

В.І. ЦИМБАЛЮК, І.Г. ВАСИЛЬЄВА, Н.П. ОЛЕКСЕНКО,
Н.Г. ЧОПИК, О.І. ЦЮБКО, О.С. ГАЛАНТА

Інститут нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова АМН України, Київ
E-mail: pcr07@mail.ru

РЕМІЄЛІНІЗУЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ ЕМБРІОНАЛЬНИХ НЕРВОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ В УМОВАХ ДОВГОСТРОКОВОГО КУЛЬТИВУВАННЯ



Нами був досліджений мітогенний та диференціо-вальний потенціал, а також ремієлінізуючі властивості ембріональних нервових клітин в культурі. Через 1 місяць культивування у відсутності агентів диференціювання кількість CNP-позитивних клітин (мітоотично-активних попередників олігодендроцитів) збільшується у 3,6 разу. В той же час кількість GalC-позитивних клітин (зрілих олігодендроцитів) залишається низькою. Таким чином, ремієлінізуючі властивості ембріональних нервових клітин можуть бути пояснені високою концентрацією попередників олігодендроцитів. Клітинна популяція після культивування зберігає та підсилює цей потенціал завдяки збільшенню чисельності CNP-позитивних клітин, що і було показано в умовах експериментальної демієлінізації.

© В.І. ЦИМБАЛЮК, І.Г. ВАСИЛЬЄВА, Н.П. ОЛЕКСЕНКО,
Н.Г. ЧОПИК, О.І. ЦЮБКО, О.С. ГАЛАНТА, 2009

Вступ. Широке використання ембріональних клітин як засобу для відновлення ушкоджених тканин реципієнта обумовлене вираженим трофічним впливом, який здійснюється ними при патологіях різної етіології. Зокрема, в неврології останнім часом поширилася практика використання ембріональних нервових клітин при демієлінізуючих захворюваннях [1]. Отримані позитивні ефекти підтверджують перспективність застосування в даному разі методів клітинної терапії.

У зв'язку з вищесказаним, актуальним стає дослідження ремієлінізуючих властивостей клітин ембріонального мозку. Найбільш інформативним, на наш погляд, є проведення такого дослідження в культурі, оскільки це дає можливість чітко дослідити взаємодію між клітинами у відсутності впливів з боку інших систем організму.

В умовах дефіциту клітинного матеріалу довгострокова перевивна культура ембріональних клітин є одним з його потенціальних джерел. Метою нашої роботи було дослідження можливості нарощування клітин мозку ембріонів людини першого триместру вагітності та оцінка перспективи їх застосування для ремієлінізації. В ході роботи ми вели довгострокову перевивну культуру ембріональних нервових клітин людини, спостерігаючи за динамікою росту чисельності та експресією імунологічних маркерів CNP (фосфодіестераза циклічних нуклеотидів) та GalC (галактоцереброзид), які дозволяють оцінити наявність серед клітинного матеріалу зрілих олігодендроцитів та їх попередників. Крім цього, ми досліджували механізм взаємодії між цими клітинами та нервовими волокнами, що підлягали штучній демієлінізації.

Виконання такої роботи дозволить внести свій вклад у пошук оптимального матеріалу для клітинної терапії демієлінізуючих хвороб.

Матеріали та методи. В роботі використовували солі та органічні розчинники кваліфікацій ХЧ та ЧДА, Хенкса (Біо-Тест-Лабораторія, Україна), середовище Ігла (Інститут поліомієліту та вірусних енцефалітів, Россія) та F-12 («Sigma», Німеччина), сироватку крупного рогатого скота (Конотопм'ясо, Україна), гліоксилову кислоту («Janssen Chemica», Бельгія), параформальдегід («Janssen Chemica», Бельгія), гематоксилін («Janssen Chemica», Бельгія), гліцин («Реакімі», Угорщина) та антитіла

виробництва «Sigma» (Німеччина) та «Дако» (Данія).

