

М.І.Лісяний, Л.Д. Любич, А.П. Черченко, **Ю.П. Верхогляд**

Вплив алогенної внутрішньомозкової трансплантації ембріональних клітин-попередників нервової системи на гуморальну аутоімунну відповідь до нейроспецифічних білків у кролів

Цель работы состояла в получении клеток-предшественников нервной системы и изучении гуморального звена аутоиммунного ответа к нейроспецифическим антигенам после аллогенной внутримозговой трансплантации этих клеток кролям. Установлено, что на 9-е сутки культивирования эмбриональных клеток нервной системы кроля в среде DMEM с ретинола ацетатом можно получить суспензию, обогащенную на 70-80 % прогениторными клетками ЦНС (виментинположительными). У значительной части кролей (30 % животных) через 1–3 мес после внутримозговой трансплантации предшественников клеток нервной системы развиваются аутоиммунные реакции к маркеру нейронов – нейронспецифической эналазе.

ВСТУП

Стовбурові клітини є предметом постійної зацікавленості завдяки своїм властивостям і потенційній клінічній значущості [7]. Стовбурова клітина ЦНС (neural stem cell, НСК) – це клітина, що має потенцію диференціюватись у нейрони, астроцити й олігодендроцити та самовідтворюватись для забезпечення кількості клітин у мозку [12, 18]. Нині інтенсивно вивчається диференціювання стовбурових клітин ЦНС НСК у культурі та при трансплантації у мозок, оскільки внутрішньомозкова трансплантація вважається перспективною для лікування пошкоджень головного і спинного мозку, зокрема нейродегенеративних захворювань [1, 4, 5, 10]. Водночас відкритим залишається питання тривалого виживання алотрансплантатів і механізмів відторгнення стовбурових клітин. Актуальним є вивчення природи та механізмів дії стовбурових клітин мозку на імунну систему організму.

Метою нашого дослідження було отримання клітин-попередників нервової системи і вивчення гуморальної ланки аутоімунної відповіді до нейроспецифічних антигенів після алогенної внутрішньомозкової трансплантації ембріональних клітин-попередників нервової системи (ЕКПНС).

МЕТОДИКА

Матеріалом для дослідження були клітини головного мозку ембріонів кролів (15–16 діб гестації; n=78; 12 серій спостережень), а також сироватка периферичної крові кролів (n=21) після трансплантації ЕКПНС.

Суспензійні культури ЕКПНС отримували за методикою, описаною раніше [2].

Кінетику популяції клітин вивчали за допомогою піпетування та відбору зразків клітинної суспензії з культурального об'єму; кількість і життєздатність клітин визначали згідно з рекомендаціями Божкова та співавт. [8] за виключенням трипанового синього.

© М.І.Лісяний, Л.Д. Любич, А.П. Черченко, **Ю.П. Верхогляд**

Вивчення впливу складу культурального середовища на ЕКПНС проводили при культивуванні клітин у безсироватковому середовищі DMEM і при додаванні в культуральне середовище ретинолу ацетату, починаючи з 2-ї доби культивування (0,2 мг/мл, Київський вітамінний завод).

Безпосередньо перед трансплантацією (на 9-ту добу) культивовані ЕКПНС відбирали з флаконів, концентрували, відмивали живильним середовищем і доводили об'єм клітинної суспензії до 1 мл.

Алогенну трансплантацію ЕКПНС проводили стереотаксично в зону сенсомоторної кори головного мозку інтактних кролів в об'ємі 0,1 мл ($1 \cdot 10^6$ клітин).

