

УДК 616.831-089.843-031:611.813.3.018.032

Потенциальные свойства нейроклеток из обонятельной луковицы человека в условиях культивирования

Зозуля Ю.А., Семенова В.М., Лисяньий Н.И., Любич Л.Д.,
Высоцкий Н.С., Стайно Л.П., Медведев В.В.

Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев, Украина

В условиях длительного культивирования изучены потенциальные свойства нейроклеток обонятельной луковицы (ОЛ) человека. Установлена возможность фенотипической идентификации нейральных стволовых клеток (НСК) в гистоструктуре нативной ткани и диссоциированных культурах этого образования. Показано модифицирующее влияние культивационной среды различного состава на процессы пролиферации и дифференцировки нейроклеток ОЛ.

Ключевые слова: нейральные стволовые клетки, обонятельная луковица, культивирование нейроклеток.

Вступление. Разработка методов лечения различных заболеваний человека с применением стволовых клеток (СК) является одним из прогрессивных направлений современной медицины. Внедрение клеточных технологий с использованием СК различного генеза позволит принципиально изменить существующие подходы к лечению и поддерживающей терапии некоторых тяжелых и неизлечимых болезней человека, оптимизировать решение проблем геронтологии в плане увеличения продолжительности и улучшения качества жизни пациентов пожилого и старческого возраста.

В области неврологии и нейрохирургии клеточная терапия с применением эмбриональных и постнатальных НСК перспективна для повышения эффективности лечения болезней Паркинсона, Альцгеймера, рассеянного склероза, ишемических, постинсультных и посттравматических состояний и даже опухолей мозга, что экспериментально подтверждено на многих моделях церебральной и спинальной патологии. В настоящее время во всех развитых странах мира это направление является интенсивно развивающимся разделом реконструктивной нейрохирургии.

Важное практическое значение имеет изучение биологии и потенциальных свойств нейроклеток из ОЛ человека. Обращение к этому объекту обусловлено тем, что ядро ОЛ взрослых млекопитающих и человека считают возможным источником получения НСК для их дальнейшего использования в нейротрансплантации при некоторых дегенеративных заболеваниях ЦНС [8, 10]. ОЛ представляет объект для реального получения НСК у взрослых пациентов в связи с ее ограниченным объемом и анатомически автономной топографией. Эти преимущества

ОЛ по сравнению с другими регионами генерации НСК в головном мозге взрослых пациентов обеспечивают относительную доступность хирургического удаления ОЛ и последующего культивирования клеточного материала.

Установлено, что ОЛ постнатального мозга, будучи завершением рострального миграционного тракта, сформированного астроцитами, аккумулирует популяцию НСК, которые из субвентрикулярной зоны (СВЗ) мигрируют в ОЛ и дифференцируются в нервные и глиальные клетки [14, 15]. Вновь реплицированные нейроны дают иммуногистохимически положительную реакцию на нестин (маркер нейроэпителиальных стволовых клеток) и ТiС4 (маркер постмитотических клеток). При этом постоянное обновление обонятельных нейронов в ОЛ млекопитающих и человека обеспечивает базисный механизм постнатального нейрогенеза за счет НСК. В связи с этим ОЛ рассматривают как резервуар прогениторных/стволовых нейроклеток, представляющий динамическую клеточную микросистему с нейрогенераторными свойствами [8]. В условиях культивирования НСК из ОЛ способны генерировать нейросферы, что является классическим признаком полноценных НСК [9, 11]. Основным фактором роста фибробластов (bFGF) потенцирует самообновление НСК, полученных из ОЛ, а β -фактор роста нервов стимулирует их дифференциацию в зрелые нейроны и разные типы глии [10].

Целью работы явилось изучение фенотипических особенностей и потенциальных свойств нейроклеток из ОЛ человека в диссоциированных культурах при использовании питательной среды различного состава.

