

Фундаментальні дослідження

УДК 612.646:612.82:612.014.3:57.082.15

Изучение индукции дифференцировки клеток, полученных из эмбрионального и постнатального мозга в условиях культивирования *in vitro*

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

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

Институт криобиологии и криомедицины АН Украины, г.Харьков, Украина

Исследовано влияние ряда биопрепаратов на цитоструктурные проявления нейрональной дифференцировки культивируемых нейральных предшественников, полученных из эмбрионального мозга крыс и криоконсервированных нейроклеток человека. Культивирование *in vitro* нейроклеток-предшественников в обедненной бессывороточной среде ДМЕМ с добавлением препарата инсулин-трансферрин-селенит не способствовало окончательной их дифференцировке. При сочетанном последовательном воздействии инсулина и ретинола ацетата на культуры нейроклеток происходит дифференцировка по нейрональному типу 8,5% клеток, тогда как культивирование с ретиноевой кислотой способствует увеличению количества клеток, дифференцирующихся по нейрональному типу, до 20–30 %. Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки-предшественники, выделенные в результате длительного культивирования в суспензии в обедненной среде ДМЕМ, сохраняют способность дифференцироваться в нейрональном направлении.

Ключевые слова: нейральные стволовые клетки, прогениторные клетки, дифференцировка, культивирование *in vitro*, суспензионная культура, ретинола ацетат, инсулин, ретиноевая кислота.

Вступление. Эмбриональная и постнатальная нервная ткани находят все большее применение в лечебных целях при различной церебральной патологии. В значительной степени это связано с тем, что эмбриональный мозг млекопитающих и человека I триместра беременности, в отличие от мозга взрослых особей, на 90% состоит из стволовых и прогениторных клеток [4]. Под воздействием специфических сигналов микроокружения нейральные стволовые клетки (НСК) способны генерировать все типы нейронов и клеток глии. В связи с этим в настоящее время в эксперименте интенсивно разрабатываются методы направленной специфической дифференцировки НСК с целью накопления специализированных клеточных фракций для заместительной клеточной терапии при различных видах патологии нервной системы.

При этом особенно важное значение приобретает поиск рациональных методов нейрональной дифференцировки, так как достаточный объем фракции дифференцированных нейронов, наработанных *in vitro*, является необходимым условием эффективности нейротрансплантации при дегенеративных заболеваниях мозга.

Известны различные способы получения нейрональных клонов из НСК в условиях куль-

тивирования [3,5,7]: блокирование их пролиферации путем удаления сыворотки и ростовых факторов (FGF-2 и EGF) из питательной среды; добавление специфических индукторов нейрональной цитодифференцировки (ретиноевая кислота, инсулин и др.). Создание условий для прикрепления НСК к адгезивному субстрату в бессывороточной среде способствует цитодифференцировке НСК в нейробласты, что сопровождается образованием конусовидных отростков и межклеточных контактов.

Поддержание контакта типа клетка-клетка на протяжении стадии дифференцировки с добавлением ростовых факторов увеличивает количество генерированных нейронов в бессывороточной среде от 8 до >60%. Выживанию нейронов способствуют нейротрофические факторы NT3, NT4 и PDGF. Удаление сыворотки или EGF из культуральной среды приводит к генерации большого количества нейронов [12]. Ретиноевая кислота и фактор роста нервов-β усиливают нейрональную дифференцировку и экспрессию нейронспецифических молекул [11]. Экзогенный инсулин значительно увеличивает число зрелых нейронов, способствуя распределению нейрофиламентов в цитоплазме и росту аксонов [10].

Цель работы: исследовать влияние ряда биопрепаратов на цитоструктурные проявления нейрональной дифференцировки культивируемых НСК, полученных из эмбрионального мозга крыс и криоконсервированных нейроклеток человека. В качестве индукторов возможной нейрональной дифференцировки НСК использовали препараты инсулин-трансферрин-селенит (ИТС) (PanEco Ltd., Россия), ретинола ацетат (Киевский витаминный завод), фетальную телячью сыворотку (ФТС) (Киевский завод витаминных препаратов), ретиноевую кислоту (Sigma, Германия).

Материалы и методы. Материалом для исследования служили клетки головного мозга эмбрионов крыс (18–20-й день гестации) и криоконсервированные нейроклетки человека (7–9-я неделя гестации), полученные из низкотемпературного банка клеток Института криобиологии и криомедицины АН Украины (г.Харьков). Кроме того, использовали клетки головного мозга новорожденных крыс (1-го дня).

