

Оригинальные исследования



© МОРГУНА В., КУВАЧЕВА Н. В., КОМЛЕВА Ю. К., КУТИЩЕВА И. А., ОКУНЕВА О. С., ДРОБУШЕВСКАЯ А. И., ХИЛАЖЕВА Е. Д., ЧЕРЕПАНОВ С. М., САЛМИНА А. Б.

УДК 616.896

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК МОЗГА КРЫС В АСТРОЦИТЫ И НЕЙРОНЫ

А. В. Моргун, Н. В. Кувачева, Ю. К. Комлева, И. А. Кутищева, О. С. Окунева,
А. И. Дробушевская, Е. Д. Хилажева, С. М. Черепанов, А. Б. Салмина

ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого
Министерства здравоохранения РФ, ректор — д. м. н., проф. И. П. Артюхов; кафедра педиатрии ИПО,
зав. — д. м. н., проф. Т. Е. Таранушенко; кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической
и токсикологической химии, зав. — д. м. н., проф. А. Б. Салмина; кафедра детских инфекционных болезней
с курсом ПО, зав. — д. м. н., проф. Г. П. Мартынова; кафедра общей хирургии, зав. — д. м. н. проф. Ю. С. Винник;
НИИ молекулярной медицины и патофизиологии, руководитель — д. м. н., проф. А. Б. Салмина.

Резюме. В работе приводится информация по выделению и культивированию прогениторных клеток центральной нервной системы из эмбрионов крыс, возможности применения нейросфер, полученных из данного вида клеток, для направленной дифференцировки в астроциты и нейроны с использованием цитокинов, факторов роста в различных концентрациях и их комбинации.

Ключевые слова: эмбрионы крыс, нейросферы, головной мозг, культивирование, астроциты, нейроны.

Одним из актуальных направлений в нейронауках является исследование вопросов нейрогенеза, межклеточных взаимодействий, репарации центральной нервной системы (ЦНС) при различной патологии [1, 2, 8, 9]. В связи с отсутствием точной модели для проводимых исследований, невозможностью забора материала от пациентов существуют серьезные препятствия для подобных исследований. Практически полностью отсутствует возможность наблюдения за процессами, протекающими в живых клетках организма и понимания межклеточных взаимодействий. Наиболее близкими к процессам в целостном организме являются модели патологии ЦНС *in vivo* на животных [5, 7, 10]. Однако при использовании животных возникают трудности с воспроизводимостью результатов исследований при первичном скрининге и тестировании лекарственных средств, сложности содержания чистых линий животных. Современные биоэтические принципы использования животных в качестве объектов исследования регламентируют усовершенствование технологий по работе с животными, уменьшение их количества при достижении воспроизводимых результатов и замену в эксперименте высокоорганизованных животных менее развитыми живыми объектами или альтернативными методами. Такими методами исследования являются модели *in vitro*, имитирующие процессы, которые протекают в живом организме и максимально приближенные к соответствующим физиологическим и патологическим процессам [8, 9]. Некоторые эксперименты, относящиеся к молекулярной биологии, биохимии, фармакологии, генетике можно проводить вне организма, на культуре клеток или, даже, в бесклеточных моделях.

В своей работе мы исследовали возможность получения прогениторных клеток ЦНС из эмбрионов крыс с целью последующей дифференцировки в нейроны и астроциты.

Материалы и методы

Объект исследования — 14-16-дневные эмбрионы белых беспородных крыс (E14-16). Все манипуляции с клетками до их посева проводились на льду для замедления протекания биохимических процессов и минимизации клеточной гибели.

Основная культуральная среда: NeuroCult® NS-A Proliferation Medium производства Stemcell® с добавлением гепарина, основного фактора роста фибробластов и эпидермального фактора роста [3]. Непосредственной единицей наблюдения были культуры клеток нейрональной и астроглиальной природы в чашках Петри с различными модификациями культуральных сред, по 10 повторностей.

Эвтаназию беременных самок проводили передозировкой анестетика и производили забор эмбрионов [4]. Крысиние эмбрионы подвергали диссекции. Головной мозг извлекали из эмбрионов и переносили в 35 мм культуральную чашку с 2% раствором глюкозы в PBS, после чего отделяли кору больших полушарий и помещали в следующую культуральную чашку, содержащую 2% раствор глюкозы в PBS. Полученная кора головного мозга иссекалась до размеров 1 мм³. После окончания диссекции, кусочки ткани помещались в 14 мл коническую пробирку в свежий раствор 2% глюкозы в PBS на 1 минуту для осаждения кусочков ткани, после чего удалялся супернатант.

