

СТВОЛОВЫЕ И ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА: УСЛОВИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И НАКОПЛЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ, МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Н.Г. Антоневиц ¹, З.Б. Квачева ¹, В.Л. Чекан ², И.В. Сидоренко ², Е.С. Лобанок ³

Государственное учреждение «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии»¹, ГУО Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования², ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»³

antonevich.n@gmail.com

Получение и культивирование стволовых и прогениторных клеток обонятельной выстилки (ОВ) человека является актуальным направлением для разработки протоколов лечения травматических и дегенеративных повреждений нервной системы. В настоящем исследовании оптимизированы условия выделения жизнеспособных клеток ОВ, обладающих высоким пролиферативным потенциалом, для приготовления гетерогенной первичной культуры. Охарактеризован морфофункциональный и фенотипический состав культивируемых клеток. Идентифицировано две популяции стволовых и прогениторных клеток ОВ.

Ключевые слова: обонятельная выстилка человека, культура клеток, экто-мезенхимальные стволовые клетки, цитосферы.

Заместительная терапия поврежденных органов и тканей с использованием клеточных технологий - бурно развивающаяся область трансплантологии. Одним из многообещающих направлений в лечении травматических повреждений и дегенеративных заболеваний нервной системы является применение биопрепаратов на основе культивируемых нейральных стволовых и прогениторных клеток (НСПК) и их дифференцированных потомков (1). В настоящее время периферический отдел обонятельного анализатора, обонятельная выстилка (ОВ), рассматривается как перспективный источник НСПК (2, 3). Ткань ОВ состоит из двух слоев: нейроэпителия и подлежащей рыхлой соединительной ткани (*lamina propria*), которые представлены большим числом различных типов клеток, находящихся в сложных иерархических взаимодействиях (4). ОВ содержит обонятельные рецепторные нейроны разной степени дифференцировки, глиальные обкладочные, эпителиальные, поддерживающие клетки и фибробласты (5). Рецепторные нейроны обонятельной области после завершения

жизненного цикла или вследствие гибели замещаются новыми клетками того же типа в течение всей жизни. Постнатальный нейрогенез возможен благодаря присутствию в ткани ОБ пула цитокератин-5/6 позитивных стволовых клеток, располагающихся на базальной мембране нейроэпителия (5; 6, 7, 8, 9, 10; 11, 12). Показано, что при культивировании эти клетки формируют нейросферы, экспрессируют глиальные и нейрональные маркеры и способны к дифференцировке в клетки тканей других типов (13). Установлен положительный клинический эффект трансплантации культивируемых базальных стволовых и прогениторных клеток в сочетании с обкладочными глиальными (14; 15; 16) и фрагментов ткани обонятельной выстилки (17) у пациентов с травмами спинного мозга.

Недавно идентифицирована вторая популяция стволовых клеток ОБ мезенхимального происхождения, ниша которой находится в *lamina propria* (18). Показано, что клетки данной популяции обладают нейрогенным дифференцировочным потенциалом (18). При моделировании повреждений нервной системы у животных продемонстрировано положительное влияние их трансплантации на восстановление утраченных функций (19, 20). Таким образом, стволовые и прогениторные клетки ОБ представляются достаточно перспективными кандидатами для использования в нейротрансплантологии.

В настоящее время приготовление культур клеток ОБ и накопление их биомассы, ввиду отсутствия единого протокола, представляет определенные сложности. Это частично связано с невозможностью стандартизировать условия получения биопсийного материала от доноров. Существующие методики выделения и культивирования стволовых клеток не всегда воспроизводимы, недостаточно описан фенотипический состав и биология развития клеток ОБ в культуре. В связи с этим, целью исследования явилась оптимизация условий выделения и накопления биомассы стволовых и прогениторных клеток ОБ, обладающих высоким пролиферативным потенциалом, и изучение их фенотипических и морфофункциональных особенностей.

Материал и методы

Источники ткани ОБ. Образцы ткани ОБ были получены из операционного материала области верхнего и среднего носового ходов, посылаемого на гистологическое исследование при проведении плановых хирургических вмешательств (БелМАПО, РНПЦ отоларингологии) у 12 пациентов с патологией носа и околоносовых пазух (искривление носовой перегородки). Возраст пациентов 18-45 лет, мужчины и женщины. Площадь образцов - 5-25 мм² (суммарно). Образцы ткани транспортировали и хранили при +4⁰С не более суток в питательной среде

DMEM/F12 (1:1) (Sigma), содержащей антибиотики: гентамицин (100мкг/мл) и амфотерицин Б (10 мкг/мл) (Sigma).

Подготовка клеток для посева, приготовление первичных культур, субкультур. Ткань ОВ промывали в течение нескольких минут в фосфатном буфере, содержащем антибиотики. Ткань механически измельчали на фрагменты размером 1-2 мм², далее подвергали ферментативной обработке растворами 0,5% диспазы1 (Sigma), 0,5% коллагеназы панкреаса краба (Биолот), 0,05% трипсина (Gibco) и их сочетаниями в течение 30-90 мин. Для ткани размера 10 мм² использовали 1 мл раствора ферментов. К дезагрегированной ткани добавляли 5-7 мл среды DMEM/F12, отмывали клетки от ферментов центрифугированием (~200g), резуспензировали в ростовой среде. Клетки культивировали в ростовой среде на основе DMEM/F12, с добавлением эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone), выращивали в пластиковых культуральных флаконах 12,5 см² (BD bioscience) в CO₂-инкубаторе (5% CO₂) при +37°C и влажности 95%. Смену среды осуществляли каждые 3-4 дня. При пассировании культур клетки отделяли от поверхности флакона раствором 0,05% трипсина и 0,02% ЭДТА, пересеивали в дозе 150-200 тыс/мл среды.

