ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Klinichna khirurgiia. 2020 September/October; 87(9-10):68-73.

DOI: 10.26779/2522-1396.2020.9-10.68

Метод отримання безнейронових культур астроцитів, що є похідними мезенхімальних стовбурових клітин людини

С. М. Граматюк¹, Ю. В. Іванова², А. А. Гудима³

¹Інститут кліткової біореабілітації, м. Харків,

²Інститут загальної та невідкладної хірургії імені В. Т. Зайцева НАМН України, м. Харків,

³Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Method of obtaining of nonneuronal cultures of astrocytes, derivated from human mesenchymal stem cells

S. M. Gramatiuk¹, Yu. V. Ivanova², A. A. Hudyma³

¹Institute of Cellular Biorehabilitation, Kharkiv,

²Zaitsev Institute of General and Urgent Surgery, Kharkiv,

³I. Gorbachevsky Ternopil National Medical University

Реферат

Мета. Розробка методу отримання безнейронових культур астроцитів, що є похідними мезенхімальних стовбурових клітин людини різного походження.

Матеріали і методи. Мезенхімальні стовбурові клітини було отримано з периферичної та пуповинної крові людини за стандартною методикою з використанням методу імуномагнітної сепарації та розподілено на три групи в залежності від первинного матеріалу походження та обраного способу диференціювання: клітини, які отримано з пуповинної крові та застосовано модифікований нами спосіб диференціювання (CBMSC); клітини, які отримано з периферичної крові та для диференціювання обрано стандартний (PBMSC–1) і модифікований (PBMSC–2) протоколи. Як первинні антитіла використано стандартні набори β–III–Tubulin (Sigma, США), GFAP, Nestin (Abcam), вторинні – імуноглобуліни G, кон'юговані активаторами CNTF, BMP2/4 та FGF1 (Sigma, США) згідно з інструкцією. Для візуалізації отриманих результатів використано мікроскоп EVOS FL LIFE TECHNOLOGIES із формуванням зображення під об'єктивом ×40.

Результати. Від більшості клітин групи PBMSC–1 відповіді не отримано, тоді як від близько 80% всіх стимульованих клітин групи PBMSC–2 відповіді отримано, а вміст обох ліній на 20 – 30% складався із GFAP–позитивних клітин. Це дає підстави вважати, що експресія GFAP самої по собі недостатньо для ідентифікації дозрілих і функціональних астроцитів.

Висновки. Астроцити групи PBMSC–1 дуже рідко відповідали на АТФ–стимуляцію, тоді як астроцити груп CBMSC і PBMSC–2 демонстрували характерну відповідь. Тим самим показано, що морфологічно схожі між собою астроцитові лінії та поодинокі клітини мають різний функціональний профіль.

Ключові слова: безнейронові культури астроцитів; імуномагнітна сепарація; мезенхімальні стовбурові клітини.

Abstract

Objective. Elaboration of method for obtaining of nonneuronal cultures of astrocytes, derivatives from human mesenchymal stem cells of various origin.

Materials and methods. Mesenchymal stem cells were obtained from human peripheral and umbilical blood in accordance to standard procedure, using the immune–magnet separation method and distributed into three groups, depending on primary material of origin and the cellular differentiation technique applied: the cells, which were obtained from the umbilical blood and if our modified technique of differentiation (CBMSC) used, and the cells, which were obtained from peripheral blood and the differentiation technique used was standard (PBMSC–1) and modified (PBMSC–2) protocols. As primary antibodies standard sets β–III–Tubulin (Sigma, USA), GFAP, Nestin (Abcam) served, while as secondary antibodies – immunoglobulins G, conjugated by activators CNTF, BMP2/4 and FGF1 (Sigma, USA) in accordance to instruction. For visualization of the results obtained microscope EVOS FL LIFE TECHNOLOGIES was used with obtaining of view under ×40 objective.

