

Получение нейральных стволовых клеток из ольфакторной луковицы постнатального мозга человека в условиях культивирования

В.М. СЕМЕНОВА, Н.И. ЛИСЯНЫЙ, Н.С. ВЫСОЦКИЙ, А.П. СТАЙНО
Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова АМН Украины, г. Киев

Существенный прогресс в развитии нейротрансплантации как метода заместительной клеточной терапии при ряде нейродегенеративных заболеваний центральной нервной системы обусловлен достижениями в изучении биологии нейральных стволовых клеток (НСК). Особый интерес в последнее время вызывает гистобиология ольфакторной луковицы (ОЛ) человека, которая рассматривается как источник накопления НСК в постнатальном мозге. Установлено, что нейрогенез в ОЛ продолжается на протяжении всей жизни млекопитающих и человека, так как в нее мигрируют прогениторные нейроклетки из субвентрикулярной зоны и дифференцируются там в зрелые формы нейронов и глии. Поэтому ОЛ человека относят к сравнительно доступному источнику получения НСК в связи с ее ограниченным размером, анатомически автономной топографией и возможностью тотального удаления во время нейрохирургического доступа к опухолям основания мозга.

Цель исследования – изучение цитологии, потенциалов роста и возможности направленной дифференциации клеток ОЛ человека в диссоциированных и эксплантационных культурах.

Материалы и методы

Проведено культивирование ткани ОЛ, полученных от 14 больных во время нейрохирургических операций по поводу базальных менингеом. Предварительно изучена гистоструктура исходной ткани ОЛ человека *in vivo*. В работе использованы общепринятые методы получения первичных и диссоциированных культур из нервной ткани, изучены особенности клеточного состава в динамике переживания культур ОЛ в питательной среде полного состава (среда Игла, эмбриональная телячья сыворотка – 40%, глюкоза – 800 мг/%, инсулин-0,2 ед/мл), в бессывороточной питательной среде с 1% ФТС, а также в среде с ретиноевой кислотой (2×10^{-6} моль/л, Retinoic acid, Sigma). Содержание жизнеспособных клеток в динамике культивирования оценивали в стандартном тесте с трипановым синим. Культуры содержали в CO_2 -инкубаторе, наблюдали прижизненно в инвер-

тированном микроскопе, исследовали на окрашенных цитологических препаратах с использованием цитоанализатора изображения “Tbas-2000” и последующей фоторегистрацией.

Результаты и обсуждение

При нейрогистологическом изучении в ткани ОЛ выявляются нейроклетки на различных стадиях созревания. Наиболее зрелые нейроциты содержали характерное пузырьковидное ядро с крупным ядрышком, крупногранулярную тигроидную субстанцию в цитоплазме, а также были снабжены множественными отростками. НСК цитологически идентифицируются как округленные безотростчатые недифференцированные формы упрощенного строения. В культурах ОЛ такие нейроклетки визуализировались в монослойно распластаных первичных микроэксплантатах после миграции из них клеток нейроглии. В диссоциированных культурах ОЛ большинство покоящихся НСК длительно сохраняли недифференцированный характер, располагались изолированно, реже – формировали небольшие кластеры и нейросферы. В дальнейшем в части НСК обнаруживались начальные признаки спонтанного образования коротких конусовидных отростков с формированием межклеточных контактов. В динамике наблюдения культур определялось постепенное снижение количества нейроклеток с 62,9% до 21,9% за счет спонтанной дегенерации и десквамации. В отличие от НСК зрелые формы нейроцитов, предсуществующие в исходной ткани ОЛ, постепенно дегенерировали в связи с утратой полноценной метаболической поддержки и короткодистантного глиального сопровождения.

В эксплантационных культурах ОЛ, обычно сохраняющих межклеточные контакты и специфическое микроокружение, наблюдалось более длительное переживание дифференцированных нейронов на фоне активной пролиферации глиоцитов. Последние формировали в зоне роста культур обширные сетевидные разрастания с признаками интенсивного фибриллообразования, что характерно для астроцитарной глии как *in vivo*, так и *in vitro*. Правомочно предположить, что в формировании таких глиальных пролифератов культур принимают участие как клетки предсуществующей глии исходной ткани ОЛ, так и НСК, дифференцирующиеся в астроциты.

Адрес для корреспонденции: Семенова В.М., Институт нейрохирургии имени акад. А.П.Ромоданова АМН Украины, г.Киев; e-mail: alla@neuro.kiev.ua

Культивирование диссоциированных нейроклеток из ОЛ в питательной среде с добавлением 1% ФТС способствует дифференциации их в отростчатые нейроноподобные формы с появлением множественных нитевидных отростков. Добавление в культуры ОЛ ретиноевой кислоты индуцирует формирование более дифференцированных длинноотростчатых нейробластов, а также способствует повышению доли жизнеспособных нейроклеток в сравнении с контрольными культурами.

Выводы

Проведенные эксперименты показывают, что модель диссоциированных культур из фрагментов ОЛ взрослого мозга человека может служить источником получения популяции НСК, которые способны дифференцироваться в нейробластные формы под влиянием специфических индукторов направленной дифференцировки. Эксплантационные культуры ОЛ могут быть использованы для получения активированных глиальных клеток астроцитарного ряда.