Для імуногістохімічного вивчення експресії маркерів прогеніторними клітинами і клітинами, що пройшли певні етапи диференціювання, на 2-гу і 9-ту добу культивування в суспензії ЕКПНС відбирали та переносили в чашки Петрі в середовище DMEM. Культури тримали в CO₂-інкубаторі при постійній температурі (35,5–36,0°C), вологості (90 %) і газовому складі (5 % CO₂ і 95 % повітря). Згодом їх вивчали під інвертованим мікроскопом. На 2-, 4- та 7-му добу фіксували 4%-м нейтральним формаліном і проводили імуногістохімічне фарбування на віментин – маркер стовбурових/прогеніторних клітин і GFAP – маркер гліобластів і астроцитів [14, 18] за допомогою наборів фірми “Sigma” (Німеччина). У разі позитивної реакції відповідні структури

клітин мали коричневе забарвлення, тоді як самі клітини – смарагдово-зелене внаслідок дофарбування метиловим зеленим. Цитологічні препарати поміщали в гліцерин і досліджували на цитоаналізаторі зображення «IBAS-2000» (Німеччина) з наступною фотореєстрацією.

Рівні аутоантитіл до нейроспецифічних білків (НСБ – ОБМ: основного білка мієліну; S-100; NSE: нейронспецифічної енолази) у сироватках експериментальних тварин визначали твердофазним імуноферментним методом [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Початкова життєздатність ембріональних нейроклітин кроля становила $56,13\% \pm 2,48\%$, тривалість культивування – 9–24 доби. Кінетика суспензійних культур ЕКПНС при культивуванні в середовищі DMEM представлена в табл. 1. При культивуванні ЕКПНС кроля у безсироватковому середовищі DMEM на 5–8-му добу кількість клітин знижувалась удвічі порівняно з початковою.

При культивуванні клітин у середовищі DMEM і з додаванням ретинолу ацетату, котрий вводили в живильне середовище з 2-ї доби, на 9–12-ту добу культивування їх кількість починала зростати і збільшувалася до 12–14-ї доби вдвічі порівняно з суспензійними культурами в середовищі DMEM. Таким чином, додавання в культивацийне середовище ретинолу ацетату

Таблиця 1. Динаміка кількості (%) ембріональних клітин-попередників нервової системи у суспензійній культурі в безсироватковому середовищі DMEM і при додаванні ретинолу ацетату

Джерело клітин	Вихідний стан	Тривалість культивування			
		4-та доба	8-ма доба	12-та доба	14-та доба
Середовище DMEM (n=10)	100,00±0,00	74,80±6,11	53,80±9,90*,**	59,60±8,44*,**	
Середовище DMEM і ретинол ацетат (n=27)	100,00±0,00	92,04±22,45	72,35±32,45	100,10±39,70	117,35±6,40

$P < 0,05$ * порівняно з вихідним станом, ** порівняно зі значеннями 14-ї доби культивування

сприяло виживанню і розмноженню клітин.

Зниження кількості клітин удвічі до 5–8-ї доби культивування у безсироватковому середовищі DMEM, очевидно, пояснюється загибеллю до цього терміну диференційованих клітин, у той час як життєздатні «переживаючі» малодиференційовані чи недиференційовані клітини, за припущенням, стовбурові клітини ЦНС і клітини-попередники, залишаються в суспензії.

При додаванні в культивацийне середовище додаткових засобів (ретинолу ацетату), очевидно, стимулюється проліферація клітин-попередників або диференціювання стовбурових клітин; кількість клітин збільшується вдвічі. Отримані результати узгоджуються з даними літератури [5] і з результатами наших досліджень з культивування ембріональних клітин мозку людини 9–12-го тижнів гестації, отриманих нами раніше [2].

Морфологічне вивчення культур ЕКПНС. При огляді під інвертованим мікроскопом суспензійних культур життєздатних клітин-попередників з ембріонів кролів у середовищі DMEM спостерігали прикріплені до поверхні скла круглі безвідросткові клітини, які зберігались у такому стані без видимих

ознак диференціювання 7–22 і більше діб.

