, а також активну міграцію гліоцитів з поступовим поширенням на весь препарат. На 8–9-ту добу спостереження характер росту і склад клітин культур ЕНТ був подібний до такого у 1-й серії досліджень при культивуванні нативної ЕНТ без попереднього зберігання в синтетичному поживному середовищі (рис. 6).

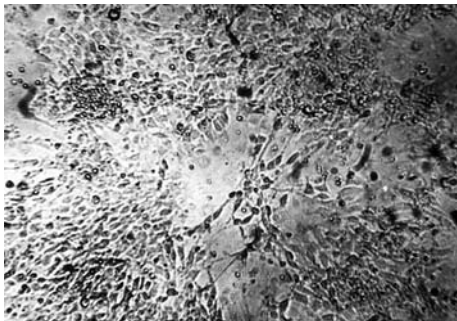


Рис. 6. Мікрофото. Жива культура ЕНТ 9 тиж гестації після попереднього зберігання в поживному середовищі протягом 24 год. Структура зони росту подібна до такої культури ЕНТ без попередньої інкубації. 9-та доба культивування. Забарвлення гематоксиліном Караччі. Зб. $\times 100$.

Таким чином, і в цій серії дослідів культури ЕНТ від ембріонів 9 тиж гестації після попереднього зберігання в живильному середовищі проявили високу життєздатність з утворенням поширеної зони росту. Це свідчить про те, що зберігання ЕНТ протягом 24 год в поживному середовищі при температурі $36,7^{\circ}\text{C}$ не справляє гальмівного впливу на потенціал росту в умовах культивування.

На відміну від цього, в культурах ЕНТ від ембріонів 7 тиж гестації, після їх попереднього зберігання у живильному середовищі протягом 24 год виявляли більш тривалий період адаптації експлантатів з ознаками лише початкової міграції нейроклітин з мікроагрегатів на 2–3-тю добу після експлантації. На 8–9-ту добу спостереження такі експлантати оточені лише вузьким одно-дворядним моношаром нейроклітин з короткими відростками на тлі дрібнопетлистого ретикулу. Під час подальшого культивування (14–15-та доба) ознаки активації і

розширення зони росту клітин з таких експлантатів не спостерігали (рис. 7).

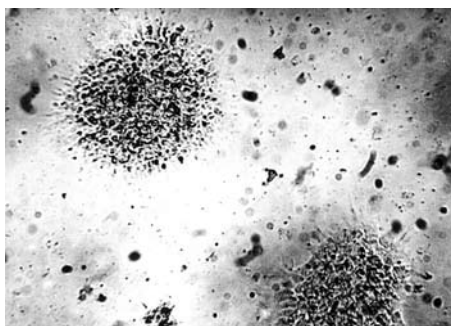


Рис. 7. Мікрофото. Жива культура ЕНТ 7 тиж гестації після попереднього зберігання в поживному середовищі протягом 24 год. Пояснення в тексті. Забарвлення гематоксиліном Караччі. Зб. $\times 100$.

Таким чином, в культурах ЕНТ від ембріонів 7 тиж гестації після попереднього зберігання у поживному середовищі також відзначають низьку міграційну активність нейроклітин, що спостерігали і в 1-й серії дослідів.

У 3-й серії досліджень в живих культурах кріоконсервованої ЕНТ 9 тиж гестації через 24 год після експлантації спостерігали прикріплення до субстрату значної кількості світлих клітин у вигляді ланцюжків або комплексів різної щільності. Місцями виявляли ознаки початкового міжклітинного контактування за допомогою коротких відростків. Прозорість цитоплазматичних тіл, чіткі контури та наявність відростків свідчили про їх життєздатність. Проте, під час подальшого культивування на 4-ту добу більшість нейроклітин заокруглювалися, вони втрачали відростки, зменшувалися, набували темно-го забарвлення і десквамувалися. Це може свідчити про те, що попередня кріоконсервація ЕНТ пригнічує життєздатність клітин в умовах подальшого культивування. В другому досліді культивовані клітини попередньо консервованої ЕНТ від ембріонів 7 тиж гестації загинули вже через 1 добу.