Оставшуюся ткань суспензировали в 1 мл среды NeuroCult® NS-A Proliferation путем тритурации ткани

стерильным пластиковым наконечником до получения однородной суспензии клеток (состояние «молочного коктейля») с последующей добавкой еще 1 мл среды NeuroCult® NS-A Proliferation к суспензии клеток.

Через 2 минуты после осаждения неразделенных кусочков ткани собирали супернатант, переносили его в новую стерильную 14 мл пробирку и центрифугировали при 150g в течение 5 минут. Удаляли супернатант и добавляли 1 мл среды NeuroCult® NS-A Proliferation с последующей повторной тритурацией.

Проводили подсчет количества клеток с помощью гематитометра и определяли жизнеспособность клеток с трипановым синим в разведении 1/5 или 1/10 в зависимости от количества анализируемой ткани.

Полученные эмбриональные клетки в количестве $1,2 \cdot 10^5$ жизнеспособных клеток/мл вносятся в культуральные флаконы T-25 см², куда добавляли 10 мл «конечной» среды NeuroCult® NS-A Proliferation. Инкубация клеток проводилась в условиях CO₂-инкубатора при 5% CO₂ и 37°C.

На следующие сутки наблюдали образование нейросфер (клетки пролиферируют как сфероиды, которые обычно отделяют с поверхности культурального флакона или свободно плавают в нем). Нейросферы готовы к последующим пересевам через 3-4 суток с момента посева в зависимости от плотности и размера сфер. Жизнеспособные нейросферы выглядят полупрозрачными на фазовом контрасте, состоящие из множества клеток, несущих на своей поверхности микрошипы. На 7-е сутки диаметр нейросфер составляет около 100-120 мкм.

В дальнейшем возможно использование полученных нейросфер для поддержания культуры клеток, для чего необходимо проводить частичную замену среды каждые 2-3 суток с последующим пассажем клеток раз в 7-9 суток, либо проводить дифференцировку нейросфер в астроциты или нейроны 90 [6].

Для дифференцировки и культивирования астроцитов и нейронов тестировали различные добавки (цитокины, факторы роста в различных концентрациях и их комбинации) в культуральные среды. Для астроцитов в качестве «стандартной» среды использовали DMEM с 10% FBS и антибиотиками. Для определения оптимального состава среды для дифференцировки клеток нейросфер в астроциты использовались питательные среды в следующих модификациях:

1. «Стандартная» среда без цитокинов и факторов роста;
2. «Стандартная» среда с добавлением рекомбинантного мышинового макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) в концентрации 0,5 нг/мл;
3. «Стандартная» среда с добавлением рекомбинантного мышинового макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) в концентрации 1 нг/мл;
4. «Стандартная» среда с добавлением рекомбинантного человеческого основного фактора роста фибробластов (bFGF) в концентрации 0,5 нг/мл;

5. «Стандартная» среда с добавлением рекомбинантного человеческого основного фактора роста фибробластов (bFGF) в концентрации 1 нг/мл;

6. «Стандартная» среда с добавлением рекомбинантного мышинового макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) в концентрации 0,5 нг/мл и рекомбинантного человеческого основного фактора роста фибробластов (bFGF) в концентрации 0,5 нг/мл.

Для дифференцировки клеток нейросфер в нейроны в качестве основной среды использовалась NeuroCult® NS-A Differentiation Medium фирмы Stemcell® с ростовыми факторами в различных модификациях:

