

Визначення експресії антигенів HLA нейроклітинами людини різного терміну гестації при культивуванні *in vitro*

UDC 576.8.097.2:611-018.46-018.82:591.882

M.I. LISYANYI*, L.D. LYUBICH, V.M. SEMENOVA, L.P. STAYNO, M.S. VYSOTSKIY, A.I. POTAPOVA

Study of Antigen Expression by Human Neurocells of Different Gestation Term during Culturing *In Vitro*

Вивчена експресія антигенів HLA нейроклітинами (НК) людини різного терміну гестації та ступеня диференціювання на протеїновому рівні і на рівні мРНК методами імунофенотипування і RT-PCR. В процесі культивування НК людини 5–9 тижня гестації в середовищі DMEM + ретинолу ацетат зменшується кількість і відсоток клітин, що експресують антигени HLA I і II класу на протеїновому рівні, та на рівні мРНК, тоді як присутність у середовищі факторів росту сприяє збереженню (FGF) або зростанню (EGF) кількості таких клітин. При культивуванні у DMEM кількість клітин *Bulbus olfactorius*, що експресують антигени гістосумісності I та II класів, зменшується з 10-ї по 20-у добу.

Ключові слова: нейроклітини, культивування, антигени.

Изучена экспрессия антигенов HLA нейроклетками (НК) человека разного срока гестации и различной степени дифференциации на протеиновом уровне и на уровне мРНК методами иммунофенотипирования и RT-PCR. В процессе культивирования НК человека 5–9 недель гестации в среде DMEM + ретинола ацетат уменьшают количество и процент клеток, экспрессирующих антигены HLA I и II классов на протеиновом уровне мРНК, тогда как присутствие в среде факторов роста способствует сохранению (FGF) или нарастанию (EGF) количества таких клеток. При культивировании в DMEM количество клеток *Bulbus olfactorius*, экспрессирующих антигены гистосовместимости I и II классов, уменьшается с 10-х по 20-е сутки.

Ключевые слова: нейроклетки, культивирование, антигены.

The HLA expression by human neurocells (NC) of different gestation term and differentiation on the protein and mRNA levels using methods of immunophenotyping and RT-PCR has been studied. Under culturing human NC of 5–6 week' gestation term in DMEM + retinol acetate the amount and percentage of HLA I and II expressing cells on the protein and mRNA levels were decreased whereas the presence in the culturing medium of the growth factors contributed to preservation (FGF) or increasing (EGF) of positive expressing cells amount. Under culturing in DMEM the HLA I and II expressing *Bulbus olfactorius* cells number decreased from day 10th to 20th.

Key-words: neurocells, culturing, antigens.

Актуальним предметом досліджень є клітини ембріонального мозку, нейральні стовбурові (НСК) та прогеніторні (НПК) клітини [6, 8]. Інтенсивно вивчається їх диференціювання в культурі та при трансплантації у мозок, однак відкритими залишаються питання про тривале виживання алотрансплантатів та механізми відторгнення стовбурових клітин (СК).

На сьогодні не існує усталеної думки щодо експресії антигенів HLA I і II класів НСК. Молекули HLA не виявлені у гамет, зиготи (запліднена яйцеклітина) і на наступних стадіях поділу (морула, бластоциста) [1]. Від стадії бластоцисти до стадії ектоплацентарного конуса не спостерігається класичний набір антигенів MHC I класу на зовнішніх клітинах ембріона або відмічається їх мала кількість [1]. За даними [10, 11], ембріональні СК людини експресують HLA-A, -B, -C в малій кількості, тоді як у дослідженні [9] показано, що НСК людини

in vitro експресували тільки MHC II класу. У процесі диференціювання експресія HLA за одними даними знижувалась [10, 15], за іншими – зростала [11]. При культивуванні *in vitro* нейральних прекурсорів людини по мірі росту нейросфер збільшувалась експресія HLA I і II класів [16].

Попередніми дослідженнями показано [3], що нейроклітини (НК) мозку людини 5–9 тижнів гестації містять 8–20% HLA-A, -B, -C⁺ – клітин і 10–30% – HLA-DR⁺ – клітин, тоді як експресія мРНК HLA-A1 і HLA-DRa1 наростає від повної відсутності або незначної кількості у нейральних клітинах людини 5–9 тижнів гестації (НСК і нейральні прогенітори) до часткової експресії у регіонарних НСК зрілого мозку (клітини *Bulbus olfactorius*) і до значної експресії у клітинах білої і, особливо, сірої речовини зрілого мозку.

