

УДК 612.646:612.82:612.014.3:57.082.15

Пролиферативный и дифференцировочный потенциал нейроклеток эмбрионального мозга человека в условиях культивирования

Семенова В.М., Любич Л.Д., Лисяный Н.И., Петренко А.Ю., Стайно Л.П.

Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев,
Институт криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Изучены особенности пролиферации и влияние некоторых биопрепаратов на цитоструктурные признаки дифференцировки культивируемых нейральных предшественников, полученных из криоконсервированных нейроклеток мозга человека. Выявлена положительная реакция популяции пролиферирующих нейроклеток на виментин. Добавление в культуры препарата инсулин-трансферрин-селенита (ИТС) не способствовало их терминальной дифференцировке. В присутствии ретиноевой кислоты в питательной среде культур наблюдали увеличение числа клеток, дифференцирующихся по нейрональному типу. Часть нейроклеток-предшественниц дифференцировались в глиоциты, отмечена их положительная реакция на GFAP. Полученные результаты свидетельствуют, что клетки-предшественницы, полученные при длительном культивировании в суспензии в обедненной среде ДМЕМ, сохраняют способность дифференцироваться в нейрональном и глиальном направлениях.

Ключевые слова: нейральные стволовые клетки, нейроклетки-предшественницы, дифференцировка, культивирование *in vitro*, суспензионная культура, ретинола ацетат, ретиноевая кислота, виментин, GFAP.

Современный период развития медицины характеризуется интенсивной разработкой клеточных технологий, использование которых способствует повышению эффективности лечения многих заболеваний. В области неврологии и нейрохирургии все более широко применяются нейральные стволовые клетки (НСК) эмбрионального и постнатального мозга в целях заместительной клеточной терапии при различных заболеваниях. Это обусловлено уникальными свойствами НСК генерировать *in vivo* все типы нейронов и глии под влиянием специфических сигналов локального микроокружения. В связи с этим в настоящее время в эксперименте изучают динамику пролиферации культивируемых НСК, а также разрабатывают методы их направленной дифференцировки с накоплением специализированных клеточных фракций *in vitro* для последующего применения в лечении некоторых нейродегенеративных заболеваний нервной системы. Актуальны получение и наработка в условиях культивирования изолированных клеточных популяций избирательно нейронального или глиального типа из эмбриональных нейроклеток (ЭНК), поскольку достаточный объем клеточного материала — одно из важных условий их эффективной нейротрансплантации.

В настоящее время разработаны различные способы получения нейрональных клонов из НСК в культуре: блокирование их пролиферации путем удаления сыворотки и факторов роста (FGF-2 и EGF) из питательной среды, добавление специфических индукторов нейрональной дифференцировки (ретиноевая кислота, инсулин) [1, 8, 11] и др. Кроме того, при создании условий для прикрепления НСК к адгезивному субстрату в бессывороточной среде может проявляться их генетически детерминированная способность к спонтанной дифференцировке в нейробласты и глиоциты. Частота спонтанной дифференцировки ЭСК линии VLSb в нейроны может достигать 15–30% [4]. При образовании отростков и поддержании межклеточных контактов на стадии дифференцировки в присутствии факторов роста в культуральной среде увеличивается количество генерированных нейронов на 8–60%. Выживанию нейронов *in vitro* способствуют такие нейротрофические факторы, как NT3, NT4 и PDGF, а при удалении сыворотки или EGF из культуральной среды

индуцируется генерация нейронов [17]. Ретиноевая кислота и фактор роста нервов-β увеличивают выход нейронов из НСК и экспрессию нейронспецифических молекул [16]. Воздействие экзогенного инсулина также может индуцировать увеличение количества зрелых нейронов, способствуя развитию нейрофиламентов в цитоплазме и росту аксонов [15].

Нами изучены особенности пролиферации ЭНК мозга человека в динамике культивирования, а также их дифференцировочный потенциал в ответ на воздействие ряда специфических индукторов — ИТС (производства PanEco Ltd., Россия); ретинола ацетата (Киевский завод витаминных препаратов); фетальной телячьей сыворотки (ФТС) (Киевский завод витаминных препаратов); ретиноевая кислота (Sigma, Германия).

