

## Изменение содержания нейрональных стволовых клеток в онтогенезе

Н.И. Лисяный, Л.Н. Бельская

*Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г.Киев*

На современном этапе описано присутствие нейрональных стволовых клеток в эмбриональном периоде, раннем постнатальном периоде онтогенеза и в определенных отделах взрослого головного мозга. Изменение пролиферативной активности региональных пулов "взрослых" НСК наблюдается в различные периоды постнатального развития и при патологических состояниях ЦНС. Описанная способность взрослых НСК к нейрогенезу, миграции и дифференциации нервных клеток при экспериментальных моделях инсульта, травмы и др., а также результаты экспериментальных исследований, посвященных трансплантационной терапии различной патологии ЦНС с использованием СК, показавшие, что эти клетки обладают способностью стимулировать регенерацию поврежденных и замещать погибшие нейроны и глиальные клетки, открывает, по-видимому, потенциально новую грань методов лечения различных патологий ЦНС. В связи с этим является актуальным изучение удельного содержания НСК в мозге в различные сроки онтогенеза, что может использоваться в качестве нового подхода при разработке методов лечения нейродегенеративных, неврологических заболеваний и других патологических состояний ЦНС.

### Материалы и методы

Для получения суспензии клеток головного мозга фетусы крыс извлекали под тиопенталовым наркозом. Новорожденных крыс забивали цервикальной транссекцией. Взрослых крыс вскрывали под тиопенталовым наркозом. Извлеченную ткань мозга, переносили в солевой раствор, свободный от ионов кальция и магния (CMF), разделяли на небольшие фрагменты (объемом 1-2 мм<sup>3</sup>) и подвергали механической диссоциации до получения однородной клеточной суспензии. Полученные клетки осаждали центрифугированием в течении 2 мин при 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в питательной среде ДМЕМ. Клетки рассевали во флаконы и культивировали в СО<sub>2</sub> инкубаторе, где поддерживалась постоянная газовая среда (5% СО<sub>2</sub> и 95% воздуха) при температуре 35,5-36°C и влажности 90% (Божкова В.П. и соавт., 1988). В наших исследованиях культивирование клеток

производилось в обедненной бессывороточной среде, поскольку сыворотка является дифференцирующим фактором клеток по нейрональному и глиальному типу (Wang L. и соавт., 2002; Pogany S., 2000), а создание условий сывороточного голодания позволяет обогатить клеточную суспензию недифференцированными клетками-прогениторами (Зозуля Ю.А. и соавт. 2003). Смена питательной среды производилась в течении всего срока культивирования каждые 4 дня; день посадки считался нулевым. Изучение кинетики популяции клеток проводили путем тщательного суспендирования и отбора образцов клеточной взвеси из культурального объема. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета для анализа данных Microsoft Excel для Windows 95.

### Результаты и обсуждение

Использование стандартных условий щадящего метода механической диссоциации головного мозга в наших исследованиях позволило получить клетки с исходной жизнеспособностью в среднем 53,65%, что считается удовлетворительным показателем исходной жизнеспособности клеток для культивирования. Относительное содержание длительно переживающих жизнеспособных клеток головного мозга плодов крыс (15-е сутки гистации) при культивировании в бессывороточной среде ДМЕМ снизилось до 42,5±6,4% на 4-е сутки культивирования и составило 35,1±4,3% – на 12-е сутки. У новорожденных животных содержание данных клеток к 12-м суткам культивирования не превышало 27,6±5,8%. Удельное содержание жизнеспособных клеток выделенных из головного мозга взрослых животных при культивировании в условиях сывороточного истощения к 12-м суткам составило 7,4±5,6% (животные в возрасте 3 мес) и 2,95±1,7% (животные в возрасте 9 мес) что, возможно, свидетельствует о более интенсивной гибели в суспензионной культуре при используемых условиях культивирования клеток взрослых животных по сравнению с новорожденными, а также, может быть, обусловлено разницей в пролиферативном потенциале клеток, выделенных из мозга эмбрионов крыс и клеток зрелого мозга.

Таким образом, в результате длительного культивирования клеток головного мозга животных различного возраста в бессывороточной среде

*Адрес для корреспонденции:* Лисяный Н.И., Институт нейрохирургии имени акад.А.П.Ромоданова АМН Украины, г.Киев; e-mail: alla@neuro.kiev.ua

ДМЕМ выделяются длительно переживающие жизнеспособные клетки, по-видимому, НСК или клетки-прогениторы (КП). Наибольшее относительное содержание данных клеток выявлено в наших исследованиях в головном мозге плодов крыс, что соответствует литературным данным о значительном содержании НСК и клеток-прогениторов в развивающемся головном мозге млекопитающих (Сухих Г.Т., 1998). Относительное содержание НСК и КП в ткани мозга взрослых животных в наших исследованиях было низким и уменьшалось в зависимости от возраста животных. В литературе описано наличие НСК, нейрональных и глиальных клеток-предшественников в различных регионах головного мозга взрослых животных (Gage F.H. и соавт., 1995; Pagano S., 2000; Gritti A., 2002), но их содержание, как показано в результате наших исследований, составляет единичные проценты от общего количества клеток ЦНС, что может быть обусловлено утратой региональных пулов покоящихся стволовых клеток в стареющей мозговой ткани. Описано (Репин В.С., 2001), что в стареющей мозговой ткани происходят комплексные сдвиги, которые на клеточном уровне транслируются в усиленный апоптоз нервных клеток, реактивный глиоз, уменьшение НСК регулирующих репаративные процессы в организме. Механизмы снижения содержания НСК в мозге стареющих животных изучены недостаточно, что должно являться предметом дальнейших исследований. Выявленное в наших исследованиях наибольшее удельное содержание нейрональных прогениторов в головном мозге плодов крыс позволяет рассматривать их в качестве одного из источников НСК как материала для генной и клеточной терапии нейродегенеративных, неврологических заболеваний и других патологий ЦНС.