

ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ДОФАМІНЕРГІЧНИХ НЕЙРОНІВ З ЕМБРІОНАЛЬНИХ НЕРВОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ В КУЛЬТУРІ



*Досліджували можливості дофамінергічного диференціювання ембріональної нервової тканини людини в культурі з метою отримання для нейротрансплантації клітинного матеріалу, збагаченого детермінованими клітинами – попередниками дофамінергічних нейронів. За період культивування чисельність дофамінергічних нейронів вірогідно збільшувалася за час культивування з $5,6 \pm 4,3$ % клітин в полі зору до $23,5 \pm 2,6$ %, в той же час у контрольних зразках їх концентрація становила $8,1 \pm 6,5$ % клітин. Аналіз експресії генів, пов'язаних з даним типом нейронального диференціювання, підтвердив його дофамінергічну направленість. Нами було показано, що впродовж періоду культивування зникає експресія ранніх факторів транскрипції *Nurr1* та *Lmx1b* і в той же час зростає рівень експресії *TH*. Таким чином, використання спеціальних умов культивування дозволяє отримати клітинний матеріал, збагачений попередниками дофамінергічних нейронів.*

Вступ. Клітинна терапія з використанням спеціалізованих клітин, зокрема дофамінергічних нейронів, є одним із нових, перспективних засобів лікування хвороби Паркінсона та інших захворювань нервової системи, пов'язаних з патологіями катехоламінергічних провідних шляхів головного мозку. У зв'язку з цим все більшу актуальність набуває пошук джерел даних клітин та факторів, що впливають на їх диференціювання. Перспективним потенціальним джерелом є ембріональні нервові стовбурові клітини.

Багатьма авторами в наукових публікаціях останніх років (1999–2007 рр.) показано, що 25–50 % всіх ембріональних та фетальних клітин, які експресують ранні нейрональні маркери, здатні диференціюватися в дофамінергічні нейрони. Це доведено по наявності в них позитивної імунореактивності до тирозингідроксилази, позитивним результатом РТ-ПЛР на мРНК тирозингідроксилази, кількісним вимірюванням рівня дофаміну та його метаболіту DOPAC в культуральному матеріалі методом ВЕРХ [1–4]. Вирощені в культурі клітини, пересажені щурам після моделювання паркінсонізму, приживаються в стріатумі і сприяють відновленню ушкоджених функцій [5].

Таким чином, нарощування в культурі дофамінергічних нейронів з ембріонального матеріалу може стати постійним джерелом біологічно чистого, функціонально активного матеріалу для нейротрансплантації.

Матеріали та методи. В роботі використовували солі та розчинники кваліфікацій ХЧ та ЧДА, Хенкса (Біо-Тест-Лабораторія, Україна), середовище Ігла (Інститут поліомієліту та вірусних енцефалітів, Росія), сироватку великої рогатої худоби (Конотопм'ясо, Україна), фактор росту фібробластів (FGF) («Sigma», США), дофамін («Sigma», США), нейротрофічний фактор мозкового походження (BDNF) («Sigma», США), гліоксилову кислоту («Janssen Chemica», Бельгія), параформальдегід («Janssen Chemica», Бельгія), барвник трипановий синій («Janssen Chemica», Бельгія). Для аналізу препаратів та фотографування використовували систему аналізу зображення IBAS-2000.

Забір абортивного матеріалу здійснювали на підставі договору № 17 від 1.01.2005 р. між Інститутом нейрохірургії АМН України та Київською міською клінічною лікарнею № 16. Для культивування в стерильних умовах виді-

ляли мезенцефалон головного мозку ембріонів людини 9–10 тиж гестації, промивали стерильним фізіологічним розчином, звільняли від оболонки. Тканину суспендували у розчині Хенкса шляхом піпетування, доводили концентрацію клітин до $1-3 \cdot 10^6$ в 1 мл. Суспензію розливали у стерильні чашки Петрі на скельця, вкриті поліетиленіміном. Культивування проводили на середовищі Ігла з додаванням сироватки великої рогатої худоби в інкубаторі при 37°C та $5\% \text{CO}_2$.