Материалы и методы исследования. Использованы криоконсервированные нейроклетки человека (7–9-я неделя гестации), полученные из низкотемпературного банка клеток Института криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков). Суспензию культур клеток-предшественниц получали по описанной ранее методике [2]. Запечатанные контейнеры с ЭНК извлекали из жидкого азота, помещали на водяную баню для оттаивания при температуре 38–40°C и культивировали в стеклянных флаконах в среде ДМЕМ. Через каждые 3 сут половину культуральной среды обновляли. Для цитологического исследования кластеры НСК через 7, 14, 30 сут культивирования в суспензии переносили с помощью пипетки в пробирки, центрифугировали в течение 3 мин при скорости 1000 об./мин, осадок ресуспендировали в среде ДМЕМ и наносили на покровные стекла, покрытые полиэтиленмином, в чашки Петри. Культуры содержались в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C, постоянной влажности 95 % и газовом составе. Живые культуры наблюдали прижизненно под инвертированным микроскопом (БИЛАМ П-3, Санкт-Петербург). Пролиферативные и дифференцировочные свойства НСК-предшественниц оценивали при их культивировании на подложке в чашках Петри в среде ДМЕМ и добавлении в культуральную среду препаратов: ИТС, содержащего 0,05 мг/мл инсулина, 0,0275 мг/мл трансферрина, 0,0335 мг/мл селенита; ретинола ацетата — 0,2 мг/мл; ФТС — 1%; ретиноевой кислоты — 2×10⁻⁶

моль/л. По окончании культивирования нейроцитов на покровных стеклах фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, окрашивали тионином, заключали в глицерин. Цитологические препараты исследовали в цитонализаторе изображения «IBAS-2000» (Германия) с последующей фоторегистрацией. В каждом варианте опытные культуры нейроцитов на подложке сравнивали с контрольными, в которые вышеперечисленные факторы не добавляли. Иммуногистохимические реакции в культивируемых НСК на виментин — маркер пролиферирующих нейроцитов и глиальный фибриллярный кислый протеин GFAP — маркер глиобластов и астроцитов [8, 18] проводили с использованием наборов Sigma (Германия). Продукт реакции в цитоплазме нейроцитов имел коричневою окраску на фоне изумрудно-зеленой цитоплазмы после докрасивания 0,2% метиловым зеленым.

Результаты и их обсуждение. При количественной оценке содержания ЭНК мозга человека в суспензионных культурах установлено, что в обедненной бессывороточной среде ДМЕМ первоначально — на 7–9-е сутки выявляли уменьшение, а на 10–12-е сутки — увеличение и стабилизацию их содержания, что свидетельствовало о наличии в суспензионной культуре популяции долгоживущих НСК. При изучении культур прижизненно и на цитологических препаратах отмечено массовое прикрепление к субстрату преимущественно округленных нейроцитов с минимальным фенотипом, располагавшихся изолированно и в виде небольших микроагрегатов (*рис. 1 цветной вкладки*). В динамике наблюдения такие нейроциты в течение длительного времени сохраняли округлую форму без признаков цитодифференцировки, а по данным иммуногистохимических исследований в большинстве из них обнаружена экспрессия виментина, что подтверждает их принадлежность к популяции прогениторных нейроцитов (*рис. 2 цветной вкладки*). С увеличением сроков культивирования в среде ДМЕМ содержание виментин-положительных клеток увеличивалось с (28,6±3,6)% (на 2-е сутки) до (77,0±13,9)% (на 16-е сутки), что отражало их способность к пролиферации. Такая динамика увеличения популяции пролиферирующих нейроцитов свидетельствовала, что в процессе длительного культивирования короткоживущие дифференцированные нейроциты погибают, а переживающие недифференцированные прогениторные/НСК сохраняют жизнеспособность и пролиферируют. Аналогичные данные об увеличении доли виментин-экспрессирующих нейроцитов получены и другими авторами [3] на 14-е сутки культивирования ЭНК мозга человека 9–10-й недели гестации.

В наших опытах в культурах ЭНК человека выявляли также нейроциты астроцитарного фенотипа, экспрессировавшие глиальный кислый белок (GFAP) (*рис. 3 цветной вкладки*). В динамике наблюдения количество таких клеток существенно не изменялось. Это также согласуется с данными авторов [3], установивших коэкспрессию виментина большинством нестин-положительных клеток эмбрионального мозга, а также частью GFAP-положительных нейроцитов с астроцитоподобным фенотипом. Двойная экспрессия ЭНК GFAP и виментина может быть обусловлена также астроцитарной мимикрией, характерной для части НСК [5, 6]. При этом показано, что из нейроцитов, экспрессирующих GFAP, могут развиваться нейроны, обладающие фенотипом стриатарных нейронов, в норме развивающихся из ганглиев, а одна из субпопуляций нейрогенных предшественниц может иметь характеристики глии [17].