1. Среда-основа без цитокинов и факторов роста;
2. Среда-основа с добавлением рекомбинантного человеческого основного фактора роста фибробластов (bFGF) в концентрации 0,5 нг/мл;
3. Среда-основа с добавлением рекомбинантного человеческого основного фактора роста фибробластов (bFGF) в концентрации 1 нг/мл;
4. Среда-основа с добавлением рекомбинантного человеческого эпидермального фактора роста (EGF) в концентрации 20 пг/мл;
5. Среда-основа с добавлением рекомбинантного человеческого эпидермального фактора роста (EGF) в концентрации 40 пг/мл;
6. Среда-основа с добавлением ретиноевой кислоты в 1 мкМ концентрации;
7. Среда-основа с добавлением рекомбинантного человеческого основного фактора роста фибробластов (bFGF) в концентрации 0,5 нг/мл и ретиноевой кислоты в 1 мкМ концентрации;
8. Среда-основа с добавлением рекомбинантного человеческого эпидермального фактора роста (EGF) в концентрации 20 пг/мл и ретиноевой кислоты в 1 мкМ концентрации;
9. Среда-основа с добавлением рекомбинантного человеческого основного фактора роста фибробластов (bFGF) в концентрации 0,5 нг/мл и рекомбинантного человеческого эпидермального фактора роста (EGF) в концентрации 20 пг/мл;
10. Среда-основа с добавлением рекомбинантного человеческого основного фактора роста фибробластов (bFGF) в концентрации 0,5 нг/мл, рекомбинантного человеческого эпидермального фактора роста (EGF) в концентрации 20 пг/мл и ретиноевой кислоты в 1 мкМ концентрации.

Для верификации типа клеток и оценки чистоты культур, на части клеточной культуры проводилось иммуноцитохимическое определение маркеров клеток согласно стандартному протоколу. Использовали флуоресцентные метки-маркеры для нейронов (NSE), астроцитов (GFAP) по стандартным протоколам непрямого метода иммуноцитохимии. Чистота выделенных культур клеток рассчитывалась в процентах позитивных клеток на соответствующий маркер (NSE, GFAP) от общего числа клеток (как позитивных, так и негативных) не менее чем в десяти полях зрения.

Статистическую обработку проводили методами Манна-Уитни и описательной статистики ($M \pm \delta$), уровень значимости $\alpha = 0,05$

Результаты и обсуждение

В своей работе мы проводили дифференцировку клеток нейросфер в нейроны и астроциты путем добавления в культуральную среду факторов дифференцировки.

Протокол дифференцировки нейросфер включал механическую или химическую диссоциацию, отмывку клеточной суспензии и посев клеток с определенной плотностью в чашки Петри, планшеты или на покровные стекла в планшете.

Результаты сравнения роста астроцитов при длительности культивирования 14 суток на питательных средах различного состава представлены на рис. 1.

Результаты проведенного исследования показали, что во всех случаях культивирования астроцитов отмечалось образование монослоя клеток через 3-4 суток с момента посева и стабильное его сохранение при поддержании культуры

в течение 14 суток, колебалось только количество GFAP-позитивных клеток в культуре в пределах 80-98%. Наиболее оптимальным сочетанием факторов роста и цитокинов для культуры астроцитов является комбинация bFGF и M-CSF в концентрации 0,5 нг/мл. При использовании этой среды установлена статистически значимо максимальная чистота культуры, в которой количество GFAP-позитивных клеток составило $98,4 \pm 2,8\%$ ($p < 0,01$). Добавление в среду рекомбинантного человеческого основного фактора роста фибробластов (bFGF) в концентрации 0,5 нг/мл или рекомбинантного мышинового макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) в концентрации 0,5 нг/мл, позволили достигнуть содержания в культуре GFAP-позитивных клеток $92,2 \pm 6\%$ и $90,7 \pm 6,5\%$ соответственно, что также статистически значимо превышало показатели, полученные при использовании остальных модификаций культуральных сред ($p < 0,05$).

Результаты сравнения питательных сред при культивировании нейронов полученных из нейросфер в течение 14 суток представлены на рис. 2.

При культивировании нейронов монослой клеток образовывался на 6-7 сутки. Его стабильное состояние наблюдалось во всех культурах нейронов. Использование среды-основы без добавления ростовых факторов позволило получить культуру с $70,3 \pm 10,2\%$ NSE-позитивными клетками. При добавлении факторов роста чистота клеточных культур была в пределах 84-96%.

Оптимальными сочетаниями ростовых факторов с наибольшей чистотой культур NSE-позитивных клеток ($94,5 \pm 5,1\%$) являются комбинации bFGF 0,5 нг/мл с EGF 20 пг/мл и bFGF 0,5 нг/мл с EGF 20 пг/мл. При добавлении к вышеуказанной комбинации 1 мкМ ретиноевой кислоты отмечается незначительное увеличение чистоты культуры до $95,7 \pm 4,5\%$, по сравнению с предыдущим вариантом культуральной среды. Результаты остальных модификаций культуральной среды были сопоставимы между собой.