Культивування підрозділялося на два етапи. На першому етапі у живильне середовище додавали bFGF та термоінактивовану сироватку. На другому етапі для стимуляції диференціювання середовище збагачували BDNF та дофаміном [6]. Загальну кількість та чисельність живих клітин підраховували з допомогою гемоцитометра.

Гістофлуоресцентне виявлення катехоламінів здійснювали за методом Фалька-Хіларпа [7]. Препарати досліджували під флуоресцентним мікроскопом системи IBAS.

Екстракцію РНК проводили фенольним методом у присутності детергентів та інгібіторів нуклеаз. ПЛР-реакція була виконана за рекомендаціями Zeng et al. [8] з використанням відповідних праймерів.

Результати досліджень та їх обговорення. Відомо, що диференціювання клітинних типів є результатом взаємодії внутрішньої генетичної і зовнішньої позиційної інформації, яка проявляється в наявності або відсутності тих чи інших морфогенів. Детермінованими попередниками дофамінергічних нейронів вважають клітини, які виявляють позитивну імунореактивність до тирозингідроксилази (ТГ) [9]. Перші ТГ-позитивні клітини з'являються у вентральному мезенцефалоні ембріону людини поблизу вентрикулярної зони на 5-му тижні гестації [9]. На 7–10-му тижні ембріогенезу в зоні вен-

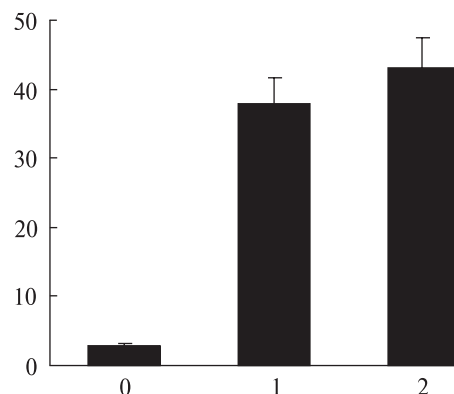


Рис. 1. Динаміка зростання загальної кількості нервових клітин мезенцефалону ембріону людини 10 тиж гестації в суспензійній культурі впродовж 2 тиж культивування: по вертикалі – 10^6 клітин/мл; по горизонталі – строки культивування, тиж

трального мезенцефалона починають синтезуватися катехоламіни. Найбільш інформаційно важливими молекулами в онтогенезі дофамінергічних нейронів вважають GDNF та BDNF [1, 10].

Встановлено, що BDNF і GDNF запобігають програмою загибелі клітин – попередників нейрогенезу і зрілих дофамінергічних нейронів [2, 11]. Нейропротекторна антиапоптична активність BDNF здійснюється через систему сигналів, що запускаються після активації тирозинкінази B. При цьому існує зворотна регуляція між експресією BDNF та активацією дофамінових рецепторів.

Промотор III гена BDNF має цАМФ-чутливі елементи, що відповідають на сигнали, які виникають у відповідь на зв'язування дофаміну з рецепторами класу D1 [12]. Отже при наявності дофаміну в нервових клітинах починається синтез BDNF і, навпаки, BDNF сприяє синтезу дофаміну, запобігаючи програмою загибелі клітин-попередників, що дозволяє їм диференціюватися. Ця система є складовою

Кількісна оцінка експресії генів Lmx1b, Nurr1, ТГ в культурі клітин ембріональної нервової тканини людини

Диференціювання	Lmx1b	Nurr 1	ТГ
	у.о./млн клітин		
Контроль	29 256 738 ± 5 755 517	3 923 792 ± 647 296	0
Спрямоване	0	0	594 974 ± 138 216
Спонтанне	0	0	400 682 ± 104 231