Материалы и методы исследования. Диссоциированные культуры получены из 14

ОЛ, удаленных во время нейрохирургических операций, при доступе к базальным внемозговым опухолям (менингиомам). Используются общепринятые методики культивирования, разработанные для нервной ткани [1]. Благодаря щадящей механической диссоциации ткани ОЛ содержание живых нейроцитов в 1 мл полученной суспензии составило в среднем $2-10 \times 10^6$, что считают удовлетворительным показателем их жизнеспособности для последующего культивирования, которое проводили: 1) в питательной среде стандартного состава (среда DMEM, эмбриональная телячья сыворотка — 40%, глюкоза — 8 г/л, инсулин 0,2 ед/мл); 2) в бессывороточной питательной среде для подавления пролиферации нейроцитов; 3) в присутствии ретиноевой кислоты (2×10^6 моль/л, Retinoic acid, Sigma) для изучения способности нейроцитов ОЛ к нейробластной дифференцировке. Культуры содержали в углекислотном инкубаторе при постоянной температуре (36°C), влажности (90%) и концентрации CO_2 (5%). Через каждые 3–4 сут питательную среду обновляли и определяли количество и жизнеспособность нейроцитов в 1 мл суспензии (стандартный тест с трипановым синим). Иммуногистохимическое исследование препаратов с окраской на виментин проводили с помощью наборов "Sigma" (Германия). Культуры наблюдали прижизненно в инвертированном микроскопе (БИОЛАМ П-3 производства ЛОМО, Санкт-Петербург), изучали на фиксированных цитологических препаратах (на покровных адгезивных стеклах), окрашенных гематоксилином Караччи или тионином. Микроскопию препаратов проводили на цитонализаторе изображения Ibas-2000 (Германия) с последующей фоторегистрацией. При цитологическом анализе переживающих культур ОЛ в динамике наблюдений учитывали количество жизнеспособных нейроцитов, характер их пролиферации, дифференцировки и дегенерации, а также особенности формирования пространственной архитектуры клеточных ансамблей. Для адекватной оценки фенотипа культивируемых нейроцитов предварительно изучали структуру нативной ткани ОЛ, полученной у 3 пациентов при патологоанатомическом исследовании и обработанной с помощью общепринятых гистологических методов.

Результаты и их обсуждение. При гистологическом исследовании в структуре нативной ткани ОЛ обнаружены нейроциты различной степени дифференциации. В центральных отделах ОЛ определяли преимущественно мультиполярные крупные нейроциты с базофильной гранулярной субстанцией Ниссля в цитоплазме и характерными пузырьковидными ядрами с крупными единичными ядрышками. Такие ней-

роциты имели хорошо развитые множественные отростки различной длины. Более мелкие нейроциты угловатой формы имели широкое основание в виде митры и содержали гранулы Ниссля в цитоплазме. По данным классической нейрогистологии, такие типы нейроцитов обозначают как митральные клетки, специфичные для микроанатомии ОЛ [2]. Глиальный компонент в ткани ОЛ представлен астроцитами и олигодендроцитами вокруг нейроцитов. Помимо дифференцированных нейроцитов, в ткани ОЛ обнаружены диффузно рассеянные немногочисленные безотростчатые нейроциты округлой формы с узкой цитоплазмой и светлыми ядрами (*рис. 1 цветной вкладки*). Упрощенную микроанатомии таких нейроцитов в литературе определяют как „минимальный фенотип“, характерный для СК различного генеза [3]. Полученное представление о клеточном составе ОЛ стало основополагающим для цитологической идентификации нейроцитов в условиях культивирования.

По данным прижизненных наблюдений культур ОЛ в первые 1–2 сут культивирования клеточной суспензии происходило массовое прикрепление к субстрату большинства округленных безотростчатых нейроцитов с опалесцирующей цитоплазмой, которые располагались изолированно или в виде микроагрегатов различной плотности. На 3–4-е сутки среди них различали отдельные клетки угловатой и ромбовидной формы с начальными признаками формирования коротких конусовидных отростков. На 5–7-е сутки, по мере разрыхления микроагрегатов, между такими отростками местами устанавливались межклеточные контакты. Учитывая особенности клеточного состава исходной ткани ОЛ, правомерно предположить, что эти нейроциты представляют фракцию исходно присутствующих в ОЛ нейроцитов, которые выдержали механическую диссоциацию, адаптировались к условиям жизнедеятельности *in vitro* и сохранили способность к регенерации отростков. В дальнейшем эти предсуществовавшие нейроциты, лишенные глиального сопровождения, подвергались спонтанной дегенерации и к 10–12-м суткам десквамировались.