Імуногістохімічне дослідження показало, що на 9-ту добу культивування ЕКПНС у середовищі DMEM з ретинолом ацетатом, тобто в термін, коли клітини брали для трансплантації, відсоток клітин, що експресували віментин, становив $72,7\% \pm 9,9\%$ (див. рис. 1). Експресія GFAP у процесі культивування ембріональних нейроклітин у середовищі DMEM з ретинолом ацетатом практично не змінювалася зі збільшенням терміну культивування і становила $81,8\% \pm 2,5\%$ (рис. 2).

На деяких препаратах спостерігали уніполярні клітини колбоподібної форми з виразним відростком, що вказувало на їх диференціювання у нейрони (див. рис. 2).

Наявність високого відсотка віментин-позитивних клітин на 9-ту добу культивування ЕКПНС у безсироватковому середовищі DMEM підтверджує припущення про те, що в процесі культивування у вказаних умовах диференційовані клітини гинуть, а залишаються переважно тільки життєздатні стовбурові чи прогеніторні клітини нервової системи.

Отримані результати узгоджуються з

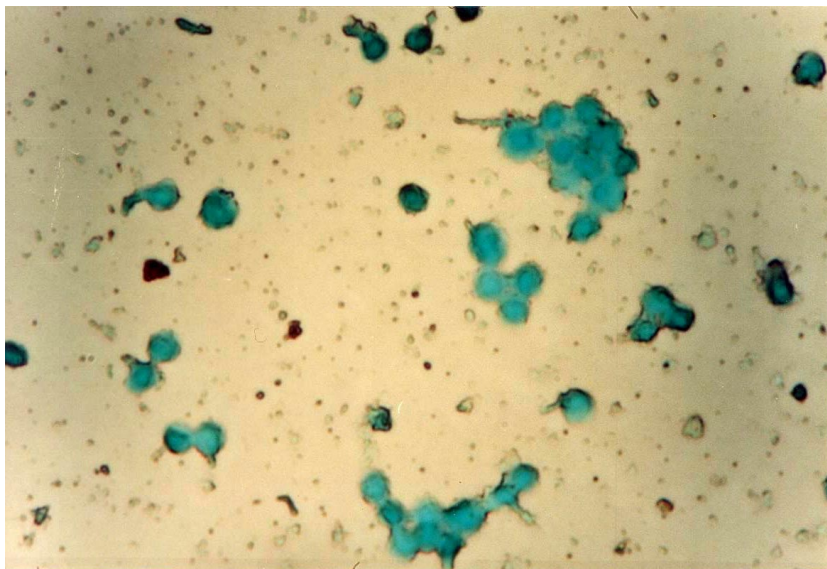


Рис. 1. Ембріональні нейроклітини кроля. Імуногістохімічне фарбування на віментин. 9-та доба культивування в суспензії в середовищі DMEM з ретинолу ацетатом. IBAS, x 800