Висновки 1. ЕНТ 9 тиж гестації в первинних культурах має високу життєздатність, утворює поширену зону росту і виявляє ознаки диференціювання нейробластів у нейротици, а гліоцитів — у протоплазматичні та фіброзні астроцити. Попереднє зберігання ЕНТ від ембріонів 9 тиж гестації в поживному середовищі DMEM протягом 24 год перед культивуванням не впливає на активність росту експлантатів протягом періоду прижиттєвого спостереження, що підтверджується результатами морфологічних досліджень.

2. На відміну від ЕНТ, отриманої від ембріонів 9 тиж гестації, експлантати ЕНТ від ембріонів 7 тиж гестації значно гірше та пізніше адаптуються до умов культивування і виявляють низький потенціал росту протягом усього періоду спостереження культур до 14 діб. Попереднє зберігання ЕНТ 7 тиж гестації в поживному середовищі протягом 24 год перед культивуванням не змінює характер росту експлантатів.

3. Активність росту попередньо кріоконсервованої ЕНТ в умовах культивування вкрай низька, відзначають схильність до ранньої загибелі більшості клітин з подальшою їх десквамацією.

Список літератури

1. Балабанов В.Ю., Павлов О.В., Бобрышев Ю.В. Получение «чистых» культур нейронов головного мозга эмбрионов человека // Цитология. — 1992. — Т.34, №5. — С.83–87.
2. Викторов И.В., Крюкофф Т.Л. Формирование линейных систем агрегатов в культурах диссоциированных клеток эмбрионального мозга // Бюлл. эксперим. биологии и медицины — 1980. — №9. — С.353–355.
3. Викторов И.В., Хаспеков Л.Г., Шашкова Н.А. Культивирование ткани и клеток центральной нервной системы // Руководство по культивированию нервной ткани. Методика. Техника. Проблемы. — М.: Наука, 1988. — С.141–167.
4. Грищенко В.І. Фундаментальні дослідження і нові біотехнології одержання клітинних і тканинних алотрансплантатів // Трансплантологія. — 2003. — Т.4, №1. — С.12–15.
5. Зозуля Ю.А., Цимбалюк В.И., Васильева И.Г. и др. Метаболические эффекты трансплантации эмбриональной нервной ткани при черепно-мозговой травме у крыс // Журн. АМН Украины. — 1998. — №4. — С.597–608.
6. Инсезарова Г.М., Сотников О.С. Поведение нервного клетка в культуре сенсорного ганглия, обработанного проназой. — СПб: Ин-т физиологии РАН, 1993. — 15 с.
7. Миронова Е.В., Лукина А.А. Динамика дегенерации нейронов коры головного мозга крыс при действии токсических доз глутамата // Вестн. молодых ученых. — 2004. — №2. — С.20–25.
8. Сукач А.Н. Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом // Цитология. — 2005. — Т.47, №3. — С.207–213.
9. Терских В.В., Васильев А.В. Трансплантация клеток и тканевых эквивалентов — новое направление в биомедицине // Цитология. — 1996. — Т.38, №2. — С.252–253.
10. Угрюмов М.В. Шабалов В.А., Федорова Н.В. Использование нейротрансплантации в лечении болезни Паркинсона // Вопр. нейрохирургии. — 1998. — Т.20, №1. — С.40–51.
11. Цимбалюк В.И., Медведев В.В. Нейрогенные стволовые клетки. — К., Коваль, 2005. — 596 с.
12. Цимбалюк В.І., Васильева І.Г., Олексенко Н.П. та ін. Вплив екстракту фетальної нервової тканини на вміст гама-аміномасляної кислоти у культурі нервових клітин // Трансплантологія. — 2001. — Т.2, №1. — С.70–73.
13. Шунгская В.Е., Власова И.Г., Ененко С.О. Проблемы адаптации на тканевом и клеточном уровнях в условиях культуры нервной ткани и срезов мозга // Возбудимые клетки в культуре ткани: Материалы I Всесоюз. симпозиума. Пущино, 1984. — С.84–97.
14. Lein P.J., Banker G.A., Higgins D. Laminin selectively enhances axonal growth and accelerates culture // Dev. Brain Res. — 1992. — V.2. — P.191–197.