При культивировании ЭНК в присутствии различных факторов, известных как возможные индукторы направленной дифференцировки, в наших опытах получены следующие результаты. В культурах нейроцитов, содержащихся в течение 21 сут в питательной среде с 1% ФТС и ретинола ацетата, а затем перенесенных на подложку, на 15-е сутки наблюдения преобладали изолированно расположенные недифференцированные клетки без отростков с минимальным фенотипом. Лишь в отдельных из них намечалось образование конусовидных выпячиваний одного из полюсов цитоплазмы без формирования выраженного отростка. В этих культурах преобладали многоклеточные шаровидные агрегаты (*рис. 4 цветной вкладки*), описываемые в литературе как «нейросферы», с иммуногистохимически гетерогенным составом клеток, содержащие НСК, предшественницы, нейро- и глиобласты [3, 4].

В одной из серий наших экспериментов изучено влияние ретиноевой кислоты на культуры криоконсервированных ЭНК человека (9 нед гестации). Препарат добавляли в культуру после их культивирования в среде ДМЕМ+ретинола ацетат в течение 21 сут и пересевали на подложку. Через 14 сут на цитологических препаратах этих культур среди недифференцированных клеток обнаружены нейроциты с обильной цитоплазмой и отростками различной длины. При этом клетки угловатой формы содержали округлые светлые ядра с крупными ядрышками, что характерно для нейробластных форм (*рис. 5 цветной вкладки*). На 10–14-е сутки культивирования количество таких клеток составляло 20–30%.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показали, что ЭНК мозга человека в условиях длительного культивирования в присутствии изученных факторов (ретинола ацетат, ретиноевая кислота), известных как индукторы специфической нейрональной дифференцировки, имеют дифференцировочный потенциал различной выраженности в ответ на действие каждого из них или их последовательное действие. Так, присутствие ретинола ацетата в питательной среде культур индуцирует формирование многоклеточных нейросфер и тенденцию к образованию примитивных отростков лишь в небольшой части клеток. Нейросферы образуются из недифференцированных нейральных предшественников 8–12 и 17–21 нед гестации и характеризуются выраженной морфологической гетерогенностью — средними размерами клонов, формой клеток в клонах, гетерогенностью иммунофенотипа и различным содержанием нестин-, виментин-, GFAP-положительных нейроцитов в разных клонах при их пролиферации в бессывороточной среде в присутствии митогенов. Образование таких нейросфер является классическим свойством НСК [4, 13].

В отличие от этого, при воздействии ретиноевой кислоты на культуры ЭНК человека выявляют отчетливо выраженные признаки цитотипической нейробластной дифференцировки в 20–30% из них, что согласуется с представлением о том, что ретиноевая кислота в узком диапазоне доз индуцирует нейрогенез в культурах линий эмбриональных стволовых клеток [10, 12]. При обработке ЭСК ретиноевой кислотой образуются как нестин-положительные клетки-предшественницы в центре кластеров, так и нейроны, типичные для субвентрикулярной зоны ЦНС, включая мото- и интернейроны [14].

В наших опытах при воздействии ретиноевой кислоты значительно большее количество клеток-предшественниц (НСК) обнаруживали фенотипичес-

кие признаки дифференцировки по нейрональному пути, в отличие от воздействия ретинола ацетата. Эти данные подтверждают факты о том, что ретинола ацетат обеспечивает рост, дифференцировку и сохранение функций клеток, способствуя процессам размножения, тогда как ретиноевая кислота в отношении дифференцировки клеток в несколько раз активнее ретинола, но менее активна в отношении процессов пролиферации. Полагают, что ретиноевая кислота является первым незаменимым индуктором нейрогенинов или Neuro D на пути дифференцировки ЭСК в нейроны. Однако в настоящее время пока нет четких прописей получения холинэргических, ГАМК- или серотонинэргических нейронов на этапе дозревания бластных форм [4].