Мета дослідження – вивчення експресії антигенів HLA нейральними стовбуровими клітинами

ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. Ромоданова АМН України", м. Київ

Institute of Neurosurgery named after Acad. A.P. Romodanov of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

* Автор, якому необхідно направляти кореспонденцію: вул. Мануїльського, 32, м. Київ, Україна 04050; тел.: +38 (044) 483-81-93, електронна пошта: lisyanyi@neuro.kiev.ua

* To whom correspondence should be addressed: 32, Manuil'skogo str., Kiev, Ukraine 04050; tel.: +380 44 4838193, e-mail: lisyanyi@neuro.kiev.ua

та нейроклітинами різного ступеня диференціації при культивуванні *in vitro*.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були: 1) клітини головного мозку людини 5, 7, 8 та 9 тижнів гестації; 2) клітини *Bulbus olfactorius* людини (зразки отримані під час проведення оперативного видалення пухлин у хворих із пухлинами головного мозку). Суспензії нейральних клітин-попередників (НКП) отримували за методикою [2]. Кількість і життєздатність клітин визначали згідно з рекомендаціями [7]. Вплив складу культурального середовища на НКП вивчали при культивуванні клітин у безсироватковому середовищі DMEM і додаванні в культуральне середовище факторів росту: 1) ретинолу ацетату (0,2 мг/мл, АТ “Київський вітамінний завод”); 2) EGF (20 нг/мл, “Sigma”); 3) FGF (10 нг/мл, “Sigma”). Експресію антигенів HLA (HLA-A, -B, -C і HLA-DR) на культивованих НКП визначали за допомогою імунофенотипування непрямим імунофлюоресцентним методом [17], експресію мРНК антигенів HLA (HLA-A1, HLA-DRa, HLA-DQb, СІТА) – методом RT-PCR [3]. Математичну обробку отриманих результатів проводили з використанням пакета програм “Statistica 5.0”.

Результати і обговорення

Результати дослідження експресії антигенів HLA-A, -B, -C і HLA-DR нативними нейроклітинами людини на протеїновому рівні (табл. 1) пока-

зують, що НКП, які отримані з тканин мозку 5–9 тижня гестації, містять в середньому 15–18% HLA-A, -B, -C⁺ – клітин (розмах коливань 8,3–25,9) і 17–21% HLA-DR⁺ – клітин (розмах коливань 10,3–37,3). Це підтверджено даними [5, 18], які продемонстрували значну гетерогенність ембріонального матеріалу 8–12-тижневих плодів людини. На 7–8 добу культивування кількість HLA-A, -B, -C⁺ – клітин у суспензіях клітин-попередників зменшувалась у 2–3 рази як під впливом ретинолу ацетату, так і ростових факторів EGF і FGF. Однак відсоток HLA-A, -B, -C⁺ – клітин був вищим у культурах під впливом EGF і FGF (23–25%), ніж DMEM + ретинол ацетат (15,67%). На 9–10 добу у культурах під впливом ретинолу ацетату і EGF кількість HLA-A, -B, -C⁺ – клітин зменшувалась, досягаючи 9–10%, тоді як під впливом FGF відсоток HLA-A, -B, -C⁺ – клітин залишався на рівні 20%, а їх кількість зростала вдвічі. На 13–14 добу кількість HLA-A, -B, -C⁺ – клітин у культурі під впливом ретинолу ацетату дещо збільшувалась, при цьому відсоток⁺ клітин зменшувався, а під впливом EGF зростала як кількість, так і відсоток HLA-A, -B, -C⁺ – клітин. Таким чином, культивування нейроклітин людини 5–9 тижня гестації у присутності ретинолу ацетату сприяло зменшенню у 2,3 рази кількості і відсотка клітин, що експресують антигени гістосумісності I класу; тоді як додавання в середовище факторів росту залишало кількість цих клітин збереженою (FGF) протягом культивування або відновлювало їх кількість (EGF) до 14 доби культивування.