В последующем при культивировании суспензии ОЛ в полной питательной среде преобладали недифференцированные безотростчатые нейроциты, формировавшие на субстрате небольшие колонии, кластеры и мелкие сфероидные микроагрегаты, постепенно увеличивавшиеся в объеме. Эти многослойные нейросфероподобные структуры содержали недифференцированные нейроциты и компактные скопления виментин-положительных прогениторных нейроцитов, из них лишь в

некоторых проявлялась тенденция к образованию начальных отростков (*рис. 2, а, б, в цветной вкладки*).

О пролиферации культивируемых нейроцитов ОЛ свидетельствовало также часто выявляемое их попарное расположение на субстрате, что косвенно отражает их способность к самовоспроизведению путем прямого симметричного деления.

В динамике прижизненного наблюдения культур ОЛ в питательной среде полного состава без митогенов обнаруживали постепенное уменьшение количества нейроцитов вследствие прогрессирующей дегенерации большинства из них. На 29–30-е сутки прикрепленными к субстрату оставались лишь отдельные, преимущественно мелкие компактные сферические структуры, цепочечные клеточные комплексы и единичные нейроциты с сохраненной морфологией недифференцированного фенотипа. Наибольший срок переживания таких нейроцитов в отдельных наблюдениях достигал 62–86 сут.

Помимо фиксированных к субстрату нейроцитов, во все сроки культивирования ОЛ выявляли также рыхло связанные с подложкой флюктуирующие монослойные пласты безотростчатых нейроцитов без каких-либо признаков специфической дифференцировки.

При количественной оценке содержания и жизнеспособности нейроцитов ОЛ, культивируемых в полной питательной среде в течение 30 сут, подтверждается наблюдаемое постепенное уменьшение доли жизнеспособных нейроцитов с 61,9 до 20,8%, т.е. в 3 раза, что может указывать на постепенную элиминацию фракции короткоживущих нейроцитов ОЛ при сохранении пролиферативных способностей немногочисленной популяции, формирующей клоны, кластеры и сфероподобные структуры.

Таким образом, при длительном культивировании нейроцитов ОЛ в питательной среде с наличием сыворотки проявляется способность к самовоспроизведению небольшой части нейроцитов, предположительно — НСК, которые длительно и стабильно сохраняют недифференцированный фенотип.

В условиях бессывороточного содержания культур ОЛ на 29–30-е сутки отмечали уменьшение количества недифференцированных нейроцитов в 2 раза (до 11,9%). При отсутствии сфероидоподобных комплексов в этих культурах обнаружены мультиполярные нейроциты и глиоциты астроцитарного и олигодендроглиального фенотипов (*рис. 3, а, б, в цветной вкладки*). Местами фибриллярные астроциты продуцировали глиофибриллы, имитирующие участки глиоза.

Таким образом, в условиях бессывороточного культивирования нейроцитов ОЛ подтвержден ожидаемый эффект блокирования их пролиферации и проявления фенотипических признаков их мультипотентной дифференцировки в нейрональном и глиальном направлении.

В отличие от предыдущих опытов, при культивировании нейроцитов ОЛ в бессывороточной среде с добавлением ретиноевой кислоты во все сроки наблюдения определяли большее содержание жизнеспособных нейроцитов. Так, через 17 сут культивирования количество “живых” нейроцитов составляло 51,8–42,8%, в период 18–28 сут — 29,2%, что было значительно больше, чем в группах сравнения. В то же время, в этих культурах выявляли более многочисленную фракцию нейроцитов с характерным фенотипом нейробластов и зрелых нейроцитов. У них были хорошо выраженные цитоплазматические тела, они содержали характерные ядра с крупными ядрышками, были снабжены многочисленными отростками различной длины с боковым и терминальным ветвлением. В динамике прижизненного наблюдения таких нейроцитов отмечалось постепенное удлинение их новообразованных отростков, что отражает процесс их созревания. На цитологических препаратах этих культур четко прослеживается разнообразие фенотипических форм нейронов с наличием множественных, ветвящихся отростков различной длины (*рис. 4, а, б цветной вкладки*).