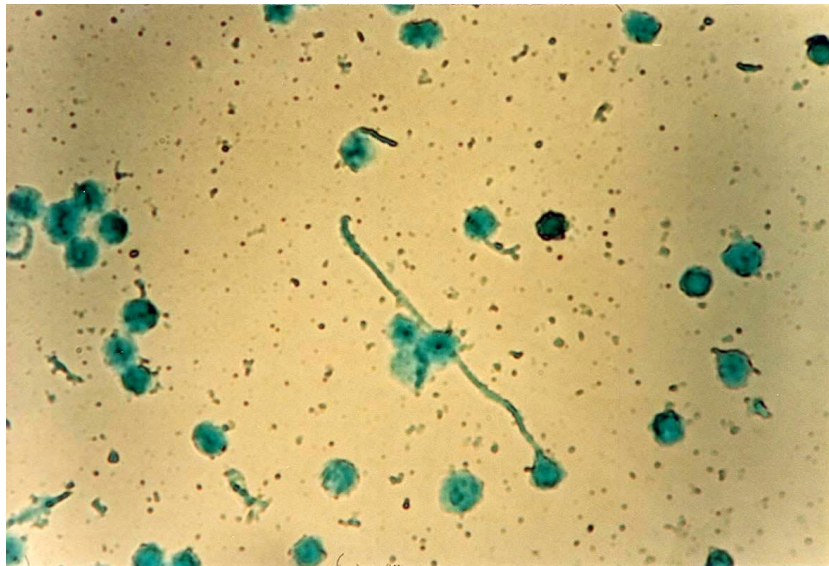


Рис. 2. Ембріональні нейроклітини кроля. Імуногістохімічне фарбування на GFAP. 9-та доба культивування в суспензії в середовищі DMEM з ретинолу ацетатом. IBAS, x 800

даними інших дослідників. Так, Підгорний зі співавт. [6] показали, що в зразках культур клітин ембріонального мозку людини 9-10-го тижнів гестації більшість нестинпозитивних клітин коекспресують віментин. Як відомо, нестин маркує стовбурові клітини ЦНС, а віментин – клітини-попередники. Крім того, частина GFAP-позитивних клітин також експресують і віментин. Ці клітини мають астроцитоподібну морфологію з великими ядрами. Подвійна експресія ембріональними клітинами нервової системи GFAP і віментину може пояснюватися тим, що для стовбурових клітин ЦНС є характерною певна астроцитарна мімікрія [11, 13]. Показано, що з клітин, які експресують GFAP, можуть розвиватися нейрони з характерними особливостями стріатних нейронів, які в нормі отримують із гангліїв. Це свідчить про те, що одна із субпопуляцій нейрогенних попередників має гліальні характеристики [17]. На основі імуногістохімічного аналізу Підгорний і співавт. [6] дійшли висновку, що культивовані клітини ембріонального мозку утворюють нейросфери, що мають гетерогенний склад і містять клітини, які знахо-

дяться на різних стадіях розвитку: стовбурові клітини, прогенітори, нейро- і гліобласти. Крім того, в процесі культивування частка віментинекспресуючих клітин збільшилася до 14-ї доби, таким чином, на думку авторів, нарощувалась кількість стовбурових клітин.

Наші результати також свідчать про те, що культури клітин ембріонального мозку складаються з клітин, які знаходяться на різних стадіях диференціювання; а в процесі тривалого культивування ЕКПНС у середовищі DMEM з ретинолу ацетатом на 9-ту добу можна отримати суспензію, збагачену на 70-80 % прогеніторними віментинпозитивними клітинами нервової системи.

Раніше нами було показано, що клітини-попередники, отримані в результаті тривалого культивування у безсироватковому середовищі, зберігають здатність до диференціювання в нейробласти *in vitro* [9].

Вивчення рівня гуморальної аутоімунної відповіді до нейроспецифічних білків у кролів після внутрішньомозкової трансплантації ЕКПНС. Матеріалом для дослідження цієї серії дослідів були сироватки кролів після трансплантації ЕКПНС. Сироватки інтакт-

них тварин використані як контроль. Дослідження проводили через 1 і 3 міс після трансплантації. Тварин розподілили на групи: I – кролі, яким проводили трансплантацію ЕКПНС і досліджували через 1 міс після втручання (n=3); II – кролі, яким проводили трансплантацію ЕКПНС і досліджували через 3 міс після операції (n=13); III – інтактні тварини (n=5).

За нашими результатами (табл. 2), через 1 міс після трансплантації ЕКПНС у 75 % тварин зареєстровано достовірне підвищення рівня аутоантитіл до NSE, ця тенденція зберігалася протягом 3 міс після втручання (38,5 % тварин).