Одним из механизмов индукции нейрональной дифференцировки ЭНК является способность препаратов ретиноевой кислоты подавлять их миграцию и тормозить пролиферацию. Такие свойства этих препаратов в терапевтической концентрации установлены в культурах некоторых глиом человека и животных, а также в первичных культурах 20 мультиформных глиобластом [9]. Нейрогенез *in vitro*, запускаемый ретиноевой кислотой, индуцирует формирование нейронов из клеточных микроагрегатов, прикрепившихся к адгезивному субстрату [7].

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что нейроклетки-предшественницы, полученные при длительном культивировании эмбриональной нервной ткани человека в бессывороточной среде, сохраняют способность к специфической дифференцировке в нейрональном направлении, в наибольшей степени — после воздействия ретиноевой кислоты. Установлена также гетерогенность клеточного состава этих культур на разных стадиях их развития, а также увеличение доли виментин-положительных клеток в динамике культивирования в бессывороточной среде DMEM. Это подтверждает предположение о том, что в процессе длительного культивирования в этих условиях остаются жизнеспособными преимущественно прогениторные/НСК, способные пролиферировать.

Таким образом, при культивировании нативных криоконсервированных ЭНК человека в бессывороточной среде DMEM можно получить суспензию, обогащенную прогениторными виментин-положительными нейроклетками, способными после прекращения пролиферации направленно дифференцироваться в нейрональном и глиальном направлениях при добавлении индукторов дифференцировки, что является свидетельством их мультипотентности. Однако в наших опытах популяция нейроклеток, проявляющая фенотипические и иммуногистохимические признаки глиальной дифференцировки, менее многочисленна по сравнению с нейрональной фракцией.

Выводы. 1. При длительном культивировании криоконсервированных ЭНК мозга человека в бессывороточной среде DMEM установлена пролиферация прогениторных нейроклеток, что подтверждается их положительной иммуногистохимической реакцией на виментин.

2. Культивирование *in vitro* ЭНК мозга человека в обедненной бессывороточной среде DMEM с добавлением препарата ИТС способствует накоплению кластеров недифференцированных НСК на 7–14-е сутки.

3. Прогениторные ЭНК мозга человека, культивируемые в присутствии ретиноевой кислоты, сохраняют способность к специфической дифференцировке по нейрональному и глиальному типу.

Список литературы

1. Гордеева О.Ф., Мануилова Е.С., Гуляева Д.В. и др. Морфологические аспекты дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в культуре // Цитология. — 2001. — Т.43, №9. — С.851.
2. Зозуля Ю.А., Лисяный Н.И., Любич Л.Д. и др. Длительное культивирование *in vitro* криоконсервированных и нативных нейроклеток эмбрионов человека // Укр. нейрохірург. журн. — 2003. — №2. — С.11–14.
3. Подгорный О.В., Александрова М.А., Марей М.В. и др. Экспрессия белков — маркеров нейральной дифференцировки в культурах стволовых клеток эмбрионального мозга человека // Цитология. — 2004. — №10. — С.935.
4. Репин В.С., Ржанинова А.А., Шаменков Д.А. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. — М., 2002. — С.11–14.
5. Цимбалюк В.І., Медведєв В.В. Генеалогія, ідентифікація та клінічне використання нейрональних стовбурових прогеніторів // Укр. нейрохірург. журн. — 2003. — №4. — С.8–13.
6. Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo J.M., Tramontin A.D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells // Nat. Rev. Neurosci. — 2001. — V.2, N4. — P.287–293.
7. Bain G., Kitchens D., Yao M. et al. ESC express neuronal properties *in vitro* // Dev. Biol. — 1995. — V.168. — P.342–357.
8. Barami K., Zhao J., Diaz F.G., Lyman W.D. Comparison of neural precursor cell fate in second trimester human brain and spinal cord // Neurol. Res. — 2000. — V.23, N2–3. — P.260–266.
9. Bouterfa H., Picht T., Noll E. et al. Retinoids: A promising strategy to inhibit growth and migration of gliomas? // Med. Rediant. Oncol. — 1999. — V.33, N4. — P.437.
10. Brustle O., Kimberly N., Randal D.L. et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors a source of myelinating transplants // Science. — 1999. — V.285. — P.754–756.
11. 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. — V.19, N5. — P.475–479.
12. Liu S., Qu Y., Steward T. et al. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — V.97. — P.6126–6131.
13. Morrison S.J., Shah N.M., Anderson D.J. Regulatory mechanism in stem-like cell biology // Cell. — 1997. — V.88. — P.287–298.
14. Renoncourt Y., Carroll P., Filippi P. et al. Neurons derived *in vitro* from ES cells express homeoproteins characteristic of moto- and interneurons // Mech. Dev. — 1998. — V.79. — P.185–187.
15. Schechter R., Abboud M. Neuronal synthesized insulin roles on neural differentiation within fetal rat neuron cell cultures // Brain Res. Dev. Brain Res. — 2001. — V.127, N1. — P.41–49.
16. Schuldiner M., Eiges R., Eden A. et al. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells // Brain. Res. — 2001. — V.913, N2. — P.201–205.
17. Skogh C., Eriksson C., Kokaia M. et al. Generation of regionally specified neurons in expanded glial cultures derived from the mouse and human lateral ganglionic eminence // Mol. Cel. Neurosci. — 2001. — V.17, N5. — P.811–820.
18. Stemple D.L., Mahanthappa N.K. Neural stem cells are blasting off // Neuron. — 1997. — V.18. — P.1–4.