Для аналізу препаратів та фотографування використовували систему аналізу зображення IBAS-2000.

Забір абортивного матеріалу здійснювали на підставі договору № 17 від 01.01.05 між Інститутом нейрохірургії АМН України та Київською міською клінічною лікарнею № 16. Для культивування в стерильних умовах виділяли головний мозок ембріонів людини 5–12 тиж гестації, промивали стерильним фізіологічним розчином, звільняли від оболонок [2]. Тканину суспендували у розчині Хенкса (Біо-Тест-Лабораторія, Україна) шляхом піпетування, доводили концентрацію клітин до $0,5\text{--}1,5 \cdot 10^7$ в 1 мл. Суспензію розливали у стерильні чашки Петрі. Культивування проводили на суміші середовищ DMEM (Інститут поліомієліту та вірусних енцефалітів, Росія) та F-12 («Sigma», Германія) з додаванням сироватки крупного рогатого скота (Конотопм'ясо, Україна) в інкубаторі при 37°C та 5 % CO_2 . Пересажували клітини один раз на 2–3 тиж в залежності від темпів ділення та встановлення контактів.

Для дослідження процесів мієлінізації використовували також довгострокову культуру середнього мозку і стріатуму новонародженого щура. Культивування проводили у вигляді експлантатів на середовищі стандартного складу. Демієлінізацію індукували короткостроковим впливом бромистого етидію [3].

Гістофлуоресцентне виявлення катехоламінів здійснювали за методом Фалька-Хіларпа [4]. Препарати досліджували під флуоресцентним мікроскопом.

Загальну кількість клітин підраховували за допомогою гемоцитометра [5].

Розчин 0,5%-ного вітального барвника 2307 SL готували на ДМСО (диметилсульфоксид) («Lachema», Чехія). Клітинну суспензію розводили розчином барвника 4 : 1. Забарвлення проводили при 37°C впродовж 2 год. Клітини набували стійкого малиново-червоного кольору.

Для імуногістохімічного виявлення CNP^+ та GalC^+ -клітин культуру відмивали розчином Хенкса (Біо-Тест-Лабораторія, Україна) та фіксували 30 хв 0,4%-ним розчином глутар-

альдегіда на PBS [6]. Після цього зразки інкубували 45 хв у 100 мМ розчині гліцину («Реа-хім», Угорщина) на PBS з рН 10. Двічі промивали PBS та інкубували 30 хв у PBTA (0,1 % Трітон X-100 та 0,3 % БСА на PBS). Після цього здійснювали інкубацію з першими антитілами – анти-CNP (1 : 500) («Sigma», Німеччина) та анти-GC (1 : 40) («Sigma», Німеччина) впродовж 1 год. Тричі промивали PBTA. Потім інкубували з відповідними другими антитілами (IgG помічені ФІТЦ, («Дако», Данія) і знов тричі промивали PBTA.

Скельця висувували при кімнатній температурі та заключали у суміш гліцерин – PBS (9 : 1).

Результати досліджень та їх обговорення. Останнім часом актуальним напрямком медичних досліджень є пошук засобів клітинної терапії, здатних ефективно здійснювати ремієлінізацію ушкоджених нервових волокон. На цю роль пропонується цілий ряд клітинних популяцій: поліпотентні та мультипотентні клітини ембріона, попередники олігодендроцитів та шваннівських клітин, мультипотентні клітини гермінальних зон дорослого організму та деякі інші [7]. Дослідники порівнюють їх проліферативний потенціал та здатність приймати участь у мієлогенезі. На сьогоднішній день питання остаточно не вирішене. Ведуться пошуки найбільш перспективної з цієї точки зору популяції клітин, які можливо було б застосовувати у клінічній практиці.