Results. From majority of cells from the PBMSC–1 group the answer was not obtained, while from approximately 80% of all stimulated cells of the PBMSC–2 group the answer was obtained, and the both lines content consisted of 20 – 30% of GFAP–positive cells. This makes background to consider, that expression of GFAP only is insufficient to identify the mature and functional astrocytes.

Conclusion. Astrocytes from group PBMSC–1 have had answered very rarely on ATP–stimulation, while astrocytes from groups CBMSC and PBMSC–2 demonstrated characteristic answer. Thus, there was demonstrated, that morphologically close astrocytic lines and single cells owes different functional profile.

Keywords: nonneuronal cultures of astrocytes; the immune–magnet separation; mesenchymal stem cells.

Дослідження нервових стовбурових клітин має велике значення для вивчення патофізіологічних особливостей розвитку нервової системи і виникнення нейродегенеративних захворювань, а також розробки і впровадження нових терапевтичних підходів для вирішення таких проблем. Розвиток нервової системи в період ембріогенезу вивчено досить ретельно, однак поведінка нервових попередників – астроцитів, нейробластів, нейронів тощо багато в чому залишається не дослідженою. Залишається відкритим питання впливу мікрооточення на проліферацію і диференціацію нервових стовбурових клітин у залежності від їх походження [1 – 7].

Застосування мезенхімальних стовбурових клітин (MSC), які виділяють з периферичної та пуповинної крові, займає провідне місце в регенеративній медицині. З одного боку, це пов'язано з безболісною і простою процедурою їх отримання [8, 9], з іншого, що також має велике значення, при цьому не виникає етичних питань, як, наприклад, при дослідженнях на ембріональних стовбурових клітинах. У цьому плані привертає до себе увагу дослідження лабораторії А. Я. Фріденштейна, що є «золотим стандартом» ідентифікації та вивчення MSC [10].

Як модель для вивчення механізмів нервового диференціювання, експресії генів, а також впливу сигналів мікрооточення, що регулюють фенотипову спеціалізацію нервових тканин, можуть бути використані MSC людини [11 – 16].

Запропонована модель *in vitro* диференціації та отримання безнейронових культур астроцитів на культурі, що була диференційована із MSC людини, має велике наукове значення та може бути використана для ідентифікації можливих біомаркерів, встановлення їх клітинної функції, подальшої оцінки клітин в умовах організму.

Мета дослідження: розробка методу отримання безнейронових культур астроцитів, що є похідними MSC людини різного походження.

Матеріали і методи дослідження

MSC було отримано з периферичної та пуповинної крові людини за стандартною методикою з використанням методу імуномагнітної сепарації, принцип якого заснований на використанні парамагнітних полістирольних мікрочасток, покритих моноклональними антитілами до специфічних антигенів.

Даний метод було обрано з огляду на те, що показник його чистоти коливається від 90 до 99% та не має кліткових втрат. Нами використано магнітний сепаратор AtoMACS 3 з моноклональними антитілами до нього, що використовувались згідно з інструкцією.

MSC було розподілено на три групи в залежності від первинного матеріалу їх походження та обраного способу диференціювання: культури MSC, які було отримано з пуповинної крові та застосовано модифікований нами спосіб диференціювання (CBMSC); клітини, які було отримано з периферичної крові та для диференціювання обрано стандартний (PBMSC–1) і модифікований (PBMSC–2) протоколи.

Імуногістохімічні дослідження культури клітин проводили після їх фіксації у 4% розчині параформальдегіду. Фіксовані клітини пермеабілізували 99% розчином спирту з наступним блокуванням 5% розчином сироватки вола (Sigma, США) та інкубували з первинними антитілами протягом 12 год при температурі +4 °C. Далі клітини промивали розчином вторинних антитіл протягом 40 хв. Як первинні антитіла було використано стандартні набори β -III-Tubulin (Sigma, США), GFAP, Nestin (Abcam), вторинні – імуноглобуліни G, кон'юговані активаторами CNTE, BMP2/4 та FGF1 (Sigma, США) згідно з інструкцією. Для візуалізації отриманих результатів було використано мікроскоп EVOS FL LIFE TECHNOLOGIES із формуванням зображення під об'єктивом $\times 40$.