Проліферативний та диференціувальний потенціал нейроклітин ембріонального мозку людини в умовах культивування Семенова В.М., Любич Л.Д., Лисяний М.І., Петренко А.Ю., Стайно Л.П.

Вивчені особливості проліферації та вплив деяких біопрепаратів на цитоструктурні ознаки диференціювання культивованих нейральных попередників, отри-

маних з криоконсервованих ембріональних нейроклітин мозку людини. Відзначено позитивну реакцію популяції проліферуючих нейроклітин-попередниць на віментин. Додавання до культур препарату інсулін-трансферин-селеніту не сприяло їх термінальному диференціюванню. В присутності ретинової кислоти у живильному середовищі культур спостерігали збільшення кількості нейроклітин, що диференціюються за нейрональним типом. Частина нейроклітин-попередниць диференціювалися у гліоцити, відзначено їх позитивну реакцію на GFAP. Отримані результати свідчать, що клітини-попередниці, одержані за тривалого культивування в суспензії у збідненому середовищі ДМЕМ, зберігають здатність диференціюватись у нейрональну та гліальну напрямки.

In vitro study of proliferation and differentiation cells potentiation, derived from embryonal human brain

Semenova V.M., Lyubych L.D., Lisyany N.I., Petrenko A.Yu., Stayno L.P.

The proliferation potentiation and influence of some biomedicines on neuronal differentiation cytostructural peculiarities of the cultivated neural precursors, derived from human cryopreserved neurocells were studied. Proliferating neurocells population was vimentin-positive. The cultivation in vitro of neuronal precursors in DMEM without serum with insulin-transferrin-selenit addition did not lead to their terminal differentiation. Cultivation with retinoic acid stimulated the neuronal-way differentiating cells growth. Some neural precursors differentiated in glyocytes and were GFAP-positive. The obtained results evidence about saved capacity of both neuronal and glyal differentiation ways of cell precursors, derived after long-term cultivation in suspension in DMEM.

Комментарий

к статье Семеновой В. М., Любич Л. Д., Лисяного Н. И., Петренко А. Ю., Стаино Л. П. «Проліферативний і дифференцировочный потенциал нейрокліток ембріонального мозгу людини в умовах культивування»

Одним из перспективных направлений в поиске эффективных методов лечения различных заболеваний головного мозга является клеточная терапия — трансплантация эмбриональных нервных клеток. Обладая высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом и наименьшей иммуногенностью, они характеризуются уникальной онтогенетической способностью восполнять дефицит нейронов и ткани мозга, в течение длительного времени продуцировать дефицитные молекулы эндогенных биорегуляторов.

В последние годы в области нейротрансплантации особое внимание уделяют разработке оптимальных условий культивирования эмбриональных нейрокліток и способов их дифференциации, что повышает количество предшественников различных клеточных популяций — нейронов, олигодендроцитов, астроцитов и др. Ранее опубликованные работы авторов статьи относятся к числу таких исследований и их можно считать во многом пионерскими. Данное исследование явилось логическим и необходимым продолжением проведенных ими изысканий, и его результаты имеют фундаментальное и прикладное значение.