Важно отметить образование межклеточных связей между нейронами благодаря своеобразным анастомозам между их отростками с формированием гистотипических нейрональных ансамблей в связи с направленным ростом аксонов и межклеточным контактированием дендритов. При этом в присутствии в питательной среде культур ретиноевой кислоты нейроциты сохраняли характерную морфологию зрелых типов на протяжении 46–50 сут (*рис. 5 цветной вкладки*).

Таким образом, при культивировании нейроцитов ОЛ в питательной среде с добавлением ретиноевой кислоты моделируется индукция их специфической дифференцировки в нейробластном и нейрональном направлениях, а также более длительно сохраняется оптимальная выживаемость нейроцитов. Аналогичный эффект дифференцирующего и протекторного влияния ретиноевой кислоты наблюдали в культурах криоконсервированных нейроцитов человека [5].

Заключение. При исследовании потенциальных свойств нейроцитов ОЛ в динамике длительного культивирования установлена возможность идентификации НСК, которые

длительно и стабильно сохраняют недифференцированный фенотип, идентичный такому в нативной ткани ОЛ (*in vivo*). По нашим наблюдениям эта малочисленная популяция округленных безотростчатых нейроклеток без каких-либо признаков специфической дифференциации диффузно рассеяна в ткани ОЛ среди многочисленных дифференцированных нейроцитов и глиоцитов и характеризуется минимальным фенотипом. При культивировании в питательной среде с наличием сыворотки такие нейроклетки длительно и стабильно сохраняют недифференцированный фенотип и способны формировать многоклеточные нейросфероподобные структуры, что является классическим свойством НСК. Это подтверждает стимулирующее влияние сыворотки на пролиферативный потенциал культивируемых клеток, тогда как удаление сыворотки — блокирует их пролиферацию и способствует дифференцировке [13].

В динамике культивирования ОЛ в этих условиях выживаемость большинства нейроклеток неуклонно снижалась (через 30 сут — в 9–10 раз) вследствие элиминации короткоживущей фракции нейроклеток, а также нарастающей спонтанной инволюции культур, обусловленной дефицитом митогенных стимулов. При этом признаки спонтанной дифференцировки отдельных нейроклеток ограничивались формированием в них коротких примитивных отростков, что отражает начальные проявления дифференцировки в соответствии с внутренней клеточной программой, регулирующей этот процесс.

В диссоциированных культурах ОЛ выявлена способность части нейроклеток к специфической дифференцировке, направленность которой зависит от состава питательной среды, т.е. обусловлена влиянием их локального микроокружения. Максимальный дифференцировочный потенциал нейроклеток ОЛ проявляется в модифицированных условиях культивирования, способствующих увеличению популяции специализированных типов нейроклеток. Так, при культивировании нейроклеток в бессывороточной питательной среде ДМЕМ проявляется их способность дифференцироваться в нейроциты и глиоциты; присутствие ретиноевой кислоты — обеспечивает преимущественно нейробластную дифференцировку нейроклеток с терминальным формированием зрелых нейроцитов мультиполярной формы. Для них характерны длинные ветвящиеся отростки и формирование пространственных ансамблей, типичных для нейрональных сетей. Наряду с этим присутствие ретиноевой кислоты обеспечивает выживаемость большего количества нейроклеток по сравнению с таковым при применении других

модификаций их культивирования, что, по-видимому, отражает протекторный эффект этого препарата. Под влиянием ретиноевой кислоты в культуральной среде происходит нейроноподобная дифференцировка мультипотентных СК стромы костного мозга [6].