Получение суспензионных культур клеток-предшественников осуществляли по ранее описанной методике [2]. Эмбрионы крыс извлекали под тиопенталовым наркозом. Полушария мозга в стерильных условиях переносили в раствор СМФ или изотонический раствор натрия хлорида, освобождали от оболочек, иссекали паравентрикулярную область (либо область стриатума). Фрагменты ткани переносили в среду ДМЕМ и суспендировали шприцем с толстой иглой. Суспензию отстаивали 3 мин и надсадочную суспензию переносили в стеклянные флаконы и чашки Петри. Каждых 3 дня половина культуральной среды обновлялась. Таким же образом обрабатывали фрагменты мозга новорожденных крыс.

Запечатанные контейнеры с криоконсервированными нейроклетками извлекали из жидкого азота, помещали в водяную баню для оттаивания при 38–40°C. Затем клетки переносили в стеклянные флаконы в среду ДМЕМ. Каждых 3 дня половина культуральной среды обновлялась.

Культивирование клеток-предшественников на подложке. Кластеры НСК через 7 (14–30) дней культивирования в суспензии переносили пипетированием в пробирки, центрифугировали 3 мин при 1000 об/мин, осадок ресуспендировали в среде ДМЕМ и переносили в чашки Петри со стеклами, покрытыми полиэтиленгликолем. Каждых 3 дня половина культуральной среды ДМЕМ обновлялась. Культуры содержались в CO₂-инкубаторе при постоянной температуре, влажности и газовом составе. Живые культуры наблюдали под инвертированным микроскопом.

Изучение возможности дифференцировки предшественников нервных клеток проводили при культивировании клеток на подложке в чашках Петри в среде ДМЕМ и при добавлении в культуральную среду: а) препарата ИТС, содержащего 0,05 мг/мл инсулина, 0,0275 мг/мл трансферрина, 0,0335 мг/мл селенита; б) ретинола ацетата 0,2 мг/мл; в) ФТС 1%; г) ретиноевой кислоты $2 \cdot 10^{-6}$ ммоль/л.

По окончании культивирования на покровных стеклах культуры клеток фиксировали формальдегидом, окрашивали тионином или по Романовскому-Гимзе. Цитологические препараты заключали в глицерин и исследовали в цитоанализаторе изображения "IBAS-2000" (Германия) с последующей фоторегистрацией. В каждом варианте культур НСК на подложке опытные культуры сравнивали с контрольными, в которые вышеперечисленные факторы не добавляли.

Результаты и обсуждение. Изучение динамики суспензионных культур клеток-предшественников из головного мозга эмбрионов крыс и человека показало, что при их длительном культивировании *in vitro* в обедненной бессывороточной среде ДМЕМ происходит снижение количества клеток до 7–9 сут культивирования. Затем отмечается стабилизация количества клеток в течение 10–12 сут, что согласуется с полученными нами ранее данными [2], и, на наш взгляд, свидетельствует о наличии в суспензионной культуре длительноживущей популяции нейральных стволовых клеток.

Изучение контрольных культур НСК из всех вариантов опытов, наблюдавшихся прижизненно в инвертированном микроскопе и изученных на цитологических препаратах, показало, что, начиная с 1-х суток культивирования, определялось массовое прикрепление к субстрату округленных клеток, располагавшихся на подложке в основном изолированно. Лишь местами среди них обнаруживали небольшие колонии. На протяжении всего периода наблюдения культур (до 22 сут) такие клетки сохраняли ошаренную форму без видимых признаков дифференцировки (рис.1 цветной вкладки).

При цитологическом анализе клеточного состава нейроклеток, культивированных в присутствии различных факторов, использованных в качестве возможных индукторов нейродифференцировки, в разных вариантах опытов получены следующие результаты.