Таблиця 1. Вплив культивування на експресію антигенів HLA-A, -B, -C і HLA-DR нативними нейроклітинами людини 5–9 тижня гестації (M±m)

Склад середовища	Показники	HLA-A,-B, -C ⁺ – клітин, %				HLA-DR ⁺ – клітин, %			
		Доба				Доба			
		0	7–8	9–10	12–14	0	7–8	9–10	12–14
DMEM + ретинол (n=6)	Відсоток ⁺ клітин	15,72±3,53	15,67±6,43	9,10±1,40*	6,70±0,80**	17,70±5,60	15,50±5,90	13,40±1,10	3,60±0,30**
	Кількість ⁺ клітин, ×10 ⁶	1,00±0,62	0,31±0,14	0,11±0,02	0,23±0,02	1,11±0,60	0,30±0,13	0,17±0,02	0,12±0,02
DMEM + EGF (n=4)	Відсоток ⁺ клітин	18,76±3,57	23,10±2,43	10,30±1,10*	18,20±0,82*	21,23±8,03	17,60±2,30	–	48,00±0,30**
	Кількість ⁺ клітин, ×10 ⁶	0,65±0,09	0,19±0,04	0,10±0,02	0,46±0,02	0,55±0,29	0,14±0,03	–	1,20±0,02
DMEM + FGF (n=4)	Відсоток ⁺ клітин	18,76±3,57	25,40±2,15	19,80±1,54*	–	21,23±8,03	17,20±2,10	17,35±4,03	–
	Кількість ⁺ клітин, ×10 ⁶	0,65±0,09	0,24±0,09	0,50±0,09	–	0,55±0,29	0,17±0,03	0,36±0,18	–

Примітка: * – різниця достовірна порівняно з показниками 0-ї доби (P<0,05); # – різниця достовірна порівняно з показниками інших груп (P<0,05).

Таблиця 2. Вплив культивування на експресію антигенів HLA-A, -B, -C і HLA-DR нейроклітинами *Bulbus olfactorius* людини (% ⁺клітин, M±m)

Доба культивування (n=5)	Склад середовища	HLA-A, -B, -C ⁺	HLA-DR ⁺
0	DMEM	5,05±3,37 (0 – 15,03)	10,72±6,02 (0 – 22,73)
10	DMEM	5,99±3,01 (1,80 – 11,40)	9,07±4,14 (1,94 – 21,50)
20	DMEM	2,51±1,37 (0,60 – 5,00)	2,61±1,47 (1,30 – 5,80)

Кількість HLA-DR⁺ – клітин зменшувалась на 7–8 добу культивування у всіх культурах, однак відсоток ⁺клітин змінювався незначно (табл. 1). На 9–14 добу під впливом ретинолу ацетату кількість HLA-DR⁺ – клітин продовжувала зменшуватись, тоді як під впливом EGF їх кількість на 13–14 добу зросла вдвічі (до 48%). Ми не зареєстрували значної зміни кількості HLA-DR⁺ – клітин під впливом FGF у процесі культивування. Отже, культивування нейроклітин людини 5–9 тижня гестації у присутності ретинолу ацетату сприяло зменшенню в 4–5 разів кількості і відсотка клітин, що експресують антигени гістосумісності II класу; тоді як додавання в середовище факторів росту залишало кількість цих клітин збереженою (FGF) протягом культивування або збільшувало вдвічі їх кількість (EGF) до 14 доби культивування.

При культивуванні *in vitro* у середовищі DMEM клітин *Bulbus olfactorius* (табл. 2) відсоток HLA-A, -B, -C⁺ – і HLA-DR⁺ – клітин зменшувався на 20 добу. Таким чином, при культивуванні у DMEM кількість клітин *Bulbus olfactorius*, що експресують антигени гістосумісності I та II класів, зменшується з 10 по 20 добу у 2–5 разів.

Крім дослідження на протеїновому рівні (імунотипування), клітини досліджували на рівні мРНК (табл. 3). Культивування протягом 14 днів у середовищі DMEM не впливало на експресію

мРНК генів HLA; лише в одному зразку (9 тижень гестації) зафіксовано слабку експресію мРНК HLA-DRA1 на 12 добу культивування у DMEM. Додавання у культивувальне середовище ростових факторів (ретинол ацетат, EGF, FGF) не індукувало експресію мРНК антигенів HLA у НК людини. Нами також не зафіксовано в цих умовах експресії мРНК СІТА – трансактиватора, який відповідає за індукцію експресії генів HLA під впливом IFN-γ. Це дозволяє припустити, що НК людини 7–8 тижня гестації, культивовані у вказаних умовах, не повинні збільшувати експресію антигенів HLA під впливом прозапальних стимулів. Крім того, як ми показали раніше [4], в результаті культивування у вказаних умовах на 9–10 добу в культурі переважають віментин-позитивні нейральні попередники. З викладеного випливає, що отримувані нейральні прогенітори не експресують мРНК антигенів HLA і не повинні збільшувати експресію антигенів HLA під впливом прозапальних стимулів.