Ембріональні клітини є одним з найбільш перспективних потенціальних джерел матеріалу для клітинної трансплантації. Вони відрізняються значною функціональною пластичністю, здатністю до міграції і інтенсивного поділу в культурі. Мієлінізуючий потенціал ембріональної нервової тканини забезпечується наявністю CNP -позитивних клітин – первинних попередників олігодендроцитів, здатних до міграції та поділу.

Можливість отримання зрілих нервових клітин всіх типів із стовбурових клітин в культурі неодноразово підтверджена даними літератури. Нервові клітини ембріонального мозку людини 5–12 тиж гестації на 95 % є нестін-позитивними, тобто нейроепітеліальними стовбуровими клітинами, здатними до довгострокового ділення *in vitro* [7, 8]. Carpenter et al. [8] за-

значили, що всі клітинні лінії, отримані з мозку ембріонів людини 6–10 тиж гестації, продукували невелику кількість GalC-позитивних клітин, чисельність яких варіювала між лініями [9]. Темпи розмноження в культурі для різних типів клітин нервової системи відрізняються. За даними Svedensen et al. [8], максимальне збільшення чисельності олігодендроцитів відбувається під час ранніх пасажів (приблизно до 50 днів культивування). Дослідники вважають, що попередники олігодендроцитів діляться в культурі впродовж обмеженого періоду, а потім відмирають.

Актуальним завданням нашого дослідження у зв'язку з вищесказаним є з'ясувати, як перебування в довгостроковій перевивній культурі впливає на мієлінізуючі властивості клітин.

Відомо, що для ефективного розмноження недиференційованих клітин в культурі необхідні такі умови: відсутність в середовищі факторів диференціювання, мітогенний вплив та підтримання низької концентрації клітин [8, 9].

Відсутність біологічно активних молекул, що можуть бути індукторами диференціювання, досягається використанням середовища без сироватки або термоінактивованої сироватки. Мітогенний ефект здійснюється факторами ФРЕ та ФРФб.

Низька концентрація клітин підтримується режимом перевивань. Існує концентраційно залежний механізм зворотної регуляції інтенсивності поділу попередників олігодендроцитів [10]. Зменшення інтенсивності поділів в культурі при зростанні чисельності клітин виникає внаслідок виникнення численних міжклітинних контактів, під час встановлення яких запускаються складні сигнальні механізми.

Гальмування швидкості проліферації *in vitro* при зростанні кількості клітин відбувається за участю молекул – регуляторів клітинного циклу. Зменшення інтенсивності мітотичних поділів в культурі попередників олігодендроцитів корелює із підвищенням рівня експресії інгібітора p27 (Kip1) та зниженням рівня експресії цикліну А [11]. При цьому значно зменшується чутливість олігодендроцитів до ростових факторів. P27 є циклін-залежним інгібітором кіназних ферментів. Він регламентує перехід з фази G₁ до фази G₀ клітин – попередників олігодендроцитів O-2A [11]. Ці сигнали у своїй сукупності

стимулюють кінцеве диференціювання клітин-попередників в зрілі олігодендроцити.

Швидке нарощування попередників олігодендроцитів пов'язано з експресією генів *Olig1* та *Olig2* [12]. Остаточну роль продуктів генів *Olig1* та *Olig2* в генезі гліальних клітин не з'ясовано, але вважається, що вони важливі для стимуляції самооновлення стовбурових клітин нервової системи. Додавання FGF-2 в культуральне середовище в умовах *in vitro* викликає індукцію *Olig2*, що пояснює стимуляцію цим фактором мітозів в клітинах [12].

Експериментальним шляхом нами було встановлено, що оптимальний інтервал між перевиваннями становить в середньому 2 тиж, але залежить від темпів зростання чисельності клітин, що можуть змінюватися впродовж культивування. При цьому слід підтримувати низьку концентрацію клітин (0,5–1,0 млн/мл поживного середовища) для запобігання встановленню міжклітинних контактів, які є сигналом для гальмування клітинного поділу і початку процесів диференціювання попередників олігодендроцитів.