В культурах криоконсервированных нейроклеток человека, культивируемых на протяжении 21 сут в питательной среде с добавлением 1% ФТС и ретинола ацетата, а затем перенесенных на подложку, на 15-е сутки культивирования преобладали изолированно распо-

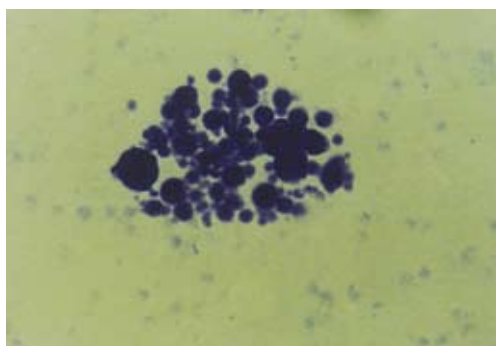


Рис.1. Культура криоконсервированных нейроцитов человека (7-8 нед гестации). Пояснения в тексте. Окраска тионином. $\times 800$

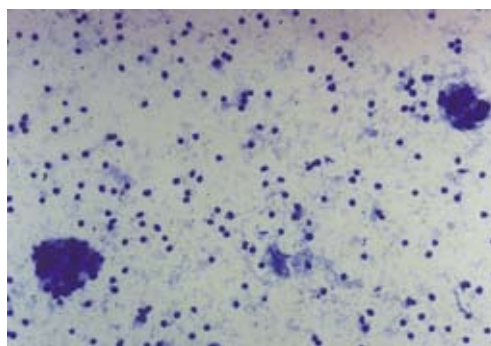


Рис.2. Культура криоконсервированных нейроцитов человека 9-й нед гестации (после 21-дневного культивирования в среде ДМЕМ + 1% ФТС + ретинола ацетат, 15 сут культивирования на подложке в среде ДМЕМ + 1% ФТС). Пояснения в тексте. Окраска тионином. $\times 400$

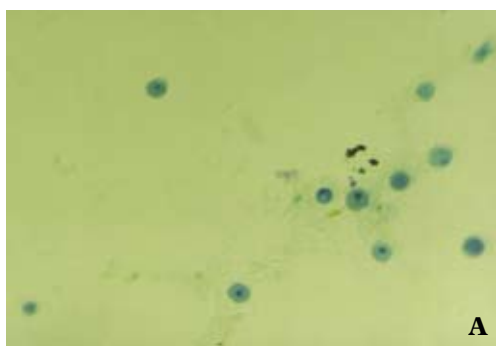


Рис.3. Нейроциты головного мозга эмбрионов крыс, 13 сут культивирования (среда ДМЕМ+инсулин). Пояснения в тексте. Окраска тионином.

А — молодые нейробласты с ядрами округлой формы, содержащими крупные ядрышки. $\times 800$;

Б — та же культура. Комплекс нейроцитов с появлением коротких конусовидных отростков. $\times 400$



Рис.4. Нейроциты головного мозга новорожденной крысы, 16 сут культивирования (среда ДМЕМ+инсулин, затем ДМЕМ+ретинола ацетат). Пояснения в тексте. Окраска тионином. $\times 400$

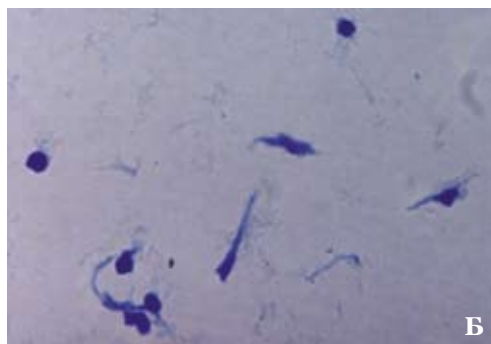
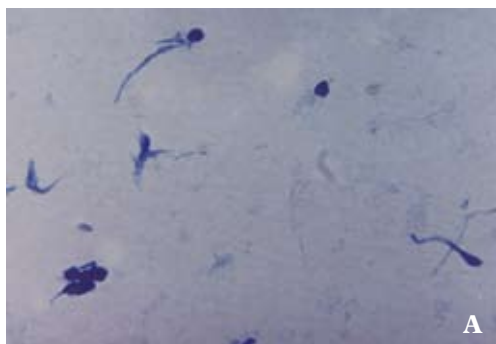


Рис.5. Криоконсервированные нейроциты человека 9 нед гестации (21 сут в среде ДМЕМ+ретинола ацетат, затем ДМЕМ+ретиноевая кислота ($2 \cdot 10^{-6}$ ммол/л), 10-е сут культивирования). Пояснения в тексте. Окраска тионином.

А — отростчатые типы нейроцитов. $\times 800$;

Б — та же культура. Различные формы отростчатых нейроцитов. $\times 800$

женные округленные безотростчатые клетки с интенсивным окрашиванием ядер и узкой цитоплазмой. Лишь в отдельных нейроклетках намечалось появление конусовидного выпячивания одного из полюсов цитоплазмы без образования убедительного отростка. В то же время в этих культурах наблюдалось формирование многоклеточных шаровидных агрегатов, описываемых в литературе как нейросферы (рис.2 цветной вкладки).