Сравнительная цитоструктурная оценка роста эмбриональной нервной ткани человека в условиях культивирования при различных способах ее хранения
Семенова В.М., Цымбалюк В.И., Пичкур Л.Д., Стайно Л.П.

Изучены особенности роста культур эмбриональной нервной ткани (ЭНТ), полученной от эмбрионов человека 7 и 9 нед гестации при различных условиях ее хранения. При сравнительном анализе жизнеспособности культур нативной ЭНТ, полученной через 1 ч после ее отбора, и культур ЭНТ после 24 час хранения в синтетической питательной среде, отмечен более высокий потенциал роста нейроцитов ЭНТ, полученной от эмбрионов 9 нед гестации по сравнению с таковыми культур, полученных от эмбрионов 7 нед гестации в аналогичных условиях эксперимента. Активность роста культур нейроцитов предварительно криоконсервированной ЭНТ низкая, выявляют их раннюю гибель с последующей десквамацией.

Comparative cytostructural assessment of human embryonic neural tissue growth in conditions of cultivation at different storage ways
Semenova V.M., Tsybalyuk V.I., Pichkur L.D., Stayno L.P.

Peculiarities of embryonic neural tissue (ENT) cultural growth, obtained from 7–9 weeks human embryos, at different storage conditions were observed. Analysis of vitality revealed that ENT from 9-weeks embryos, obtained during 1 hour after abortion or after 24 hours of storage in the synthetic medium, had higher growth potential, than from 7-weeks embryos. Neurocytes from preliminary cryopreserved ENT exhibited low growth activity and early death with desquamation.

Коментар

до статті Семенової В.М. та співавторів «Порівняльна цитоструктурна оцінка росту ембріональної нервової тканини людини в умовах культивування за різних способів її зберігання»

Трансплантація ЕНТ як різновид замісної клітинної терапії у комплексному лікуванні різних видів органічного ураження ЦНС набула широкого використання. У зв'язку з цим актуальним є удосконалення способів підготовки ембріонального матеріалу для нейротрансплантації хворим. Це стосується вибору оптимальних строків взяття та режиму збереження ЕНТ до клінічного використання. Автори поставили за мету порівняння активності росту ЕНТ, отриманої від ембріонів людини 7 та 9 тиж гестації в умовах культивування, розпочатого безпосередньо після відбору абортівного матеріалу або після його зберігання в живильному середовищі протягом 24 год. Для вирішення цих питань авторами застосований метод експлантаційних культур, який дозволяє оцінити міграційну та проліферативну активність нейроклітин, а також їх здатність до формування характерних гістотипових структур. Проведені дослідження підтверджені мікрофотографіями прижиттєвого спостереження дослідних культур, показали, що найбільш широку зону росту формують експлантати ЕНТ від ембріонів людини 9 тиж гестації незалежно від умов попереднього зберігання матеріалу. На відміну від цього, потенціал росту культур ЕНТ, отриманих від ембріонів людини 7 тиж гестації, в аналогічних умовах більш низький. Попередньо криоконсервовані нейроклітини під час культивування виявили низьку життєздатність з їх ранньою загибеллю. Результати проведених досліджень розширюють уяву про гістобіологічні властивості ЕНТ і мають важливе практичне значення.

*М.І. Лісяний, доктор мед. наук, професор,
 зав. відділом нейроімунології
 Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України*