У відсутності агентів диференціювання за 1 міс культивування збільшення чисельності клітин у контрольних зразках становить 13,2–17,1 разу, а під впливом факторів-мітогенів – 17,5–25,4 (рис. 1, а, б).

Серед загального числа клітин нас цікавило збільшення насамперед попередників олігодендроцитів – CNP-позитивних клітин. CNP-аза (2'3'-циклічних нуклеотидів 3'-фосфодіестераза EC 3.1.4.37) – один з найбільш ранніх мієлін-асоційованих білків, який експресується у клітинах – попередниках олігодендроцитарного ряду, що здатні до міграції та активного мітотичного поділу [13].

Відомо, що CNP-аза накопичується в клітинах у період найбільш інтенсивного синтезу мієлінових мембран [13], отже вміст CNP-позитивних клітин відображає потенційну здатність клітинної популяції до здійснення ремієлінізації. Цей фермент переважно концентрується на цитоплазматичному боці поверхневих мембран клітини за виключенням зон компактного мієліну, де CNP-аза відсутня [14]. Встановлено, що він приймає участь у нарощуванні мієлінових мембран олігодендроцитів під час мієлогенезу, зокрема у приєднанні

основного білка мієліну до компактного мієліну. Остаточню його функцію на даний час не з'ясовано, але, як показано в експериментах із трансгенними тваринами, порушення нормального синтезу CNP-азі викликає появу в клітинах дефектних мієлінових мембран, насамперед з аномальним вмістом MBP [14].

Встановлено, що чисельність CNP⁺ клітин зростає в культурі значно швидше у присутності в культуральному середовищі ФРФ2 та ФРЕ. На препаратах дослідних культур вони у більшості випадків розташовані невеликими групами по 5–10 клітин на відміну від контрольних зразків, де вони здебільшого спостерігаються окремо. Через 1 місяць перевивань чисельність таких клітин в дослідних культурах перевищує їх кількість у контрольних зразках, які зростали на середовищі стандартного складу, у 3,6 разу. При цьому загальна чисельність клітин у дослідній популяції більше контрольної у 2,5 разу.

Застосування активаторів проліферації в умовах відсутності агентів диференціювання збільшує вміст клітин, здатних до активного поділу, до яких належать і CNP⁺ клітини. При цьому вміст галактоцереброзид (GalC)-позитивних клітин, тобто зрілих олігодендроцитів, що втрачають здатність до міграції і значно рідше поділяються, залишається незмінним і дуже низьким. Отже, усунення агентів диференціювання та підтримання низької концентрації в культурі призводить до збагачення популяції мітотично активними попередниками олігодендроцитів.

Для дослідження здатності нарощених в культурі клітин приймати участь у процесах ремієлінізації нервових відростків ми використовували довгострокову тканинну культуру середнього мозку новонародженого шура, яку піддавали демієлінізації шляхом короткострокового впливу бромистого етидію.

Морфологічно вплив бромистого етидію виявлявся у появі подекуди деформованих відростків та нейритно-гліальних пучків. Вони виглядають «пунктирними», на них налипає багато деструктованого матеріалу (рис. 2 і 3, див. вклейку в кінці номера).

Зменшується чисельність CNP-позитивних клітин, та значно знижується інтенсивність реакції в тих, що залишилися. GalC-позитив-