Таким образом, оптимальной для получения астроцитов из нейросфер является

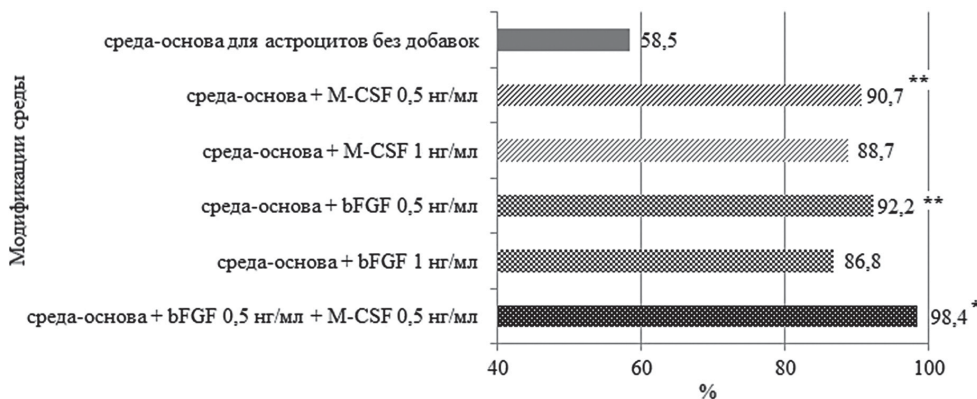


Рис. 1. Доля GFAP-позитивных клеток в культуре при тестировании питательных сред различного состава ($M \pm \delta$).

Примечание: * – статистически значимые отличия от всех других сред ($p < 0,01$), метод Манна-Уитни. ** – статистически значимые отличия от всех других сред ($p < 0,05$), метод Манна-Уитни.

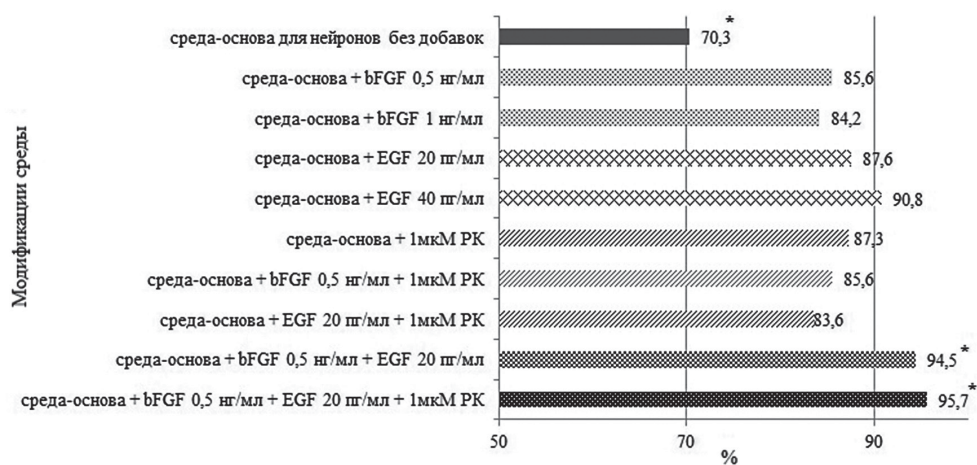


Рис. 2. Доля NSE-позитивных клеток в культуре при тестировании питательных сред различного состава ($M \pm \delta$).

Примечание: * – статистически значимые отличия от всех других сред ($p < 0,01$), метод Манна-Уитни. РК – ретиноевая кислота.

питательная среда DMEM с 10% FBS, 1% пенициллином и 1% стрептомицином с добавлением 0,5 нг/мл bFGF и 0,5 нг/мл M-CSF, а для получения нейронов — среда NeuroCult® NS-A Differentiation Medium с добавлением 0,5 нг/мл bFGF и 20 пг/мл EGF или с добавлением 0,5 нг/мл bFGF, 20 пг/мл EGF с/без 1 мкМ ретиноевой кислоты.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-4818.2012.7 (2012 г.).