Візуалізація кальцію у дозріваючих астроцитах. Для візуалізації кальцію (Ca^{2+}) двотижневі диференційовані культури астроцитів диференціювалися впродовж двох тижнів на 13-міліметрових круглих 24-лункових планшетах Thermo Science. Їх попередньо обробляли соляною кислотою при температурі 55 °C впродовж 12 год. Далі планшети покривали ламініном (100 мкг/мл) безпосередньо перед використанням. Через те що зчеплення із склом гірше, ніж із пластиком, перед диференціацією нейробластні клітини (НБК) було розміщено з більшою щільністю (8×10^4 клітин на планшет).

У день візуалізації кілька планшетів за один раз переносили на порожній 24-лунковий планшет, промивали фосфат-буферним розчином та інкубували із Fura-2 (1:1000 у буферному розчині) впродовж 30 хв при температурі 26 – 27 °C.

Після додаткового промивання фосфат-буферним розчином диференційовані клітини інкубували з буферним розчином SGG упродовж щонайменше 30 хв. На цьому етапі планшети поміщали в камеру мікроскопа EVOS FL LIFE TECHNOLOGIES із формуванням зображення під об'єктивом $\times 40$ та покривали 1 мл буферного розчину SGG. За допомогою програмного забезпечення для візуалізації Cell-R починали запис із частотою один кадр за одну секунду при довжинах хвиль 340 і 380 нм одночасно, оскільки Fura-2 є коефіцієнтом метричного флуорофору.

Рівні спокою концентрації Ca^{2+} записували впродовж 60 с. Потім 1 мл АТФ (200 мкМ) у буферному розчині SGG обережно за допомогою піпетки вводили в камеру, щоб довести астроцити до 100 мкМ АТФ. Упродовж 5 хв після застосування АТФ – стимуляції здійснювали запис із частотою один кадр за одну секунду.

Аналіз отриманих даних. За допомогою Image J (менеджер АФК) площа та інтегральна щільність (ID) трьох порожніх АФК (фоновий/шумовий сигнал) та до 13 АФК на планшет покриття були розраховані як числові/довільні значення на один кадр для довжин хвиль 340 і 380 нм. Загальна ID АФК на один кадр трьох порожніх АФК віднімалася від кожного значення ID АФК на один кадр як для хвиль довжиною 340 нм, так і для хвиль довжиною 380 нм. Після цього для кожної АФК обчислювали співвідношення ID 340 нм/380 нм на кадр. На основі отриманих зна-

чень за допомогою Prims 6 була побудована крива коливання концентрації Ca^{2+} з плином часу.

Для математико-статистичного опрацювання даних використовували пакет прикладних програм Statistica,

ли безнейронові культури астроцитів. Нами було використано стандартний протокол, запропонований R. Krencik і Su-Chun Zhang [17, 18]. Через недостатню чистоту отриманих культур протокол було модифіковано (рис. 1).

Рис. 1.
Диференціація MSC до астроцитів.

версія 10.0 (StatSoft Inc., США). Для оцінки відмінностей у незалежних групах застосовували непараметричний U-критерій Манна-Вітні. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати

На першому етапі ми провели експериментальне дослідження можливості MSC до диференціації та отрима-

Експеримент *in vitro* по диференціації та отримання безнейронових культур астроцитів. Диференціація НБК до астроцитів *in vitro* була проведена з додаванням 10% розчину фетальної сироватки (FBS) для прискорення процесу. Для диференціації астросфер до нейросфери до перших було застосовано дисоціацію методом осадження на PLO/laminin та з додаванням 10% розчину FBS упродовж щонайменше двох тижнів перед диференціаці-

Рис. 2.
Репрезентативні мікрофотографії експресії GFAP та β -III-Tubulin через два тижні диференціації або тільки з 1% розчином FBS, або з FBS у поєднанні із зазначеними факторами.
(Масштабна лінійка: 20 мкм; n=3–6 лунок).

