

Експресія маркерних протеїнів в процесі культивування прогеніторних нейроклітин *in vitro*

Л.Д. Любич, М.І. Лісяний

Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова АМН України, м.Київ

Унікальні властивості нейральних стовбурових клітин (НСК) покладено в основу розробки сучасних методів клітинної і генної терапії патології нервової системи, завдяки їх здатності під дією специфічних сигналів мікрооточення генерувати всі типи нейронів і клітин глії. У зв'язку з перспективою використання культур НСК для трансплантації при нейродегенеративних захворюваннях виникає необхідність вивчення закономірностей їх розвитку і підбору адекватних умов культивування. Метою нашого дослідження було вивчення експресії білків-маркерів нейрального диференціювання при культивуванні ембріональних нейроклітин *in vitro*.

Матеріали для досліджень: 1) нейроклітини ембріонального мозку щура (15-16 день гестації); 2) нейроклітини людини з нативного абортивного матеріалу (5-12 тижнів гестації). Клітини культивували у безсироватковому середовищі ДМЕМ/F12 ("Sigma", Німеччина) з додаванням препарату інсулін-трансферин-селеніт (ІТС) (PanEco Ltd., Росія), а також при додаванні ретинола ацетату (0,2 мг/мл) (Київський вітамінний завод). Цитологічні препарати досліджували в цитоаналізаторі зображення "ІBAS-2000" (Німеччина) з наступною фотореєстрацією.

Дані спостережень у довготривалій культурі *in vitro* за динамікою кількості ембріональних нейроклітин-попередників свідчать про те, що до 9 доби культивування у безсироватковому середовищі ДМЕМ диференційовані клітини гинуть, а залишаються переважно життєздатні переживаючі малодиференційовані або недиференційовані клітини, очевидно, стовбурові нейральні клітини. Додавання в культиваційне середовище додаткових факторів (ретинола ацетату, ростового фактора з лімфоцитів, нейротрофічного фактора) стимулює проліферацію клітин-попередників або диференціювання стовбурових клітин.

Морфологічне вивчення культур ембріональних нейроклітин показало, що протягом всього періоду спостереження (до 22 діб) такі клітини зберігали шаровидну форму без наявних ознак диференціювання. В культурах нейроклітин, культивованих в поживному середовищі з додаванням ретинола ацетату, а потім перенесених на підложку, на 15 добу культивування спостерігалось форму-

вання багатоклітинних шаровидних агрегатів, описаних в літературі як нейросфери.

В процесі культивування ембріональних нейроклітин в середовищі ДМЕМ/F12 із збільшенням терміну культивування зростає відсоток клітин, що експресували віментин – маркер стовбурових/прогеніторних клітин – (з $(28,6 \pm 3,6)\%$ на 2 добу культивування до $(77,0 \pm 13,9)\%$ на 16 добу). При цьому максимуму експресія віментину досягала на 9 добу культивування. Експресія GFAP – маркера гліобластів і астроцитів - в процесі культивування ембріональних нейроклітин в середовищі ДМЕМ/F12 практично не змінювалась із збільшенням терміну культивування.

Наші дані узгоджуються з даними (Подгорный О.В. и др., 2004), які при вивченні культур клітин мозку ембріонів людини 9-10 тижнів гестації встановили, що при фарбуванні клітин антитілами на віментин виявляється найбільша кількість позитивних клітин, при цьому у більшості нестин-позитивних клітин коекспресований віментин (Подгорный О.В. и др., 2004; Almazyn G. et al., 2001). Як відомо, нестин маркує нейральні стовбурові клітини, а віментин – клітини-попередники. Крім того, частина GFAP-позитивних клітин також експресує і віментин, ці клітини мають астроцитоподібну морфологію з досить великими ядрами. Подвійна експресія ембріональними нейроклітинами GFAP і віментину може пояснюватись тим, що для НСК характерна певна астроцитарна мімікрія (Alvarez-Buylla A. et al., 2001; Цимбалюк В.І., Медведєв В.В., 2003).

Таким чином, культивовані ембріональні нейроклітини включають клітини, що знаходяться на різних стадіях розвитку: стовбурові клітини, прогенітори, нейробласти і гліобласти. Ми вважаємо, що зростання кількості віментин-позитивних клітин із збільшенням терміну культивування ембріональних нейроклітин у безсироватковому середовищі ДМЕМ підтверджує нашу думку про те, що в процесі тривалого культивування у вказаних умовах диференційовані клітини гинуть, а залишаються переважно тільки життєздатні переживаючі стовбурові або прогеніторні нейральні клітини.

На деяких препаратах спостерігалися клітини з двома відростками і сателітними клітинами, що прикріплялись по ходу відростків, підтверджуючи, що клітини-попередники, отримані в результаті тривалого культивування у безсироватковому

Адреса для кореспонденції: Любич Л.Д., Інститут нейрохірургії імені акад. А.П.Ромоданова АМН України, м. Київ; e-mail: alla@neuro.kiev.ua

середовищі, зберігали свою поліпотентність і здатність до диференціювання у нейрональному напрямку *in vitro*. Не виключено, що ці комплекси клітин являють собою класичні ланцюги міграції, тобто тіла нейробластоїдних клітин, що переміщуються вздовж відростків, і є аналогом тангенціальної міграції слабо диференційованих нейробластів (Чистякова І.А. і др., 2004), а при певних умовах ці клітини можуть створювати міграційні потоки після трансплантації у мозок.

Таким чином, нами встановлено, що на 9 добу культивування ембріональних нейроклітин у середовищі ДМЕМ/F12 можна отримати суспензію, збагачену прогеніторними нейроклітинами (віментин-позитивними на 80-85%).