

Особенности поведения эмбриональных нервных клеток человека в условиях культивирования *in vitro*

А.Н. СУКАЧ, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В последнее время наблюдается все возрастающий интерес исследователей к изучению эмбриональных нервных клеток (ЭНК) человека. Эти исследования носят как фундаментальный характер, направленный на выяснение особенностей развития нервной системы человека, так и прикладной, имеющий целью клиническое применение этих клеток для лечения нейродегенеративных болезней человека, связанных с потерей клеток или нарушением их функционирования. Настоящая работа посвящена изучению влияния условий культивирования ЭНК человека на их поведение в культуре, что, возможно, позволит найти подходы для получения достаточного количества стандартизованных и унифицированных клеток, позволяющих восстанавливать качественно, количественно и функционально недостающие или поврежденные клетки нервной ткани человека.

Материалы и методы

Выделение клеток. Нервные клетки выделяли из головного мозга эмбрионов человека, полученных в результате легальных аборт при соответствующей форме согласия женщин. Ткань мозга помещали в стерильный солевой раствор, содержащий пенициллин, стрептомицин, гентамицин и механически дезагрегировалась на единичные клетки [2].

Жизнеспособность клеток оценивали по исключению витального красителя трипанового синего (ТС) (Sigma). Подсчет количества клеток производили в камере Горяева.

Клеточная культура. Клетки высевали в ростовую среду в концентрации 2×10^6 клеток/мл и выращивали в 24-луночных пластиковых планшетах (Corning) в среде DMEM/F12 (Sigma), как описано в работе [1]. Замена среды производилась каждые 3-4 дня.

Дифференциация клеток. Для индукции дифференциации клетки пересевали на покровные стекла, покрытые поли-орнитином и выращивали в обогащенной среде DMEM/F12, содержащей 10% FBS (Sigma). При этом удаляли ингибирующие дифференциацию мутагены. Культивирование проводили в течение 12-14 дней.

Адрес для корреспонденции: Сукач А.Н., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Иммуноцитохимия. Клеточные культуры фиксировались в 4%-м параформальдегиде. После этого производили их иммуноцитохимическое окрашивание на β -тубулин III как описано в [1].

Микроскопический анализ культур производился на световом микроскопе Olympus IX70 (Japan), **морфометрический анализ** – при помощи программы AxioVision.

Результаты и обсуждение

Нервные клетки, получали из эмбрионов человека 8-12 недель гестации. Жизнеспособность полученных клеток не зависела от сроков гестации и колебалась от 80 до 23%, что, очевидно, зависело от времени ишемии эмбрионов, которую мы контролировать не могли. Полученные клетки были округлой формы, с четко очерченной мембраной. Размер клеток колебался от 4 до 5 мкм.

Культивирование клеток в среде, не содержащей сыворотки и митогенов, приводило к прикреплению единичных клеток к пластику, некоторые из них в процессе последующего культивирования распластывались и пролиферировали до состояния маленьких кластеров, которые затем отделялись от пластика и плавали в суспензии. Распластыванием клеток и образованием кластеров (нейросфер) характеризовались суспензии с исходной жизнеспособностью выше 70%. При культивировании ЭНК с жизнеспособностью 50-30% количество распластанных клеток было небольшим, а образования нейросфер не наблюдалось. Культивирование клеток с жизнеспособностью ниже 25% характеризовалось отсутствием как распластывания клеток, так и образования нейросфер.