Наши наблюдения согласуются с данными M. Schuldiner и соавторов [12], показавших, что при культивировании нейроклеток в бессывороточной питательной среде, а также в среде, содержащей ретиноевую кислоту, индуцируется нейрональная дифференцировка НСК и экспрессия нейронспецифических молекул. Считают, что ретиноевая кислота, запускающая нейрогенез, является незаменимым индуктором нейрогенинов или NeuroD на пути дифференцировки эмбриональных СК в нейроны. Однако пока не разработаны четкие прописи целенаправленного получения холинэргических, ГАМК- или серотонинэргических нейронов на этапе созревания бластных форм [4, 7].

Таким образом, потенциальные свойства нейроклеток ОЛ постнатального мозга взрослого человека, исследованные в динамике длительного культивирования, свидетельствуют об их пластичности и мультипотентности, что является важнейшей характеристикой НСК и обусловлено первостепенной значимостью внеклеточных сигналов локального микроокружения [16].

Список литературы

1. Божкова В.П., Брежестовский Л.А., Буравлев В.М. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. — М.: Наука, 1988. — 317 с.
2. Гринштейн А.М. Пути и центры нервной системы. — М.: Медгиз, 1946. — 328 с.
3. Запорожан В.Н., Бажора Ю.И. Стволовые клетки. — Одесса: Одес. гос. мед. ун-т, 2004. — 228 с.
4. Репин В.С., Ржанинов А.А., Шаменков Д.А. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. — М.: Реметэкс, 2002. — 224 с.
5. Семенова В.М., Лисяный Н.И., Любич Л.Д. и др. Изучение индукции дифференцировки клеток, полученных из эмбрионального и постнатального мозга в условиях культивирования *in vitro* // Укр. нейрохірург. журн. — 2004. — №1. — С.4–7.
6. Щегельская Е.А., Микулинский Ю.Е., Ревизиц А.В. и др. Индуцированная дифференцировка клеток стромы костного мозга мыши в нервные клетки // Цитология. — 2002. — Т.44, №2. — С.637–641.
7. Bain G., Kitchens D., Yao M. et al. ESC express neuronal properties *in vitro* // Dev. Biol. — 1995. — V.168. — P.342–357.
8. Liu Z., Martin L.J. Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human // J. Comp. Neurol. — 2003. — V.459, N4. — P.368–391.

9. Othman M.M., Klueber K.M., Roisen F.J. Identification and culture of olfactory neural progenitors from GFP mice // *Biotech. Histochem.* — 2003. — V.78, N2. — P.57–70.
10. Pagano S., Impagnatiello F., Girelli M. et al. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb // *Stem Cells.* — 2000. — V.18, N4. — P.295–300.
11. Roisen F.J., Klueber K.M., Lu C.L. et al. Adult human olfactory stem cell // *Brain Res.* — 2001. — V.890, N1. — P.11–22.
12. Schuldiner M., Eiges R., Eden A. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells // *Brain Res.* — 2001. — V.913, N2. — P.201–205.
13. Skogh C., Eriksson C., Kokaia M. Generation of regionally specified neurons in expanded glial cultures derived from the mouse and human lateral ganglionic eminence // *Molec. Cell. Neurosci.* — 2001. — V.17, N5. — P.811–820.
14. Taupin P., Gage F.H. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals // *J. Neurosci. Res.* — 2002. — V.69, N6. — P.745–749.
15. Temple S., Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system // *Curr. Opin. Neurobiol.* — 1999. — V.9, N1. — P.135–141.
16. Vescovi A.L., Parati E.A., Gritti A. et al. 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. — V.1. — P.71–83.

**Потенційні властивості нейроклітин
з нюхової цибулини людини в умовах
культивування**

**Зозуля Ю.П., Семенова В.М., Лісяний М.І.,
Любич Л.Д., Высоцький М.С., Стайно Л.П.,
Медведев В.В.**

В умовах тривалого культивування досліджені потенційні властивості нейроклітин нюхової цибулини людини. Встановлено можливість фенотипової ідентифікації нейральних стовбурових клітин у структурі нативної тканини та в дисоційованих культурах цього утворення. Показаний модифікуючий вплив культивувального середовища різного складу на процеси проліферації та диференціювання нейроклітин нюхової цибулини.