Важно отметить, что изучены особенности пролиферации эмбриональных нейрокліток человека на разных этапах гестации (5–9 нед) в условиях культивирования и, что крайне важно, после пролиферации нейрокліток изучен их дифференцировочный потенциал под воздействием ряда специфических индукторов. Заслуживает внимания тот факт, что ретиноевая кислота имела особое значение и индуцировала дифференциацию нейрокліток-предшественниц преимущественно в нейрональном и менее — в глияльном направлении. Возможно, что для такого заключения недостаточно ориентироваться только на фибриллярный кислый протеин GFAP — маркер глиобластов, астроцитов, но следовало бы использовать в качестве показателя белок S-100 — специфический белок астроцитарной глии, повышение его уровня — это свидетельство активации глияльных клеток.

Проведено оригинальное, глубокое, хорошо организованное исследование. Получены новые результаты, отраженные в прекрасно представленном иллюстративном материале, которые уточняют и вносят новые положения в проблему эффективности применения клеточных технологий, демонстрируют ее зависимость от исходной технологии культивирования трансплантационного материала.

Нам представляется, что в дальнейшей разработке оптимальных условий культивирования нейрокліток эмбрионального мозга важное значение может иметь исследование уровня аутосенсibilизации эмбриональных нервных клеток, изначально подверженных влиянию низкой температуры (криоконсервация), протекторов, т.е. изменение метаболизма этих клеток (метаболический стресс?).

С учетом того, что использование эмбриональных тканей человека в клинической практике в ряде стран (в частности, в США) запрещено, в качестве дискуссионного предложения можно было бы поставить вопрос в проблеме клеточной терапии о преимуществах ксеноимплантации эмбриональных тканей по сравнению с аллотрансплантацией эмбриональных нервных тканей. При имплантации эмбриональных тканей человека подтвердить стерильность материала либо невозможно, либо крайне дорого (нужна проверка на наличие вирусов, их видов), хотя развитие некоторых вирусов требует генетической предрасположенности реципиента. В целом, можно говорить, что, независимо от условий культивирования нейрокліток эмбрионального мозга возможность заражения вирусом при аллотрансплантации значительно выше, чем при ксеноимплантации, поскольку большинство вирусов видоспецифичны. Даже принимая во внимание высокую изменчивость РНК-содержащих вирусов, требуется большое количество и видоизмененных вирусов, и контактов между донорами и реципиентами, чтобы заражение произошло, и вирус проявил себя как инфекционный агент (например, видоизмененный вирус птичьего гриппа вызвал пандемию в 20-е годы, следующая модификация этого вируса формируется в настоящее время).

*Т.М. Воробьева, проф., доктор биол. наук
зав. лабораторией нейрофизиологии и иммунологии
Института неврологии, психиатрии и наркологии АМН Украины*

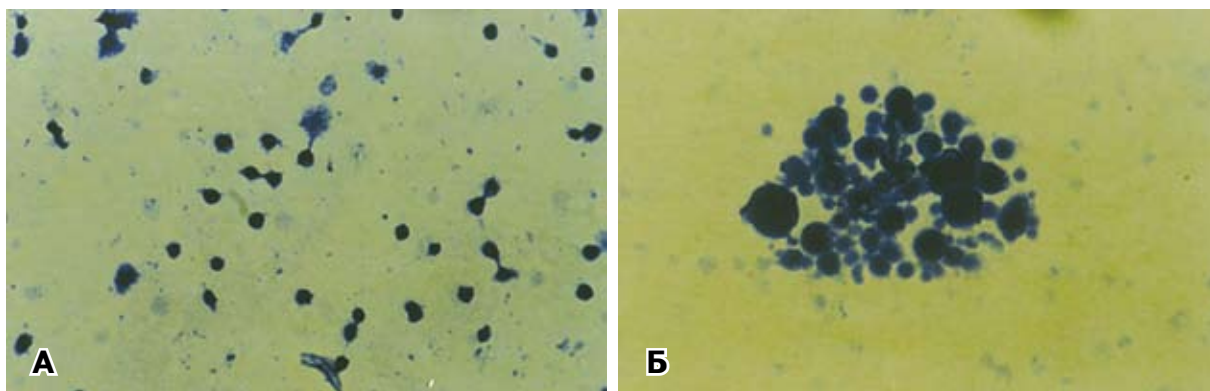


Рис. 1. Микрофото. Культура криоконсервированных ЭНК мозга человека 7–8 нед гестации. А — изолированные нейроциты; Б — кластеры нейроцитов. Окраска тионином. Ув.×800.