Таким чином, можна припускати ймовірність розвитку аутоімунної відповіді до маркера нейронів – NSE – приблизно у третини тварин після трансплантації попередників клітин нервової системи. Причин розвитку гуморальної аутоімунної відповіді може бути кілька. По-перше, імплантовані прогеніторні клітини можуть сприйматись як специфічний антигенний стимул, генеруючи гуморальну аутоімунну відповідь до маркера нейронів. По-друге, аутоантитілоутворення до NSE може відображувати посилення процесів синтезу білка в зоні трансплантації, що свідчить або про активний синтез нейроспецифічного білка в імплантованих прогеніторних клітинах у процесі диференціювання і дозрівання, або про стимулювання цих процесів у прилягаючих до зони імплантації ділянках мозку. Оскільки відомо, що в онтогенезі у щурів і

мишей NSE виявляється з 2-ї доби постнатального розвитку, а його вміст різко збільшується з 8-ї по 18-ї доби паралельно дозріванню нейронів [15], тобто експресія NSE характерна для диференційованих нейронів [18], то, очевидно, більш прийнятним видається трактування розвитку гуморальної аутоімунної відповіді до NSE як відображення підвищення активності процесів синтезу білка в зоні імплантації ЕКПНС. Таким чином, реєстрація аутоантитіл до NSE побічно свідчить про те, що імплантовані прогеніторні клітини є клітинами-попередниками нейронів. Водночас здатність трансплантованих ембріональних клітин до диференціювання *in vivo* та індукції специфічної аутоімунної відповіді у 1/3 тварин є фактором ризику розвитку запального процесу і наступного відторгнення трансплантованих клітин, які пройшли диференціювання, що потребує подальшого вивчення.

ВИСНОВКИ

1. При тривалому культивуванні *in vitro* ембріональних клітин-попередників нервової системи кролів у збідненому безсироватковому середовищі DMEM кількість клітин до 8-ї доби культивування знижується удвічі.
2. Додавання в збіднене безсироваткове середовище ретинолу ацетату сприяє проліферації клітин-попередників.
3. На 9-ту добу культивування ембріо-

Таблиця 2. Рівень аутоантитіл до нейтроспецифічних білків (НСБ) у сироватці кролів після трансплантації ембріональних клітин-попередників нервової системи (ЕКПНС)

Група тварин	Аутоантитіла до НСБ, ум.од.			Частота визначення аутоантитіл до НСБ, %		
	ОБМ	S-100	NSE	ОБМ	S-100	NSE
Контроль (n=5)	4,53±1,73	4,87±1,20	5,12±1,98	0	0	0
Трансплантація ЕКПНС						
1 міс (n=3)	3,21±0,87	5,62±1,30	10,62±1,96*	0	0	75,0*
3 міс (n=13)	4,74±2,18	2,82±1,07	10,57±6,99	7,7	0	38,5

* різниця достовірна порівняно з контролем (P<0,025).

нальних клітин мозку у середовищі DMEM з ретинолу ацетатом клітинна суспензія збагачується (на 70-80 %) прогеніторними клітинами нервової системи (віментинпозитивними).

4. У значної частини кролів (1/3 тварин) через 1–3 міс після внутрішньомозкової трансплантації попередників клітин нервової системи розвиваються аутоімунні реакції до маркера нейронів – NSE.

**N.I. Lisyany, L.D. Lyubych, A.P. Cherchenko,
Yu.P. Verhoglyadov**

THE STUDY OF NEUROSPECIFIC AUTOANTIBODIES' LEVEL IN RABBITS AFTER ALLOGENIC INTRACRANIAL TRANSPLANTATION OF EMBRYONAL NEURAL PRECURSORS

The purpose of the study was to prepare the neural precursors and evaluate the humoral autoimmune response to neurospecific antigens in rabbits after intracranial transplantation of the prepared cells. The cell suspension enriched with vimentin-positive progenitor neurocells up to 70-80% was received on 9th day after cultivation of embryonal rabbit neurocells in DMEM+retinol acetate medium. The autoimmune responses to neuron-specific enolase were established in 30% of rabbits 1-3 months after intracranial neural precursors transplantation.