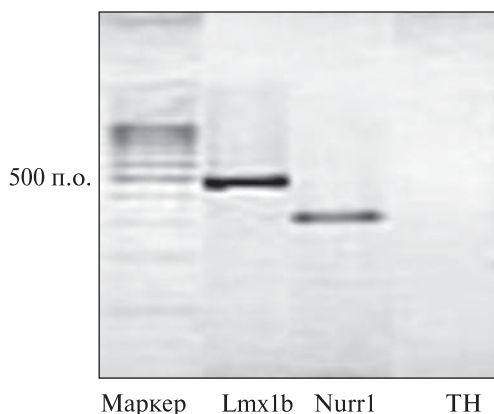


Рис. 5. Експресія генів Lmx1b, Nurr1, TH в клітинах ембріонального мозку людини 10 тиж гестації

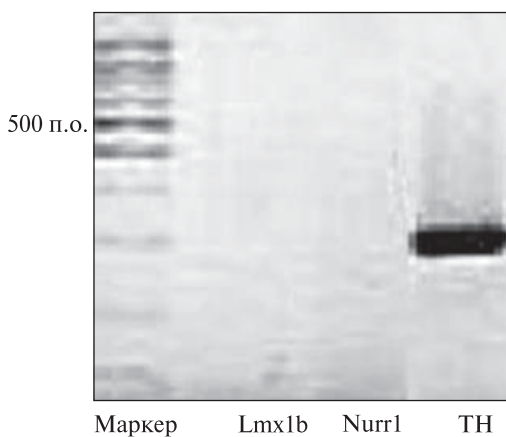


Рис. 6. Експресія генів Lmx1b, Nurr1, TH в клітинах ембріонального мозку людини 10 тиж гестації після 2 тиж культивування в середовищі з додаванням BDNF та дофаміну

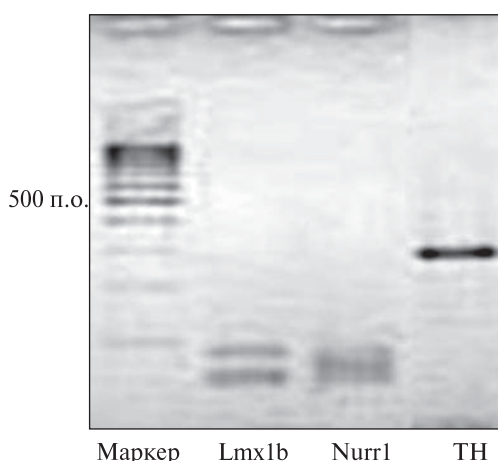


Рис. 7. Експресія генів Lmx1b, Nurr1, TH в клітинах ембріонального мозку людини 10 тиж гестації після 2 тиж культивування

частиною регуляції чисельності дофамінергічних нейронів і виникнення нейромедіаторних провідних шляхів в онтогенезі [13–15].

Показано, що диференціюючий вплив молекул-індукторів на клітини-попередники реалізується шляхом стимуляції експресії специфічних для дофамінергічного типу факторів транскрипції – продуктів генів Nurr1 (nuclear hormone receptor), Ptx3 (biocoid-related homeobox factor), Lmx1b (LIM-homeodomain transcription factor) [8, 16].

Встановлено, що у формуванні зрілої дофамінергічної системи середнього мозку приймають участь два каскади генів. Lmx1b та Ptx3 належать до одного каскаду і активуються послідовно. Представником іншого каскаду генів є транскрипційний фактор Nurr1, який належить до надродини ядерних гормональних рецепторів NR [17–19]. Роль Nurr1 в онтогенезі нервової системи полягає у тому, що цей ген разом з Ptx3 здійснює кінцеве дозрівання дофамінергічних нейронів – регулює експресію тирозингідроксилази [20].

Метою нашої роботи було дослідити можливості направленого дофамінергічного диференціювання ембріональної нервової тканини людини в культурі з метою отримання для трансплантації клітинного матеріалу, збагаченого детермінованими клітинами – попередниками дофамінергічних нейронів. На першому етапі культивування відбувалася стимуляція розмноження недиференційованих клітин-попередників мезенцефалона ембріона людини, для чого використовувалися фактор-мітоген bFGF та живильне середовище, у якому відсутні агенти спонтанного диференціювання. На другому етапі здійснювалася направлена стимуляція диференціювання нейробластів по дофамінергічному шляху. Для цього середовище замінювали та піддавали клітини впливу BDNF у присутності дофаміну.