Культивирование ЭНК в среде, содержащей сыворотку, приводило к прикреплению небольшого количества клеток, некоторые из них начинали распластываться. Интенсивность прикрепления и распластывания клеток прямо пропорционально зависела от исходной жизнеспособности клеток. При этом неприкрепленные клетки формировали плавающие агрегаты, размеры, структура и количество которых зависели от исходной жизнеспособности ЭНК. Так, клетки с исходной жизнеспособностью выше 70% формировали довольно большое количество плотно упакованных, контрастных агрегатов (рисунок, А). ЭНК с жизнеспособностью 50-30% характеризовались образованием в основном агрегатов с рыхлой упаковкой клеток (рису-

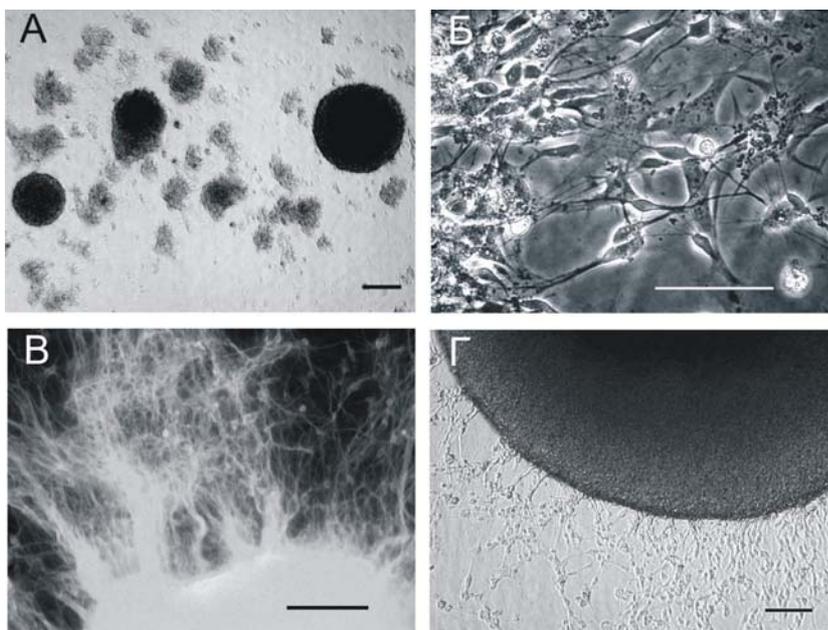
нок, А) и небольшим количеством плотно упакованных агрегатов. При культивировании ЭНК с жизнеспособностью ниже 25% наблюдалось образование очень мелких, рыхло упакованных, неконтрастных агрегатов. Дальнейшее культивирование клеток приводило к росту (увеличению в размерах) плотно упакованных агрегатов и слипанию агрегатов с рыхлой упаковкой. В некоторых случаях рыхлая структура упаковки агрегатов в процессе культивирования изменялась на плотную. Внешне плотно упакованные агрегаты ничем не отличались от нейросфер. Замена среды на свежую, приводила к активации прикрепления и последующей дифференциации как агрегатов, так и единичных неприкрепленных клеток. При этом наблюдалось активное прикрепление как плотно упакованных, контрастных агрегатов, так и агрегатов более рыхлых. Выраженной зависимости интенсивности прикрепления и распластывания агрегатов и клеток от исходной жизнеспособности ЭНК не наблюдалось. Прикрепления мелких, рыхлых агрегатов, образованных ЭНК с низкой жизнеспособностью, как правило, не происходило. Через 15-18 суток инкубации клетки образовывали монослой. Клетки с жизнеспособностью ниже 25% монослой не образовывали и в конечном итоге деградировали, хотя корреляции поведения ЭНК клеток в культуре с их жизнеспособностью не наблюдалось. Морфологически в результате дифференциации ЭНК образовывали клетки как глии, так и нейроны (рисунок, Б).