Рис. 3.
Результати обробки НБК FBS із застосуванням факторів і без їх застосування упродовж двох тижнів (* $p < 0,05$ – відмінності між результатами обробки з додаванням фактора і без факторів).

ею. Далі для прискорення визрівання астроцитів до НБК було застосовано експозицію як дії тільки FBS, так і дії FBS у поєднанні з активаторами CNTF, BMP2/4 та FGF1, оскільки саме ці три фактори вважаються потужними модуляторами визрівання астроцитів. До того ж ми намагалися визначити, чи під дією цих факторів відбувається прискорення визрівання астроцитів і, таким чином, розвиток гомогенних астроцитових культур.

Для підтвердження отриманих результатів експерименту та доведення ефективності обраного протоколу ми провели імуноцитохімічний аналіз та візуалізацію Ca^{2+} астроцитів, які походять із MSC.

НБК, попередньо культивовані впродовж двох тижнів із застосуванням FBS і факторів EGF/FGF2, були остаточно диференційовані впродовж двох тижнів із застосуванням FBS і факторів CNTF, BMP2/4 або FGF1 (рис. 2).

Безнейронові культури астроцитів визрівали після обробки їх FBS у 95% клітин протягом двох тижнів диференціації. Приблизно від 20 до 30% диференційованих клітин були GFAP – позитивні (рис. 3).

Для подальшого підтвердження астроцитової тотожності диференційованих клітин була проведена стимуляція астроцитів *in vitro*. За літературними даними під дією АТР на культуру клітин збільшується концентрація ядерного та цитоплазматичного Ca^{2+} .

Після завантаження Ca^{2+} –індикатору Fura-2 та стимуляції через 100 мкМ АТР збільшення концентрацій ядерного та цитоплазматичного Ca^{2+} спостерігалось як збільшення інтенсивності флуоресценції (рис. 4, А). Інтенсивність флуоресценції вимірювалась кожної секунди впродовж 5 хвилин із побудовою графіка залежності показника від тривалості періоду його вимірювання. Астроцити групи CBMSC спочатку відповідали однопіковим збільшенням ядерної та цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} , а астроцити групи PBMSC-2 в основному відповідали коливальними флуктуаціями (рис. 4, В).

Отримано дуже цікаві результати експерименту. Приблизно 50% астроцитів групи CBMSC відповідали на АТР–стимуляцію, приблизно 80% астроцитів групи PBMSC-2 залишалися реактивними, тоді як більшість астроцитів групи PBMSC-1 не відповідали на АТР–стимуляцію (рис. 4, В).

Обговорення

Нервові стовбурові клітини, отримані з пуповинної крові, пропонуються як альтернативне джерело клітин для відновлення пошкодженого мозку при трансплантації. Однак бракує даних про те, як ці клітини рухаються до генерування бажаних фенотипів нервовою тканиною реципієнта. Попередні дослідження показали, що місцеве середовище подає сигнали, що рухають частку стовбурових клітин. Щоб дослідити вплив цих локальних ознак взаємодії, автори використовували модель нейрональних культур, отриманих із пуповинної крові, спільно культивували їх із різними первинними культурами мозку шурів, створюючи нейроподібні умови мікросередовища *in vitro*.

Нейронні стовбурові клітини, мічені CNTF, BMP2/4 або FGF1, походять з нетрансформованої лінії клітин пуповинної крові людини, створеної в лабораторії. У багатьох дослідженнях показано, що близьке розташування астроцитів та олігодендроцитів сприяє нейрональній диференціації, тоді як постмітотичні нейрони індукують олігодендроглієнез цих клітин.