В опытах по изучению характера воздействия инсулина на НСК использовали суспензионные культуры эмбриональных нейроклеток, которые после 7-дневного культивирования в среде ДМЕМ+инсулин пересевали на подложку в среду такого же состава. После 13-дневного наблюдения культуры зафиксировали и окрасили тионином. На цитологических препаратах этих культур на фоне преобладания недифференцированных округленных клеток обнаружили появление клеток угловатой формы с обильной гранулированной цитоплазмой. Ядра таких клеток были светлые, имели округлую форму и содержали крупные ядрышки, характерные для молодых нейробластов. Местами в таких культурах определялись комплексы нейроклеток угловатой формы с короткими конусовидными отростками (рис.3 (А, Б) цветной вкладки).

В серии опытов при сочетанном последовательном воздействии инсулина и ретинола ацетата на культуры нейроклеток, полученных из неонатального мозга крыс, через 15 сут наблюдения на цитолитических препаратах обнаружили униполярные клетки грушевидной формы с короткими конусовидными отростками. Местами такие клетки формировали небольшие комплексы в связи с образованием межклеточных контактов (рис.4 цветной вкладки). Доля таких клеток составляла 8,5%.

В одной из серий наших экспериментов мы провели изучение возможности нейродифференцировки криоконсервированных нейроклеток человека (9 нед гестации) при воздействии ретиноевой кислоты. Ретиноевую кислоту ($2 \cdot 10^{-6}$ ммоль/л) добавляли в культуры после их предшествующего 21-суточного культивирования в среде ДМЕМ+ретинола ацетат и пересева на подложку. Через 14 сут культивирования в присутствии ретиноевой кислоты на цитологических препаратах среди округленных недифференцированных клеток обнаруживали отростчатые клетки с обильной цитоплазмой и наличием отростков. Протяженность отростков варьировала от коротких конусовидных до длинных, хорошо выраженных, иногда с признаками намечавшегося разветвления на конце. Помимо этого в клетках угловатой формы выявляли четко выраженные крупные ядрышки,

характерные для нейробластных форм (рис. 5,6 цветной вкладки). На 10–14 сут культивирования нейроклеток в среде ДМЕМ с добавлением ретиноевой кислоты количество таких клеток достигало 20–30%.

Результаты проведенных экспериментов показали, что нейроклетки различного происхождения в условиях длительного культивирования в присутствии тестированных факторов (ретинола ацетат, инсулин, ретиноевая кислота), известных как индукторы специфической дифференцировки, проявляют различную выраженность ответа на воздействие каждого из них или на последовательное их воздействие.

Так, присутствие ретинола ацетата в питательной среде культур эмбриональных нейроклеток человека индуцирует формирование многоклеточных нейросфер при появлении начальной стадии намечающегося образования отростков лишь в небольшой части клеток. Как известно [9], нейросферы образуются из недифференцированных нейральных предшественников при их пролиферации в бессывороточной среде в присутствии митогенов.

Воздействие инсулина на эмбриональные нейроклетки в длительной культуре вызывает появление более выраженных признаков дифференцировки клеток по нейробластному типу. В таких культурах клетки приобретают угловатую форму, заметно увеличивается объем их цитоплазмы, в ядрах клеток прослеживаются хорошо сформированные ядрышки, характерные для нейробластов.

Присутствие инсулина, а затем ретинола ацетата в среде культивирования нейроклеток из неонатального мозга крыс индуцирует более выраженную стадию дифференцировочного процесса: появление клеток с короткими отростками и формирование межклеточных контактов. Доля таких клеток составляет 8,5%.

Воздействие ретиноевой кислоты на культуры эмбриональных нейроклеток дает наиболее выраженный эффект на признаки цитотипической дифференцировки в нейрональном направлении. При этом доля таких клеток достигает 20–30%. Это согласуется с существующим представлением о том, что ретиноевая кислота в узком диапазоне доз индуцирует нейрогенез в культурах линий эмбриональных стволовых клеток [6,8].