DIFFERENTIATION OF EMBRYONIC PROGENITOR CELLS OF RAT BRAIN IN ASTROCYTES AND NEURONS

A. V. Morgun, N. V. Kuvacheva, Y. K. Komleva,
A. B. Salmina, I. A. Kutischeva, O. S. Okuneva,
A. I. Drobushkevskaya, E. D. Hilazheva
Krasnoyarsk State Medical University named
after prof. V. F. Voyno-Yasenetsky

Abstract. The paper provides information on the isolation and culturing of progenitor cells of the central nervous system of the rat embryo, the possibility of using the neurospheres derived from this cell type, for directed differentiation into astrocytes and neurons with cytokines, growth factors in various concentrations and combinations.

Key words: rat embryos, neurospheres, brain, culturing, astrocytes, neurons.

Литература

1. Вердиев Б.И., Полтавцева Р.А., Подгорный О.В. и др. Молекулярно-генетический и иммунофенотипический анализ транскрипционного фактора Рах6 и маркеров нейральной дифференцировки в неокортексе и сетчатке плодов человека *in vivo* и *in vitro* // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2009. — № 4. — С. 206-213.
2. Салмина А.Б., Комлева Ю.К., Кувачева Н.В. и др. Молекулярные механизмы нарушения развития мозга в пренатальном и неонатальном периодах // Вопросы современной педиатрии. — 2012. — № 6. — С. 14-19.
3. Goustard-Langelier B, Koch M, Lavielle M. et al. Rat neural stem cell proliferation and differentiation are durably altered by the *in utero* polyunsaturated fatty acid supply // *J. Nutr. Biochem.* — 2013. — Vol. 24, № 1. — P. 380-387.
4. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. — Washington, DC: The National Academies Press, 2011. — 248 p.
5. Liu Y., Guo Y., An S. et al. Targeting caspase-3 as dual therapeutic benefits by RNAi facilitating brain-targeted nanoparticles in a rat model of Parkinson's disease // *PLoS One.* — 2013. — Vol. 8, № 5. — P. 1-14.
6. Louis S.A., Rietze R.L., Deleyrolle L. et al. Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay // *Stem Cells.* — 2008. — Vol. 26, № 4. — P. 988-996.
7. Nabuurs R.J., Rutgers K.S., Welling M.M. et al. *In vivo* detection of amyloid- β deposits using heavy chain antibody

fragments in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease // *PLoS One.* — 2012. — Vol. 7, № 6. e38284. doi: 10.1371/journal.pone.0038284

8. Naik P., Cucullo L. *In vitro* blood-brain barrier models: current and perspective technologies // *J Pharm Sci.* — 2012. — V. 101, № 4. — P. 1337-1354.

9. Sawada M., Sawamoto K. Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain // *Keio J. Med.* — 2013. — Vol. 62, №1. — P. 13-28.

10. Schreiber S., Bueche C.Z., Garz C., Braun H. Blood brain barrier breakdown as the starting point of cerebral small vessel disease? - New insights from a rat model // *Exp. Transl. Stroke Med.* — 2013. — Vol. 5, №1. — P. 4-12. doi: 10.1186/2040-7378-5-4.

Сведения об авторах

Моргун Андрей Васильевич — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры педиатрии ИПО ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. 8(391) 2433952; e-mail: 441682@mail.ru.

Кувачева Наталья Валерьевна — кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: natalya.kuvacheva@gmail.com.

Комлева Юлия Константиновна — аспирант кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: yuliakomleva@mail.ru

Кутшцева Ирина Александровна — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры детских инфекционных болезней с курсом ПО ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. 8(391) 2243295; e-mail: iria24@mail.ru.

Окунева Олеся Сергеевна — кандидат медицинских наук, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патофизиологии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: okunevaolesya@gmail.com

Дробушевская Анна Ивановна — аспирант кафедры общей хирургии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. 8(391) 2508486; e-mail: annushkadoc@mail.ru.

Хилажева Елена Дмитриевна — научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патофизиологии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: elena.hilazheva@mail.ru.

Черепанов Станислав Михайлович — научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патофизиологии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: stas4476@mail.ru.

Салмина Алла Борисовна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патофизиологии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: allasalmina@mail.ru.