*Acad. A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery
Academy Medical Sciences of Ukraine, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гордеева О.Ф., Мануилова Е.С., Гуляева Д.В. и др. Морфологические аспекты дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в культуре // Цитология. Cytology. – 2001. – 43, № 9. – С.851.
2. Зозуля Ю.А., Лисяний Н.И., Любич Л.Д. и др. Длительное культивирование in vitro криоконсервированных и нативных нейроклеток эмбрионов человека // Укр. нейрохірург. журн. – 2003. – №2. – С.11–14.
3. Лисяний М.І., Любич Л.Д., Степаненко І.В., Бережний Г.А. Дослідження гуморальної ланки аутоімунних реакцій до нейроспецифічної енлази у хворих на пострадіаційну енцефалопатію // Укр.біохім.журн. – 1998. – № 6. – С.76–82.

4. Мануилова Е.С., Гордеева О.Ф., Зиновьева Р.Д. и др. Эмбриональные стволовые клетки: плюрипотентность, коммитирование, регуляция дифференцировки // Цитология. Cytology. – 2001. – 43, № 9. – С.876.
5. Полтавцева Р.А., Марей М.В., Дубровина И.В. и др. Анализ развития стволовых нейтральных клеток человека in vitro // Там же. – С.884–885.
6. Подгорный О.В., Александрова М.А., Марей М.В. и др. Экспрессия белков – маркеров нейтральной дифференцировки в культурах стволовых клеток эмбрионального мозга человека // Цитология. Cytology. – 2004. – № 10. – С. 935.
7. Репин В.С. Эмбриональная стволовая клетка: от фундаментальных исследований в клинику // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2001. – №2. – С.3–8.
8. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / В.П. Божкова, Л.А. Брежестовский, В.М. Буравлев и др. – М.: Наука, 1988. – 318 с.
9. Семенова В.М., Лисяний Н.И., Любич Л.Д. и др. Изучение индукции дифференцировки клеток, полученных из эмбрионального и постнатального мозга, в условиях культивирования in vitro // Укр. нейрохірург. журн. – 2004. – № 1. – С.4–7.
10. Сухих Г.Т., Малайцев В.В. Нейральная стволовая клетка: биология и перспективы нейротрансплантации // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2001. – 131, № 3. – С.244–255.
11. Цимбалюк В.І., Медведев В.В. Генеалогія, ідентифікація та клінічне використання нейрональних стовбурових прогеніторів // Укр. нейрохірург. журн. – 2003. – № 4. – С.8–13.
12. Цимбалюк В.І., Медведев В.В. Нейрогенные стволовые клетки. – К.: Коваль, 2005. – 595с.
13. Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo J.M. Neurogenesis in adult subventricular zone // J.Neurosci. – 2002. – 22. – P.629–634.
14. Barami K., Zhao J., Diaz F.G., Lyman W.D. Comparison of neural precursor cell fate in second trimester human brain and spinal cord // Neurol.Res. – 2000. – 23(2–3). – P.260–266.
15. Cicero T.J., Ferrendeli J.A., Suntzeff V., Moore B.W. Regional changes in CNS levels of the S-100 and 14-3-2proteins during development and aging of the mouse // J.Neurochem. – 1972. – 19. – P.2119–2125.
16. McKay R. Stem cells in the central nervous system // Science. – 1997. – 276. – P.66–71.
17. Skogh C., Eriksson C., Kokaia M. et al. Generation of regionally specified neurons in expanded glial cultures derived from the mouse and human lateral ganglionic eminence // Mol. Cel.Neurosci. – 2001. – 17, №5. – P.811–820.
18. Stemple D.L., Mahanthappa N.K. Neural stem cells are blasting off // Neuron. – 1997. – 18. – P.1–4.

*In-т нейрохірургії ім.акад. А.П. Ромоданова АМН
України, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 15.09.05*