На основании полученных данных можно заключить, что под воздействием индуктора дифференцировки нейронального ряда ретиноевой кислоты значительно большее количество клеток-предшественников (НСК) подвергается процессам дифференцировки по нейрональному пути, нежели под воздействием других факторов (инсулина, ретинола ацетата). Полученные

нами данные подтверждают известные факты о том, что ретинол необходим для роста, дифференцировки и сохранения клеточных функций, а также для их размножения, тогда как ретиноевая кислота необходима для клеточной дифференцировки и в 10 раз активнее ретинола, но менее активна в отношении процессов пролиферации.

Кроме того, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что клетки-предшественники, полученные в результате длительного культивирования в бессывороточной среде по описанной ранее методике [1], сохраняют способность к дифференцировке в нейрональном направлении *in vitro*.

Полученные результаты согласуются также с известными данными коллектива авторов [3] о том, что при культивировании клеток мозга, полученных от 8–12-недельных плодов человека, в селективной бессывороточной среде количество клеток уменьшается в течение 1-й недели культивирования, а после добавления стандартного препарата ростовых факторов (включающего hFGF, hEGF, NSF-1) восстанавливается до исходного уровня при сохранении жизнеспособности и способности дифференцироваться в нейрональные клетки.

Выводы. 1. Культивирование *in vitro* нейро-клеток-предшественников в обедненной бессывороточной среде ДМЕМ с добавлением препарата ИТС способствует формированию кластеров недифференцированных НСК на 7–14-е сутки в культуре.

2. При сочетанном последовательном воздействии инсулина и ретинола ацетата на культуры нейроцитов происходит дифференцировка по нейрональному типу 8,5% клеток.

3. Культивирование с ретиноевой кислотой способствует увеличению количества клеток, дифференцирующихся по нейрональному типу, до 20–30 %.

4. Клетки-предшественники, полученные в результате длительного культивирования в суспензии в обедненной среде ДМЕМ, сохраняют способность дифференцироваться по нейрональному пути.

Список литературы

1. Анализ развития стволовых нейральных клеток человека *in vitro* / Полтавцева Р.А., Марей М.В., Дубровина И.В. и др. // Цитология. Cytology.— 2001. — Т.43, № 9. — С.884–885.
2. Длительное культивирование *in vitro* криоконсервированных и нативных нейроцитов эмбрионов человека / Зозуля Ю.А., Лисянский Н.И., Любич Л.Д., Грищенко В.И. и др. // Укр. Нейрохірург. журн. — 2003. — № 2. — С.11–14.
3. Морфологические аспекты дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в культуре / Гордеева О.Ф., Мануилова Е.С., Гуляева Д.В. и др. // Цитология. Cytology. — 2001. — Т.43, № 9. — С.851.
4. Сухих Г.Т. Трансплантация фетальных клеток в медицине: настоящее и будущее // Бюлэксперим. биолмед. — 1998. — Т.126, приложение 1. — С.3–13.
5. Barami K., Zhao J., Diaz F.G., Lyman W.D. Cjmparison of neural precursor cell fate in second trimester human brain and spinal cord // *Neurol. Res.* — 2000. — V.2, N2-3. — P.260–266.
6. 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.
7. 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.
8. Liu S, Qu Y, Steward T, Howqrd M. et al Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2000. — V.97. — P.6126–6131.
9. Morrison S.J., Shah N.M., Anderson D.J. Regulatory mechanism in stem-like cell biology // *Cell.* — 1997. — V.88. — P.287–298.
10. Schechter R., Abboud M. Neuronal synthesized insulin roles on neural differentiation within fetal rat neuron cell cultures // *Brain Res.* — 2001. — V.127, N1. — P.41–49.
11. 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.
12. 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.

Вивчення індукції диференціювання клітин, отриманих з ембріонального та постнатального мозку в умовах культивування *in vitro*

Семенова В.М., Лисяний М.І., Любич Л.Д.,
Петренко А.Ю., Стайно Л.П.

Досліджено вплив ряду біопрепаратів на цитоструктурні прояви нейронального диференціювання культивованих нейральних попередників, отриманих з ембріонального мозку щурів та криоконсервованих нейроклітин людини. Культивування *in vitro* нейроклітин-попередників у збідненому безсироватковому середовищі DMEM із додаванням препарату інсулін-трансферин-селеніт не сприяло їх термінальному диференціюванню. При сполученій послідовній дії інсуліну та ретинола ацетату на культури нейроклітин відбувається диференціювання за нейрональним типом 8,5% клітин, тоді як культивування з ретиноєвою кислотою сприяє збільшенню кількості клітин, що диференціюються за нейрональним типом, до 20-30 %. Отримані результати свідчать про те, що клітини-попередники, одержані при тривалому культивуванні в суспензії у збідненому середовищі DMEM, зберігають здатність диференціюватись у нейрональному напрямку.