У виділених клітинах *Bulbus olfactorius* нами зафіксовано експресію мРНК HLA-A1 та HLA-DRA в одному із чотирьох зразків, але на 10 і 20 добу культивування вона не виявлялась. В другому зразку, навпаки, експресія мРНК HLA-A1 та HLA-DRA виявлялась тільки на 10 добу культивування; а в третьому зразку – не виявлялась у жодний із всіх термінів дослідження.

Таким чином, НК людини 5–9 тижнів гестації (НСК та нейральні прогенітори) не експресують або експресують низькі рівні мРНК HLA-A1, HLA-DRA, HLA-DQB, СІТА; тоді як клітини *Bulbus olfactorius* (регіонарні НСК зрілого мозку) можуть експресувати значно частіше мРНК HLA-A1 та HLA-DRA. При культивуванні у DMEM зменшувалась також кількість клітин *Bulbus olfactorius*, що експресують антигени гістосумісності I та II класів.

Отримані результати узгоджуються з деякими відомими даними, однак вони суперечливі. Експресія МНС I класу на поверхні ембріональних стов-

Таблиця 3. Вплив культивування на експресію мРНК антигенів HLA нативними нейроклітинами людини

Зразок	Доба культивування	Кількість зразків	Експресія мРНК HLA			
			HLA-A1	HLA-DRA	HLA-DQB	СІТА
НК людини 5–9 тижнів гестації DMEM + ретинол	0	n = 10 (18 проб)	+	+	0	0
	6–7	n = 4 (6 проб)	+	0	0	0
	9–10	n = 2 (3 проби)	0	0	0	0
	12–14	n = 4 (5 проб)	0	+	0	0
<i>Bulbus olfactorius</i> DMEM	0	n = 4 (4 проби)	+	+	0	0
	10	n = 3 (3 проби)	+	+	0	0
	20	n = 3 (3 проби)	0	0	0	0

бурових клітин людини була дуже низькою і зростала при диференціації *in vitro* та *in vivo*, а МНС II класу не експресувались на поверхні стовбурових недиференційованих і диференційованих клітин [10]. За даними [16] при культивуванні *in vitro* нейральных прекурсорів людини по мірі росту нейросфер збільшувалась експресія HLA I і II класів. За даними фенотипічного аналізу НСК людини, отриманих з 8–12-тижневих плодів, перед початком культивування кількість HLA-A, -B, -C⁺ – клітин становила 6,4–13,9%, HLA-DR⁺ – клітин – 3,0–9,8%; через 14 діб культивування кількість HLA-A, -B, -C⁺ – клітин – не більше 15%, HLA-DR⁺ – клітин – не менше 5% [18]. Культивування і диференціювання НСК супроводжувались зниженням експресії антигенів МНС I класу [15]. В культурах фетального мозку людини *in vitro* спостерігалась експресія HLA-DR в цитоплазмі і на клітинній поверхні GFAP⁺-астроцитів [13, 14], яка зростала по мірі тривалості культури і клітинних пасажів [12]. Фактор росту bFGF збільшував експресію HLA I класу та індукував низьку HLA-DR експресію на МСК [19]. За нашими даними, 10–17% нейроклітин людини 5–9 тижнів гестації експресують на своїй поверхні антигени МНС II класу, кількість яких зменшується, а при додаванні у середовище факторів росту зберігається або зростає.

Висновки

В процесі культивування НК людини 5–9 тижнів гестації в середовищі DMEM + реїнол ацетат зменшуються кількість і відсоток клітин, що експресують антигени HLA I і II класів як на протеїновому рівні, так і на рівні мРНК, тоді як присутність у середовищі факторів росту сприяє збереженню (FGF) або зростанню (EGF) кількості таких клітин. При культивуванні у DMEM кількість клітин *Bulbus olfactorius*, що експресують антигени гістосумісності I та II класів, зменшується з 10 по 20 добу.