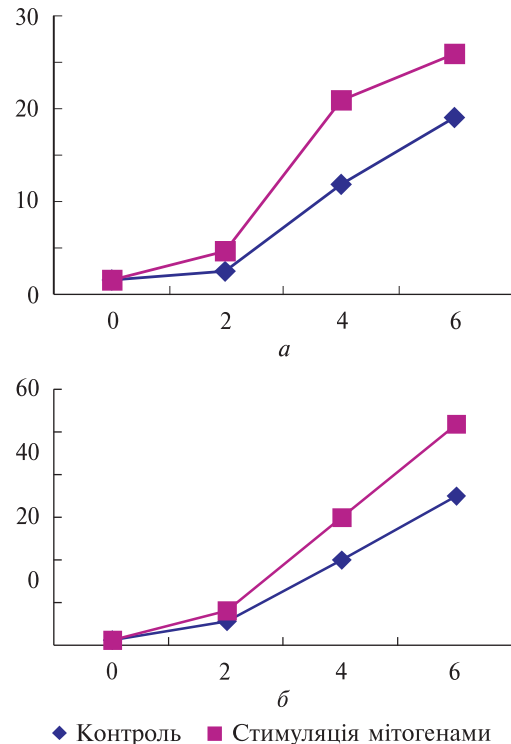


Рис. 1. Динаміка чисельності клітин в культурі головного мозку ембріонів людини: по вертикалі – млн/мл; по горизонталі – тижні гестації; а – 6 тиж; б – 10 тиж

ні клітини, які в контрольній довгостроковій культурі розташовані вздовж нейритно-гліальних пучків та окремих нейрональних відростків, часто утворюючи ланцюжки, також ушкоджуються. Контури відростків стають менш чіткими, розмитими. Гістохімічне виявлення катехоламінів свідчить про те, що локальна демієлінізація в культурі порушує функціонування встановлених нейрональних зв'язків (рис. 3, а). Флуоресцентні гранули у відростках клітин майже відсутні, спостерігаються лише окремі невеликі клітини округлої форми з флуоресценцією в цитоплазмі. Це свідчить про порушення транспорту нейромедіаторів при демієлінізації.

Отримані нами результати показали, що підсадка в демієлінізовану культуру ембріональних попередників олігодендроцитів, які нарощувалися *in vitro* у присутності факторів-мітогенів, сприяє морфологічному і функціональному відновленню ушкоджених клітин. Попереднє вітальне забарвлення дозволило прослідкувати за тенденціями розміщення емб-

ріональних клітин (рис. 3, б). Переважно вони спостерігалися у зонах росту експлантатів і мали виражену тропність до регенеруючих клітин, їх відростків та нейритно-гліальних пучків. Визначалися контакти як окремих клітин, так і цілих груп. Отже, нарощені в культурі ембріональні клітини, серед яких є і попередники олігодендроцитів, зберігають здатність до міграції.

Паралельно проведена аналогічна контрольна серія експериментів із ембріональними нервовими клітинами, підсадженими безпосередньо після отримання, показала, що клітини, які нарощувалися в культурі, мають не менший регенераторний потенціал і набувають більшої тропності до зон ушкодження, можливо, за рахунок підвищеної чисельності клітин — попередників мієлогенезу.

Висновки. Отримані дані дозволяють зробити висновок про те, що умови нарощування клітин в культурі, які запобігають передчасному диференціюванню (наявність мітогенів, режим перевивання та низька концентрація клітин), сприяють збільшенню чисельності CNP-позитивних клітин — мітотично активних попередників олігодендроцитів. Нарощені в культурі попередники олігодендроцитів зберігають здатність до міграції в зону демієлінізації та приймають участь у ремієлінізації нервових відростків, відновлюючи їх функціональну активність. Таким чином, популяція ембріональних нервових клітин в культурі не втрачає своїх ремієлінізуючих властивостей, що відкриває потенціальну можливість використовувати їх для нейротрансплантації.

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

REMYELINATION PROPERTIES
OF HUMAN EMBRYONIC
NERVE CELLS IN THE COURSE
OF LONG-TERM CULTURE

We have examined the mitogenic and differentiation potential and remyelination properties of human embryonic nerve cells in culture. After 1 month of cultivation without differentiation agents CNP-positive cells (the mitotically-active precursors of oligodendrocytes) were expanded at 3,6 times. At the same time the amount of GalC-positive cells (mature oligodendrocytes) remained low. So, the remyelination properties of embryonic nerve cells can be explained by high concentration of oligodendrocyte pre-

cursors. Cell population after cultivation maintained the increased remyelination potential by increasing the number of CNP-positive cells that was confirmed by using experimental demyelination.