**Potential properties of neural cells from
human olfactory bulb in cultivating conditions**

**Zozulya Yu. A., Semenova V.M., Lisyany N.I.,
Lyubych L.D., Vysotsky N.S., Stayno L.P.,
Medvedev V.V.**

The potential properties of human olfactory bulb neural cells have been investigated under conditions of long-term cultivation. The authors determined the phenotypic identification of neural stem cells in the histological structure of native tissue and in the dissociated cultures of this formation. The issue shows the modifying influence of culture medium different composition on the processes of proliferation and differentiation of olfactory bulb neural cells.

Коментар

до статті Зозулі Ю.П., Семенової В.М., Лісяного М.І та ін. “Потенциальные свойства нейрокліток из обонятельной луковицы в условиях культивирования”

Робота продовжує цикл започаткованих в Інституті нейрохірургії досліджень з біології нейральних (нейрогенних) стовбурових клітин, які передбачають використовувати в майбутньому як замісну клітинну терапію при деяких нейродегенеративних захворюваннях головного мозку.

Представлені результати експериментального вивчення потенційних властивостей нейроклітин, отриманих з нюхової цибулини людини в умовах культивування. Вибір об'єктом культивування саме нюхової цибулини для отримання нейроклітин зумовлений значним інтересом в останній час до цього утворення у зв'язку з постнатальним нейрогенезом, який відбувається в ній протягом всього життя людини.

Показані відмінності проліфераційного та диференційного потенціалів культивованих нейроклітин з нюхової цибулини залежно від специфічного мікрооточення, яке моделювали різним складом культивувального середовища. Авторами встановлено, що наявність ембріональної сироватки у складі поживного середовища культур стимулює проліферацію прогеніторних віментин-позитивних нейроклітин. На відміну від цього, у безсироватковому середовищі на адгезивному субстраті нейроклітини культур нюхової цибулини виявляють генетично детерміновану мультипотентність спонтанного диференціювання у нейробласти та гліоцити. За умови додавання до культивувального середовища ретиноєвої кислоти відтворюється індукція нейрогенного диференціювання нейроклітин у нейробласти та нейрцити з утворенням характерних гістотипових сіткоподібних структур.

Результати проведених досліджень добре ілюстровані, детально обговорені і розширюють уявлення про біологію нюхової цибулини як джерела нейральних стовбурових клітин.

Робота має як теоретичний, так і практичний інтерес.

*В.І. Цимбалюк, доктор мед. наук, проф., чл.-кор. АМН України,
зав. клініки відновної нейрохірургії
Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова АМН України*

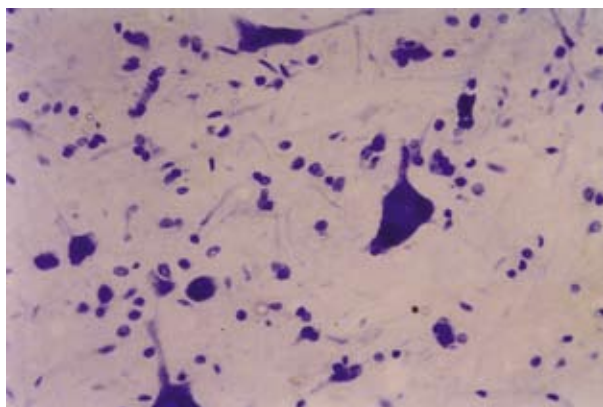


Рис. 1. Клеточный состав нативной ткани ОЛ. Пояснения в тексте. Окраска тионином по Нисслю. Ув.×400.

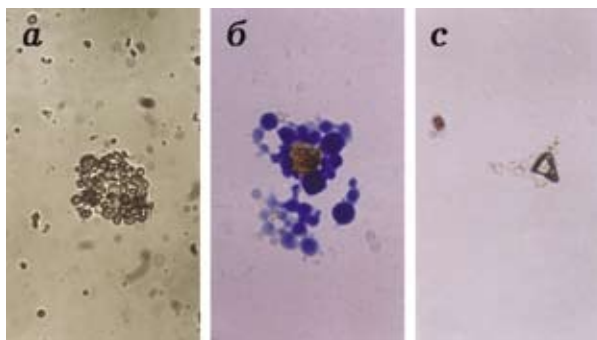


Рис. 2. а — клеточный микроагрегат-нейроцита; б — скопление виментин-положительных нейроцитов; в — начальные отростки. Доокраска тионином. Ув.×800.