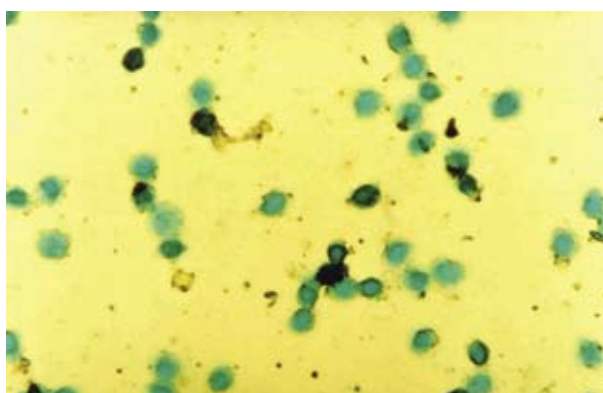


Рис. 2. Микрофото. Недифференцированные виментин-положительные ЭНК мозга человека (5 нед гестации) на 2-е сутки культивирования. Доокраска метиловым зеленым. Ув.×400.

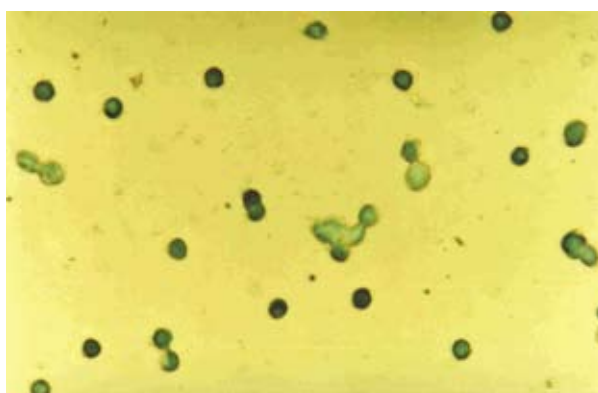


Рис. 3. Микрофото. Положительная реакция на GFAP в ЭНК мозга человека (5 нед гестации) на 9-е сутки культивирования в среде DMEM/F12. Доокраска метиловым зеленым. Ув.×400.

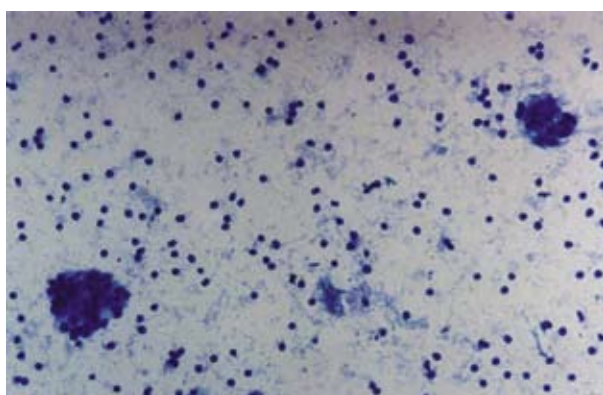


Рис. 4. Микрофото. «Нейросферы» в культуре ЭНК мозга человека (9 нед гестации) после культивирования в течение 21 сут в среде DMEM + 1% ФТС + ретинола ацетат (15-е сутки культивирования на подложке в среде DMEM + 1% ФТС). Окраска тионином. Ув.×400.

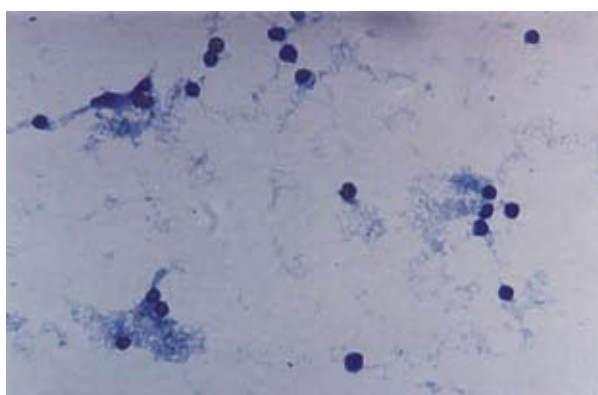


Рис. 5. Микрофото. Криоконсервированные нейроциты мозга человека 9 нед гестации (21 сут в среде DMEM + ретинола ацетат, затем в среде DMEM + ретиноевая кислота 2×10^{-6} моль/л), 14-е сутки культивирования. Окраска тионином. Ув.×800.