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

РЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
ЭМБРИОНАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Исследовали митотический и дифференцировочный потенциал, а также ремиелинизирующие свойства эмбриональных нервных клеток в культуре. Через 1 месяц культивирования в отсутствие агентов дифференцировки количество CNP-позитивных клеток (митотически-активных предшественников олигодендроцитов) возрастает в 3,6 раза. В то же время количество GalC-позитивных клеток (зрелых олигодендроцитов) остается низким. Таким образом, ремиелинизирующие свойства эмбриональных нервных клеток могут быть объяснены высокой концентрацией предшественников олигодендроцитов. Клеточная популяция после культивирования сохраняет и усиливает этот потенциал благодаря увеличению количества CNP-позитивных клеток, что и было показано в условиях экспериментальной демиелинизации.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Цымбалюк В.І., Маркова О.В., Пичкур Л.Д., Соколова Л.І., Лисяний Н.І., Вербовская С.А. Лечение рассеянного склероза аллогенными эмбриональными нейроклетками // Трансплантология. — 2007. — 9, № 12. — С. 305.
2. Roy N.S., Wang S., Harrison-Rostelli C. et al. Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocytes progenitors cell from adult human white matter // J. Neurosci. — 1999. — 9, № 22. — P. 9986–9995.
3. Shields S.A., Blakemore W.F., Franklin R. Schwann cell remyelination is restricted to astrocyte-deficient areas after transplantation into demyelinated adult rat brain // J. Neurosci Res. — 2000. — 60, № 5. — P. 571–578.
4. Лунна. Х. Основы гистохимии. — М.: Мир, 1980. — С. 252–266.
5. Божкова В.П. и др. Руководство по культивированию нервной ткани. — М.: Наука, 1988. — С. 318.
6. McFerran B.W., Burgoune R.D. 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase is associated with mitochondrion diverse adrenal cell types // J. Cell Sci. — 1997. — 110. — P. 2979–2985.
7. Blakemore W.F., Franklin R. Transplantation options for therapeutic central nervous system remyelination // Cell Transplant. — 2000. — 9, № 2. — P. 289–294.

8. Svedensen C.N., Borg M.G. Armstrong R.E. et al. A new method for the rapid and long-term growth of human neural precursor cells // *J. Neurosci. Meth.* – 1998. – **85**. – P. 141–152.
9. Carpenter M.K., Cui X., Hu Z. et al. In vitro expansion of a multipotent population of human neural precursor cells // *Exp. Neurol.* – 1999. – **158**. – P. 265–278.
10. Nakatsuji Y., Miller R.H. Control of oligodendrocytes precursor proliferation mediated by density-dependent cell cycle protein expression // *Dev. Neurosci.* – 2001. – **23**, № 4/5. – P. 356–363.
11. Cassaccia-Bonnet P., Tikoo R., Kiyokawa H. et al. Oligodendrocytes precursor differentiation is perturbed in the absence of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 Kip1 // *Genes Dev.* – 1997. – **11**, № 18. – P. 1335–1346.
12. Gabay L., Lowell S., Rubin L.L. Anderson D.J. Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro // *Neuron*. – 2003. – **40**, № 3. – P. 447–449.
13. Roy N.S., Wang S., Harrison-Rostelli C. et al. Identification, isolation and promoter defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter // *J. Neurosci.* – 1999. – **19**, № 22. – P. 9986–9999.
14. Yin X., Peterson J., Gravel M. et al. CNP overexpression induce aberrant oligodendrocytes membranes and inhibits MBP accumulation in the myelin compaction // *J. Neurosci. Res.* – 1997. – **50**, № 2. – P. 238–247.

Надійшла 12.11.08