Отримані нами результати підтверджують можливість збільшення числа дофамінергічних нейронів в ембріональній нервовій тканині людини під час культивування. За перший тиждень загальна чисельність клітин мезенцефалона людини збільшувалася в різних серіях дослідів у 12–13 разів (рис. 1). Літературні дані свідчать, що під впливом bFGF відбувається активний поділ стовбурових нейрональних клітин [21].

В суспензійній культурі формуються і збільшуються клітинні агрегати, що складаються з дрібних клітин без відростків. Після заміни живильного середовища на суміш для диференціювання темпи зростання чисельності клітинної популяції різко зменшуються. Кінцева концентрація клітин перевищує висхідну у 15–16 разів (рис. 1). Цитоплазма клітин значно збільшується, вони встановлюють контакти між собою.

Чисельність ТГ-позитивних клітин в дисоційованій культурі мезенцефалона ембріонів людини на 7–10-й день культивування становить 1–6 % їх загальної чисельності [9, 12]. На препаратах наших культур, забарвлених за гістофлуоресцентною методикою Фалька-Хілларпа, під впливом BDNF та інших складових поживного середовища чисельність клітин, що містили флуоресцентні гранули, вірогідно збільшувалася за час культивування з $5,6 \pm 4,3$ % клітин в полі зору до $23,5 \pm 2,6$ % (рис. 2 і 3, див. вклейку в кінці номера).

Флуоресцентні гранули спостерігалися не лише в цитоплазмі клітин, але подекуди переходили у відростки, що формують систему зв'язків між клітинами (рис. 4, див. вклейку в кінці номера). Отже, вирощені в культурі клітини здатні встановлювати контакти за участю нейромедіаторів.

Слід зазначити, що в контрольних зразках, які зростали впродовж того ж самого часу на середовищі стандартного складу, чисельність клітин з флуоресцентними гранулами в цитоплазмі збільшувалася до $8,1 \pm 6,5$ % клітин в полі зору.

Такі дані свідчать про те, що спонтанне диференціювання по дофамінергічному шляху також має місце, але при цьому кількість дофамінергічних клітин значно менше.

Дані, отримані з допомогою РТ-ПЦР, підтверджують результати аналізу препаратів. Кількісна оцінка отриманих даних наведена в таблиці.

Аналіз експресії генів *Lmx1b*, *Nurr1*, ТГ показав, що ембріональні нервові клітини середнього мозку ембріонів людини 9–10 тиж гестації експресують *Lmx1b* та *Nurr1* (таблиця, рис. 5), що узгоджується з даними літератури про появу одиничних ТГ-позитивних клітин та початок синтезу катехоламінів на цих строках ембріогенезу [22]. При цьому експресія самої

тирозингідроксилази відсутня або дуже слабка і знаходиться поза межами вимірювання.

Генетичний аналіз зразків після культивування чітко показав, що в умовах *in vitro* виникає експресія тирозингідроксилази, а експресія *Lmx1b* та *Nurr1* зникає (таблиця, рис. 6). Це однозначно свідчить про те, що клітини-попередники в культурі диференціювалися в дофамінергічні нейрони, і підтверджує наші дані, отримані методом гістофлуоресцентного виявлення катехоламінів, про збільшення їх чисельності.

Слід зазначити, що активація експресії тирозингідроксилази відбувається як в разі направленого диференціювання під впливом BDNF та дофаміну, так і спонтанно у культуральному середовищі стандартного складу, але у першому випадку дещо інтенсивніше, хоча збільшення і не є статистично вірогідним (таблиця, рис. 7).

Отже, виходячи з отриманих даних, ми можемо зробити висновок про те, що диференціювання ембріональних нейробластів людини в культурі за дофамінергічним типом відбувається шляхом активації тих же самих генетичних механізмів, що і в умовах *in vivo*. Цей висновок свідчить на користь можливого використання ембріональних нервових клітин людини, що підлягали диференціюванню в культурі, як матеріалу для нейротрансплантації.