Для выяснения влияния культивирования ЭНК в условиях *in vitro* на изменение их жизнеспособности,

четыре свежесобранных клеточных суспензии с жизнеспособностью 20-46% (таблица) культивировали на протяжении 1 и 3 суток в среде, содержащей сыворотку. Сутики культивирования приводили к образованию большинством клеток агрегатов среднего и большого размера при практически полном отсутствии их прикрепления. При этом существенных отличий в поведении клеток с различной жизнеспособностью не наблюдалось. Подсчет клеток, полученных в результате дезагрегации этих агрегатов пипетированием, показал, что сутики культивирования приводили к увеличению жизнеспособности клеток до 74–91% (примерно в 3,5 раза) при незначительном изменении концентрации клеток. При этом наблюдалась корреляция жизнеспособности клеток после культивирования с их исходной жизнеспособностью. Пересев этих клеток уже через несколько часов инкубации приводил как к формированию агрегатов, так и к прикреплению значительного количества единичных клеток. При этом в процессе культивирования единичные клетки распластывались и дифференцировались, а агрегаты сначала увеличивались в размерах, затем прикреплялись. После прикрепления клетки, входящие в состав агрегатов, дифференцировались, мигрировали и в итоге образовывали монослой.

Клетки, культивированные на протяжении 3-х суток, также характеризовались образованием агрегатов, часть из которых прикреплялась, при этом клетки суспензии 3 – очень низкой степенью прикрепления агрегатов и очень большим количеством детрита. Агрегаты, образованные этими клетками, были мелкие и рыхлые и при последующем культивировании деградировали. Клетки суспензии 4 с исходной жизнеспособностью 46% в результате 3-х суток культивирования формировали как рыхлые, так и плотно упакованные агрегаты. Все плотно упакованные агрегаты и некоторые рыхлые при дальнейшем культивировании прикреплялись. Клетки, составляющие эти агрегаты, дифференцировались и мигрировали. Подсчет жизнеспособности клеток, полученных в результате дезагрегации неприкрепленных агрегатов, показал, что 3 суток культивирования приводит к увеличению их жизнеспособности примерно в 1,7

раза (таблица). При этом концентрация клеток суспензии 3 уменьшилась в 6,6 раза, а концентрация



Формирование клетками агрегатов различной плотности (А); дифференциация клеток в нейроны и клетки глии (Б); флуоресценция β -тубулина (В); медленно дифференцирующийся растущий агрегат (Г). Масштабная линейка – 100 μ m.

клеток суспензии 4 – в 2,2 раза. При этом во всех лунках наблюдалось присутствие детрита.

Иммуноцитохимическое окрашивание прикрепленных агрегатов показало, что в начальный период дифференциации (первые 3-е суток) все клетки (по крайней мере наружного слоя) агрегатов и большинство дифференцированных клеток характеризуются экспрессией β -тубулин III (рисунков, Б), который является специфическим белком нейронов. Спустя трое суток инкубации начинается усиленная дифференциация клеток агрегатов в клетки с морфологией глии. Одиночные клетки, как правило, дифференцируются в клетки глии. Часть прикрепленных агрегатов, особенно это относится к агрегатам большого размера, дифференцируется медленно, однако наблюдается их рост, что указывает на пролиферацию клеток, составляющих эти агрегаты. При этом они могут достигать очень больших размеров – до 1,4 мм в диаметре (рисунок, Г). В конечном итоге все клетки этих агрегатов дифференцируются и мигрируют, образуя монослой.

Как показывают результаты проведенного исследования, ЭНК, полученные из эмбрионов человека, характеризуются наличием микроповреждений, степень и количество которых может зависеть от совокупности таких факторов как время ишемии и влияние процедуры выделения клеток, а также, возможно, от срока гестации клеток, степени их комитированности и дифференциации. При этом стандартная процедура окрашивания ЭНК с использованием витального красителя ТС не позволяет получить адекватной картины, отражающей истинную жизнеспособность клеток.