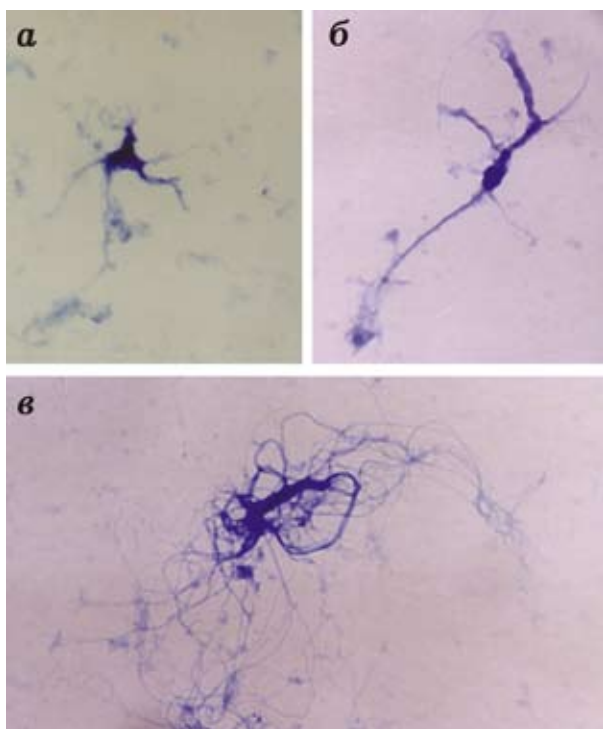


Рис. 3. Культура нейроцитов ОЛ (через 29 сут): а — мультиполярный нейроцит; б — веретеновидный олигодендроцит; в — астроциты. Окраска тионином по Нисслю. Ув.×800.

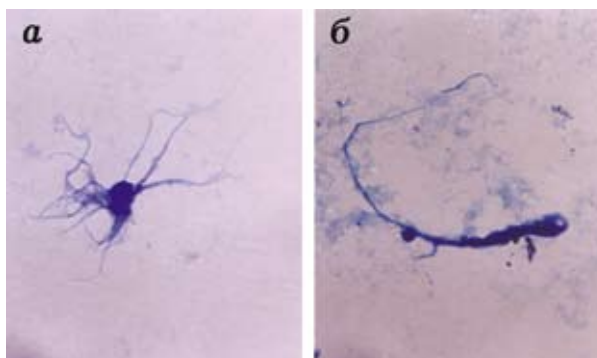


Рис. 4. Культура нейроцитов ОЛ при культивировании в питательной среде с ретиноевой кислотой: а — мультиполярный нейроцит; б — униполярный нейроцит. Окраска тионином. Ув.×800.

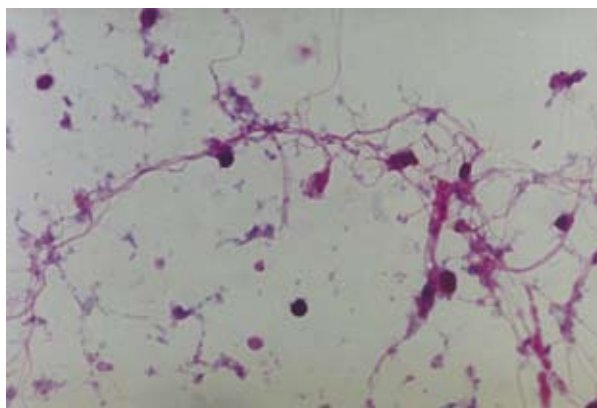


Рис. 5. Характерные сетевидные структуры в культуре нейроцитов ОЛ в присутствии ретиноевой кислоты, 50 сут. Окраска гематоксилином Караччи. Ув.×400.