Література

1. Демина Т.Н., Майлян Э.А., Гюльмамедова И.Д., Гюльмамедов В.А. Современные взгляды на иммунологию гестационного процесса // Репродуктивное здоровье женщины.– 2003.– Т. 13, №1.– С. 43–48.
2. Зозуля Ю.А., Лисяний Н.И., Любич Л.Д. и др. Длительное культивирование *in vitro* криоконсервированных и нативных нейроклёток эмбрионов человека // Укр. нейрохирургічний журн.– 2003.– №2.– С. 11–14.
3. Лисяний М.І., Любич Л.Д., Семенова В.М. та інш. Дослідження впливу експресії антигенів HLA нейроклітинами людини різного терміну гестації *in vitro* // Імунологія та алергологія.– 2008.– №1.– С. 14–19.
4. Любич Л.Д., Лисяний Н.И. Получение, культивирование и индукция дифференцировки эмбриональных нейроклёток // Трансплантологія.– 2005.– Т. 8, №2.– С. 21–33.
5. Полтавцева Р.А., Марей М.В., Дубровина И.В. и др. Развитие и дифференцировка мультипотентных нейральных клёток человека *in vitro* // Докл. АН.– 2001.– Т. 379, №6.– С. 845–849.
6. Репин В.С. Эмбриональная стволовая клетка: от фундаментальных исследований в клинику// Патологич. физиология и эксперимент. терапия.– 2001.– №2.– С. 3–8.
7. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / В.П. Божкова, Л.А. Брезжестовский, В.М. Буравлев и др.– М.: Наука, 1988.– 318 с.
8. Цимбалюк В.И., Медведев В.В. Нейрогенные стволовые клётки.– Киев, 2005.– 595 с.
9. Al Nimer F., Wennersten A., Holmin S. et al. MHC expression after human neural stem cell transplantation to brain contused rats // Neuroreport.– 2004.– Vol. 15, N12.– P. 1871–1875.
10. Draper J.S., Pigott C., Thomson J.A., Andrews P.W. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture // J. Anat.– 2002.– Vol. 200, N3.– P. 249–258.
11. Drukker M., Katz G., Urbach A. et al. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2002.– Vol. 99, N15.– P. 9864–9869.
12. Ennas M.G., Cocchia D., Silvetti E. et al. Immunocompetent cell markers in human fetal astrocytes and neurons in culture // J. Neurosci. Res.– 1992.– Vol. 32, N3.– P. 424–436.
13. Hassan-Zahraee M., Ladiwala U., Lavoie P.M. et al. Superantigen presenting capacity of human astrocytes // J. Neuroimmunol.– 2000.– Vol. 102, N2.– P. 131–136.
14. McLaren F.H., Svendsen C.N., Van der Meide P., Joly E. Analysis of neural stem cells by flow cytometry: cellular differentiation modifies patterns of MHC expression // J. Neuroimmunol.– 2001.– Vol. 112, N1–2.– P. 35–46.
15. Mado M., Mellodew K., Rezaie P. In vitro expression of major histocompatibility class I and class II antigens by conditionally immortalized murine neural stem cells // Neurosci. Lett.– 2003.– Vol. 337, N2.– P. 85–88.
16. Odeberg J., Piao J.H., Samuelsson E.B. et al. Low immunogenicity of in vitro-expanded human neural cells despite high MHC expression// J. Neuroimmunol.– 2005.–Vol. 161, N1–2.– P. 1–11.
17. Parks D.R., Lanier L.L., Herzenberg L.A. Flow cytometry and fluorescence activated cell sorting (FACS) // In: Handbook of Experimental Immunology/ Ed. by Weir D.M.– Edinburgh: Blackwell Scientific, 1986.– P. 275–301.
18. Poltavtseva R.A., Marey M.V., Aleksandrova M.A. et al. Evaluation of progenitor cell cultures from human embryos for neurotransplantation // Brain Res. Dev. Brain Res.– 2002.– Vol. 134, N1–2.– P. 149–154.
19. Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Salagianni M. et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells // Stem Cells.– 2006.– Vol. 24, N2.– P. 462–471.

Надійшла 05.06.2008