У свою чергу мікроглія або ендотеліальні клітини не демонструють будь-яким фенотипам своєї нервової прихильності. У нашому дослідженні отримано підтвердження цієї гіпотези при локальному застосуванні АТР із Picospritz–ом, що призвело до одноклітинних флуктуацій Ca^{2+} , що можуть бути передані на сусідні астроцити через перекриття зазорів шляхом генерації так званих Ca^{2+} –хвиль.

Доведено, що дозрівання похідних астроцитів стовбурових клітин людини, включаючи функціональне поглинання глутамату, може бути посилено за рахунок фактора росту фібробластів – FGF1. Розглянуто специфіку та механізм дії FGF1, а також нейротрофічні фактори та фактори

Рис. 4.
Результати відповіді астроцитів на АТР-стимуляцію коливаннями концентрацій Ca^{2+} .

Примітка. Розподіл «пікових» і «коливальних», «ранніх» і «пізніх» відповідей показано у відсотках від загальної кількості проаналізованих клітин ($n = 3$ незалежних доследи, $n = 48 - 71$ окрема клітина у клітинній лінії); статистично значущі відмінності вказано окремо для кожного зразка відповіді: # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,001$.

диференціації на астроцити стовбурових клітин із пуповинної крові. Цікаво, що VMP4 підвищував астроцитарну експресію, і астроцити, які отримували VMP4, не сприяли виживанню рухових нейронів *in vitro*.

Отримані нами результати підтвердили, що астроцити, отримані з пуповинної крові, можуть зчитувати сигнали з нейрогенного мікросередовища, досягаючи особливостей нейронів, астроцитів або олігодендроцитів. Продемонстровані в цій роботі специфічні реакції клітин, отриманих із пуповинної крові, дуже схожі на ті, що описані раніше для нейронів стовбурових клітин, отриманих з інших "більш типових" джерел. Це ще більше доводить їх справжню нервову природу. Окрім кращого розуміння нейрогенезу в мозку дорослої людини, ці результати можуть бути важливими при прогнозуванні поведінки похідних клітин пуповинної крові після їх трансплантації на неврологічні розлади.

Висновки

Той факт, що більшість клітин групи PBMSC-1 не відповідала на стимуляцію, тоді як близько 80% всіх стимульованих клітин групи PBMSC-2 відповідали, а вміст обох ліній приблизно на 20 – 30% складався з GFAP-позитивних клітин, дає підстави вважати, що експресії GFAP самої по собі недостатньо для ідентифікації дозрілих і функціональних астроцитів.

Отже, астроцити групи PBMSC-1 дуже рідко відповідали на АТР-стимуляцію, тоді як астроцити груп CBMSC і PBMSC-2 продемонстрували характерний зразок відповіді, показавши тим самим, що морфологічно схожі між собою астроцитові лінії та поодинокі клітини мають різний функціональний профіль.

Підтвердження

Фінансування. Джерело фінансування публікації статті – кошти її авторів.

Внесок учасників. Внесок кожного автора в цю роботу однаковий.

Конфлікт інтересів. Автори, які взяли участь у цьому дослідженні, задекларували відсутність конфлікту інтересів щодо цього рукопису.

Згода на публікацію. Всі автори прочитали і схвалили остаточний варіант рукопису та дали згоду на його публікацію.