V.I. Tsymbaluk, I.G. Vasilyeva, N.P. Olexenko,
N.G. Chopic, O.I. Tsybko, E.S. Galanta

DOFAMINERGIC CELL DIFFERENTIATION FROM THE HUMAN EMBRYONAL NERVE CELLS IN VITRO

The aim of our experiments was to determine the dopaminergic differentiation potential of human embryonic nerve tissue in culture to obtain cell material for neurotransplantation enriched with determinative dopaminergic cells precursors. During the period of culturing their amount in the experimental samples reliable increased from $5,6 \pm 4,3$ % dopaminergic neurons cells in the field of vision to $23,5 \pm 2,6$ %. At the same time in the control samples their concentration was $8,1 \pm 6,5$ % cells in the field of vision. Dopaminergic differentiation was confirmed by expression analyses of genes associated with this type of neuronal differentiation. We have demonstrated that during the period of culture expression of early transcription factors – *Nurr1* and *Lmx1b* disappears while TH expression

level increases. So, using specific culture condition the cell material for neurotransplantation enriched by dopaminergic neuron precursors can be obtained.

В.И. Цымбалюк, И.Г. Васильева, Н.П. Олексенко,
Н.Г. Чопик, О.И. Цюбко, Е.С. Галанта

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ
НЕЙРОНОВ ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ
КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ

Исследовали возможности дофаминергической дифференцировки эмбриональной нервной ткани человека в культуре с целью получения клеточного материала для нейротрансплантации, обогащенного детерминированными клетками – предшественниками дофаминергических нейронов. За период культивирования численность дофаминергических нейронов в опытных образцах достоверно увеличивалась с $5,6 \pm 4,3\%$ клеток в поле зрения до $23,5 \pm 2,6\%$, в то же время в контрольных образцах их концентрация составляла $8,1 \pm 6,5\%$ клеток. Анализ экспрессии генов, связанных с упомянутым типом нейрональной дифференцировки, подтвердил ее дофаминергическую направленность. Нами было показано, что на протяжении периода культивирования исчезает экспрессия ранних транскрипционных факторов Nurr1 и Lmx1b и в то же время возрастает уровень экспрессии ТГ. Таким образом, использование специальных условий культивирования позволяет получить клеточный материал для нейротрансплантации, обогащенный предшественниками дофаминергических нейронов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Theofilopoulos S., Goggi J., Riaz S. S., Jauniaux E., Stern G.M., Bradford H.F. Parallel induction of the formation of dopamine and its metabolites with induction of tyrosine hydroxylase expression in foetal rat and human cerebral cortical cells by brain-derived neurotrophic factor and glial-cell derived neurotrophic factor // Brain Res. Dev. Brain Res. – 2001. – **127**, № 2. – P. 111–122.
2. Zhou J., Bradford H.F., Stern G.M. The response of human and rat fetal ventral mesencephalon in culture to the brain-derived neurotrophic factor treatment // Brain Res. – 1994. – **565**, № 1. – P. 147–156.
3. Carvey P.M., Ling Z.D., Sortwell C.E., Pitzer M.R., McGuire S.O., Storch A., Collier T.J. A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease // Exp. Neurol. – 2001. – **171**, № 1. – P. 98–108.
4. Ling Z.D., Potter E.D., Lipton J.W., Carvey P.M. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines // Exp. Neurol. – 1998. – **149**, № 2. – P. 411–423.