In vitro study of differentiation of cells derived from embryonal and postnatal brain

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

The influence of the range of biopreparats on the neuronal differentiation cytostructural peculiarities of the cultivated neural precursors derived from rats' embryonal brain and human cryopreserved neurocells was studied. The cultivation *in vitro* of neuronal precursors in DMEM without serum with addition of insulin-transferrin-selenit didn't lead to their terminal differentiation. Under consequentional co-influence of insulin and retinolacetate on the neural cell cultures about 8,5% of cells undergo the neuronal differentiation, while cultivation with retinoic acid stimulate the growth of number of differentiated cells to 20-30%. The obtained results evidence for the saved capacity of neuronal differentiation of cell precursors derived after long-term cultivation in suspension in DMEM.

Коментар

до статті Семенової В.М., Лисяного Н.И., Любич Л.Д., Петренко А.Ю., Стайно Л.П. "Изучение индукции дифференцировки клеток, полученных из эмбрионального постнатального мозга в условиях культивирования *in vitro*"

Останнє десятиліття ХХ сторіччя і перші роки ХХІ сторіччя характеризуються бурхливим розвитком біотехнологій, особливо тих розділів, які пов'язані із стовбуровими клітинами та генетикою.

По суті майже увесь науковий світ зараз працює із стовбуровими клітинами, на які покладають величезні надії не тільки в лікуванні цілого ряду невиліковних захворювань, а навіть на омолодження і продовження строків і якості життя. Але для цього необхідно досконало знати біологію стовбурової клітини, що не просто. Ця біологія в справжній формі виглядає як етапи: проліферація стовбурової клітини, міграція її в ту зону, де вона найбільш необхідна, диференціювання її в ті клітини чи тканини, які потребують розвитку або ремонту (відновлення) і відповідно виживання в тому середовищі, де вона опинилась. Всі ці етапи дуже складні і небезпечні для стовбурової клітини. Вони регулюються цілим комплексом як внутрішніх, так і зовнішніх факторів мікрооточення. При невідповідності цих факторів стовбурова клітина може або загинути, або розвиватися не в тому напрямку, який потрібен в даний момент даному організму.

І, звичайно, для того, щоб керувати стовбуровими клітинами, необхідно вивчати всі ці фактори.

Природа подарувала людське природне джерело стовбурових клітин — ембріональні тканини. Чим вони молодші, тим більше в них стовбурових клітин і тим вища їх потентність.

Зрозуміло, що у людей отримання ембріональних клітин та тканин тягне за собою цілу низку морально-етичних проблем, але робота в експерименті зі щурами суттєво зменшує цю кількість проблем.

Автори роботи поставили перед собою завдання відпрацювати на культурі тканин третю ланку розвитку стовбурових клітин — диференціацію, яка дуже важлива для отримання певного виду нервових клітин (нейронів чи глії), які в подальшому можуть використовуватися для лікування певних видів патології нервової системи.

В умовах довготривалого культивування автори дослідили можливості диференціювання клітин ембріонального мозку щурів та людини під впливом деяких факторів (ретинол ацетат, інсулін, ретиноєва кислота), відомих як специфічні індуктори диференціювання нейронального напрямку. У роботі показано, що присутність ретинола ацетата у поживному середовищі культивованих ембріональних нейроклітин індукує формування чисельних нейросфер, що відображає стадію проліферації. Вплив інсулін-трансферин-селетіта на культивовані ембріональні нейроклітини обумовлює появу ознак нейробластного розвитку. Для ретиноєвої кислоти викликає найбільш виражений ефект цитотинної диференціації ембріональних клітин у нейрональному напрямку.

Таким чином, авторами отримані цікаві дані, які показують, що ретинол ацетат більш потрібний для розмноження ембріональних нейроклітин, в той час як ретиноєва кислота стимулює появу ознак цитотинного диференціювання 20—30% культивованих клітин у нейрональному напрямку, вона у 10 разів активніша від ретинола ацетата.

Ця робота підсумовує певний етап тих досліджень, які розробляються в Інституті нейрохірургії в галузі вивчення біології нейрональних стовбурових клітин.

Член-кор. АМН України, професор В.І.Цимбалюк,
науковий керівник клініки Відновлювальної нейрохірургії,
заступник директора з наукової роботи
Інституту нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова АМН України