References

- Bian S, Zhang L, Duan L, Wang X, Min Y, Yu H. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J Mol Med (Berl)*. 2014 Apr;92(4):387–97. doi: 10.1007/s00109–013–1110–5. Epub 2013 Dec 14. PMID: 24337504.
- Buzańska L, Machaj EK, Zabłocka B, Pojda Z, Domańska-Janik K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci*. 2002 May 15;115(Pt 10):2131–8. PMID: 11973354.
- Culmsee C, Zhu C, Landshamer S, Becattini B, Wagner E, Pellecchia M, et al. Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2005 Nov 2;25(44):10262–72. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2818–05.2005. Erratum in: *J Neurosci*. 2005 Nov 16;25(46):table of contents. Pellecchia, Maurizio [corrected to Pellecchia, Maurizio]. PMID: 16267234; PMCID: PMC6725791.
- Yuan SH, Martin J, Elia J, Flippin J, Paramban RI, Hefferan MP, et al. Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2011 Mar 2;6(3):e17540. doi: 10.1371/journal.pone.0017540. PMID: 21407814; PMCID: PMC3047583.
- Santos DP, Kiskinis E. Generation of Spinal Motor Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2017;1538:53–66. doi: 10.1007/978–1–4939–6688–2_5. PMID: 27943183.
- Hu BY, Du ZW, Zhang SC. Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2009;4(11):1614–22. doi: 10.1038/nprot.2009.186. Epub 2009 Oct 15. PMID: 19834476; PMCID: PMC2789118.
- Xia X, Zhang SC. Differentiation of neuroepithelia from human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2009;549:51–8. doi: 10.1007/978–1–60327–931–4_4. PMID: 19378195; PMCID: PMC2948207.
- Cunningham CJ, Redondo-Castro E, Allan SM. The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018 Aug;38(8):1276–92. doi: 10.1177/0271678X18776802. Epub 2018 May 17. PMID: 29768965; PMCID: PMC6077926.
- Tabar V, Panagiotakos G, Greenberg ED, Chan BK, Sadelain M, Guttin PH, et al. Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain. *Nat Biotechnol*. 2005 May;23(5):601–6. doi: 10.1038/nbt1088. Epub 2005 Apr 24. PMID: 15852001.
- Friedenstein AJ, Latzinik NV, Gorskaya YuF, Luria EA, Moskvina IL. Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells. *Bone Miner*. 1992 Sep;18(3):199–213. doi: 10.1016/0169–6009(92)90807–p. PMID: 1392694.
- Matyash V, Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev*. 2010 May;63(1–2):2–10. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.12.001. Epub 2009 Dec 11. PMID: 20005253.
- Zhang Y, Barres BA. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol*. 2010 Oct;20(5):588–94. doi: 10.1016/j.conb.2010.06.005. Epub 2010 Jul 23. PMID: 20655735.
- Kim HJ, McMillan E, Han F, Svendsen CN. Regionally specified human neural progenitor cells derived from the mesencephalon and forebrain undergo increased neurogenesis following overexpression of ASCL1. *Stem Cells*. 2009 Feb;27(2):390–8. doi: 10.1634/stemcells.2007–1047. PMID: 19008346.
- Johnson MA, Weick JP, Pearce RA, Zhang SC. Functional neural development from human embryonic stem cells: accelerated synaptic activity via astrocyte coculture. *J Neurosci*. 2007 Mar 21;27(12):3069–77. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4562–06.2007. PMID: 17376968; PMCID: PMC2735200.
- Hu BY, Weick JP, Yu J, Ma LX, Zhang XQ, Thomson JA, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 2;107(9):4335–40. doi: 10.1073/pnas.0910012107. Epub 2010 Feb 16. PMID: 20160098; PMCID: PMC2840097.
- Ruiz S, Brennand K, Panopoulos AD, Herreras A, Gage FH, Izpisua-Belmonte JC. High-efficient generation of induced pluripotent stem cells from human astrocytes. *PLoS One*. 2010 Dec 9;5(12):e15526. doi: 10.1371/journal.pone.0015526. PMID: 21170306; PMCID: PMC3000364.
- Krencik R, Zhang SC. Directed differentiation of functional astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2011 Oct 13;6(11):1710–7. doi: 10.1038/nprot.2011.405. PMID: 22011653; PMCID: PMC3198813.
- Krencik R, Weick JP, Liu Y, Zhang ZJ, Zhang SC. Specification of transplantable astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011 May 22;29(6):528–34. doi: 10.1038/nbt.1877. PMID: 21602806; PMCID: PMC3111840.

Надійшла 09.08.2020