Образование агрегатов при культивировании ЭНК в присутствии эмбриональной сыворотки, очевидно, играет важную роль в процессах репарации повреждений клеток, полученных в результате процедуры выделения. При этом размер и структура образованных агрегатов, а также их поведение в процессе культивирования отражают

степень микроповреждений (жизне-способность) образовавших их клеток. Вероятнее всего, микроповреждения ЭНК, полученные в результате процедуры их выделения, и являются причиной проникновения ТС в клетки. Эти микроповреждения в значительной степени устраняются уже после первых суток культивирования, в результате чего наблюдается резкое увеличение числа непрокрашенных ТС клеток (таблица). При этом, вероятнее всего, микроповреждения, полученные клетками в результате процедуры выделения, не позволяя им прикрепиться к подложке, способствуют процессу агрегации друг с другом. Это приводит к образованию агрегатов – структур, очевидно метаболически более предпочтительных для эффективной репарации повреждений. Если повреждения клеток, составляющих агрегат, не носят летальный характер, происходит их репарация. Структура агрегата при этом может изменяться – он приобретает более плотную упаковку и четкие очертания границ. Агрегат внешне становится похож на нейросферу. При этом увеличение размеров некоторых агрегатов, которое отмечается в процессе культивирования, указывает на способность клеток, составляющих агрегат, к пролиферации. В дальнейшем такие агрегаты прикрепляются к подложке. Клетки, составляющие их, активно дифференцируются, мигрируют, пролиферируют и образуют клеточный монослой. В том случае, когда агрегаты образованы клетками, имеющими летальные повреждения, репарации клеток не происходит. Агрегаты при этом характеризуются мелкими размерами и рыхлой структурой. Прикрепления таких агрегатов не происходит. В процессе культивирования они в конечном итоге деградируют.

Предположение, что именно микроповреждения, возникающие в результате процедуры выделения, являются причиной неспособности ЭНК эффективно прикрепляться к подложке, подтверждают эксперименты по пересеву клеток, полученных в результате диссоциации агрегатов после суток

Влияние инкубации на жизнеспособность и концентрацию клеток.

Номер суспензии	Срок гестации, недели	Жизнеспособность, %	Концентрация, 10^6 клеток/мл	Жизнеспособность, %	Концентрация, 10^6 клеток/мл
		Свежевыделенные клетки		1 сутки культивирования	
1	10	27	2,0	91	2,6
2	9	20	2,0	74	1,3
3	10	23	2,0	37	0,3
4	8	46	2,0	81	0,9

культивирования. Эти клетки, обладая высокой жизнеспособностью, активно прикреплялись к подложке, распластывались и интенсивно пролиферировали.

Вероятно, возможность репарации клеток в агрегате зависит от количества клеток, имеющих летальные повреждения. Такой вывод позволяют сделать данные по культивированию ЭНК с различной исходной жизнеспособностью и эти данные указывают на существование предельной жизнеспособности (не определяемой по прокрашиванию трипановым синим), когда полной репарации клеток не происходит. И хотя в процессе культивирования увеличивается жизнеспособность таких клеток (таблица), дальнейшее культивирование агрегатов, состоящих из этих клеток, как правило, приводит к их деградации и гибели. При отсутствии эмбриональной сыворотки репарации микроповреждений ЭНК, очевидно, не происходит.

Выводы

Нервные клетки, полученные из эмбрионов человека 8-12 недель гестации, способны пролиферировать, дифференцироваться в нейроны и клетки глии, а также мигрировать.

Кратковременное культивирование ЭНК от 1 до 3 суток в среде, содержащей эмбриональную сыворотку, приводит к частичной репарации нелетальных микроповреждений клеток. Использование витального красителя ТС не в полной мере отражает жизнеспособность свежевыделенных ЭНК человека.

При оценке жизнеспособности ЭНК целесообразно учитывать структуру и характер поведения агрегатов при культивировании в присутствии эмбриональной сыворотки.

Литература

1. Сукач А.Н. Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом // Цитология. – 2005. – Т. 47, №3. – С. 207-213.
2. Пат. №36518А МПК с 1215/00. Спосіб отримання клітин із ембріонів людини / В.І.Грищенко, О.Ю.Петренко, О.М.Сукач. Заявлено 28.12.99. Опубл. 16.04.01. Бюл. №3. – С. 1.166.