5. Zhou J., Bradford H.F., Stern G.M. Influence of BDNF on the expression of the dopaminergic phenotype of tissue used for brain transplants // Dev. Brain Res. – 1997. – **100**, № 1. – P. 43–51.
6. Riaz S.S., Jauniaux E., Stern G.M., Bradford H.F. The controlled conversion of human neural progenitor cells derived from fetal ventral mesencephalon into dopaminergic neurons in vitro // Dev. Brain Res. – 2002. – **136**, № 1. – P. 27–34.
7. Lynna X. Основы гистохимии. – М.: Мир, 1980. – С. 252–266.
8. Zeng X., Cai J., Chen J., Luo Y., You Z.B., Fotter E., Wang Y., Harvey B., Miura T., Backman C., Chen G.J., Rao M.S., Freed W.J. Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells // Stem Cells. – 2004. – **22**, № 6. – P. 925–940.
9. Silani V., Mariani D., Donato F.M., Ghezzi C., Mazzucchelli F., Buscaglia M., Pardi G., Scarlato G. Development of dopaminergic neurons in the human mesencephalon and in vitro effects of basic fibroblast growth factor treatment // Exp. Neurol. – 1994. – **128**, № 1. – P. 59–76.
10. Yan Y., Yang D., Zarnowska E.D., Du Z., Werbel B., Valliere C., Pearce R.A., Thomson J.A., Zhang S. Direct differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells // Stem Cells. – 2005. – **23**, № 6. – P. 781–790.
11. Zawada W.M., Zastrow D.J., Clarkson E.D., Adams F.S., Bell K.P., Freed C.R. Growth factors improve immediate survival of embryonic dopamine neurons after transplantation into rats // Brain Res. – 1998. – **786**, № 1/2. – P. 96–103.
12. Storch A., Paul G., Csete M., Boehm B.O., Carvey P.M., Kupsh A. Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells // Exp. Neurol. – 2001. – **170**, № 2. – P. 317–325.
13. Buytaert-Hoefen K.A., Alvarez E., Cutr R.F. Generation of tyrosine hydroxylase positive neurons from human embryonic stem cells after coculture with cellular substrates and exposure to GDNF // Stem Cells. – 2004. – № 22. – P. 669–674.
14. Murrer M.G., Boissiere F., Yan Q., Hunot S., Villares J., Faucheux B., Agid Y., Hirsch E., Raisman-Vozari R. An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease // Neuroscience. – 1999. – **88**, № 4. – P. 1015–1032.
15. Saton J., Kuroda Y. The constitutive and inducible expression of Nurr1, a key regulator of dopaminergic neuronal differentiation, in human neural and non neural cell line // Neuropathology. – 2002. – **22**, № 4. – P. 219–232.
16. O'Hara F.P., Beck E., Barr L.K., Wong L.L., Kessler D.S., Riddle R.D. Zebrafish Lmx1b.1 and Lmx

- Ib.2 are required for maintenance of isthmus organizer // *Development*. – 2005. – **132**, № 14. – P. 3163–3173.
17. *Burbach J.P., Smith S., Smidt M.P.* Transcription factors in the development of midbrain dopamine neurons // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2003. – **991**. – P. 61–68.
18. *Maxwell M.A., Muscat G.E.O.* The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles // *NURSA*. – 2006. – v. 4.
19. *Hermanson E., Borqius L., Bergsland M., Joodmardi E., Perlman T.* Neuropilin 1 is a direct downstream target of Nurr1 in the developing brain stem // *J. Neurochem.* – 2006. – **97**, № 5. – P. 1403–1411.
20. *Martinat C., Bacci J.-J., Leete T., Jongpil K., Vanti W.B., Newman A.H., Cha J.H., Gether U., Wang H., Abeliovich A.* Cooperative transcription activation by Nurr1 and Ptx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2006. – **103**, № 8. – P. 2874–2879.
21. *Ostenfeld T., Svendsen C.N.* Requirement for neurogenesis to proceed through the division of neuronal progenitors following differentiation of EGF and FGF2 – responsive human neural stem cells // *Stem Cells*. – 2004. – **22**. – P. 798–811.
22. *Kontur P.J., Leranath C., Redmond D.E., Roth R.H., Robbins R.J.* Tyrosine hydroxylase immunoreactivity and monoamine and metabolite levels in cryopreserved human fetal ventral mesencephalon // *Exp. Neurol.* – 1993. – **121**, № 2. – P. 172–180.

Надійшла 28.05.08