Фенотипирование клеток косвенным методом флуоресцирующих антител. В постановке косвенного метода флуоресценции использовали первичные моноклональные антитела в разведении 1:50-1:100 к: нестину; глиальному кислому фибриллярному белку (ГФКБ), цитокератину 18 (K18) (Stem Cell Technologies, Канада), фибронектину (Sigma, США); вторичные антитела, разведение 1:100: козы антикроличьи (AMCA) (Stem Cell Technologies, Канада); кроличьи антимышинные (FITC) (Sigma, США). На покровные стекла наносили 20 мкл суспензии клеток в фосфатном буферном растворе, фиксировали в смеси 4% раствором параформа – 30 мин при комнатной температуре. Стекла промывали фосфатным буферным раствором pH 7,2 (Sigma), просушивали, затем обрабатывали 0,3% раствором тритона X-100 – 5 мин, снова промывали фосфатным буфером. Наносили первичные антитела, инкубировали 2 ч при 37°C, затем после промывки антител, наносили вторичные антитела, инкубировали 30 мин при 37°C, промывали в фосфатном буфере. Клетки в опытных и контрольных препаратах исследовали под люминесцентным микроскопом (Nikon eclipse TS-1000, Япония).

Фенотипирование клеток с помощью метода проточной цитофлуориметрии. В постановке метода проточной цитофлуориметрии использовали антитела к: CD90(FITC), CD105(PE), CD45(PE-Cy7), CD34(APC) (Beckman Coulter), нестину (FITC) (RD system). Клетки в количестве 200-300 тыс. центрифугировали в фосфатном буфере (1000 об/мин) в течение 5

минут, повторяли 2 раза. Клетки резуспендировали в 0,5 мл фосфатного буфера. Для определения экспрессии поверхностных молекул 50 мкл суспензии клеток смешивали с антителами и инкубировали 30 мин при 4°C. Отмывали несвязавшиеся антитела с помощью центрифугирования в фосфатном буфере. Клетки резуспендировали в 400 мкл фосфатного буфера для анализа. Для определения экспрессии цитоплазматических маркеров клетки последовательно фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида (10 мин), пермеализировали в 0,1% растворе сапонины (15 мин), инкубировали с антителами 30 мин при 4°C. Отмывали несвязавшиеся антитела с помощью центрифугирования в фосфатном буфере, резуспендировали в 400 мкл фосфатного буфера. Флуоресценцию регистрировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, США). При анализе проб выделяли регион по параметрам прямого и бокового светорассеяния, в котором анализировали не менее 10000 событий. Для анализа данных использовали программное обеспечение Weasel 3.0. (WEHI, Австралия).

Результаты и обсуждение

Согласно данным литературы, способы накопления биомассы различных типов клеток ОБ имеют свои особенности в зависимости от поставленной на начальном этапе приготовления первичной культуры задачи: выделить популяции, обогащенные обкладочными глиальными, стволовыми и другими типами клеток, или получить гетерогенную по клеточному составу первичную культуру и при дальнейшем пассировании произвести избирательное накопление биомассы определенных типов клеток при создании селективных условий. Важным этапом получения первичной культуры является способ диссоциации исходной ткани на отдельные клетки. Данные литературы свидетельствуют о том, что для этого используют различные протеолитические ферменты и их смеси: коллагеназу, диспазу (13) раствор трипсина и ЭДТА в сочетании с дезоксирибонуклеазой (5) и др. Для повышения степени адгезии клеток различные авторы применяют флаконы, покрытые белками внеклеточного матрикса: коллагеном, ламинином, фибронектином, полиаминокислотами (10, 13). Для последующего культивирования применяют разные по составу питательные среды на основе DMEM, DMEM/F12, альфа-MEM и др. с добавками: сывороткой крупного рогатого скота, ростовыми факторами (EGF, bFGF, NGF, LIF и др.), гормонами (инсулин, трийодтиронин). В наших исследованиях мы использовали среду DMEM/F12 богатую по составу (гормоны, микроэлементы и др.), обеспечивающую питательные потребности, жизнеспособность и высокую пролиферативную активность различных типов клеток.

При получении первичной культуры нами была избрана стратегия получения культур клеток из биоптатов ОВ области средних и верхних носовых ходов человека без направленного выделения определенных типов клеток. С целью оптимизации условий выделения жизнеспособных клеток, имеющих высокий пролиферативный потенциал, были проведены сравнительные исследования диссоциации ткани с использованием следующих ферментов: диспазы 1, коллагеназы панкреаса краба, трипсина и их сочетаний. Установлено, что для диссоциации образцов ткани ОВ на отдельные клетки и их небольшие группы для последующего их прикрепления и пролиферации оптимальными являются условия ферментативной обработки механически измельченной ткани смесью диспазы 1 и коллагеназы панкреаса краба с конечной концентрацией 0,5% в течение 30 мин при 37°C с периодическим пипетированием. В условиях мягкой ферментативной обработки жизнеспособность клеток составляет $87 \pm 5\%$, при этом клетки и фрагменты ткани хорошо (65-75%) адгезируют к поверхности культурального флакона. Увеличение времени инкубации образцов более 30 мин (40-60 мин) приводит к снижению жизнеспособности клеток ($71 \pm 7\%$). Использование трипсина в концентрации 0,5% ведет к наиболее полной диссоциации ткани в течение 30 мин, однако снижает жизнеспособность клеток ($63 \pm 8\%$) и их способность к прикреплению к поверхности флакона.

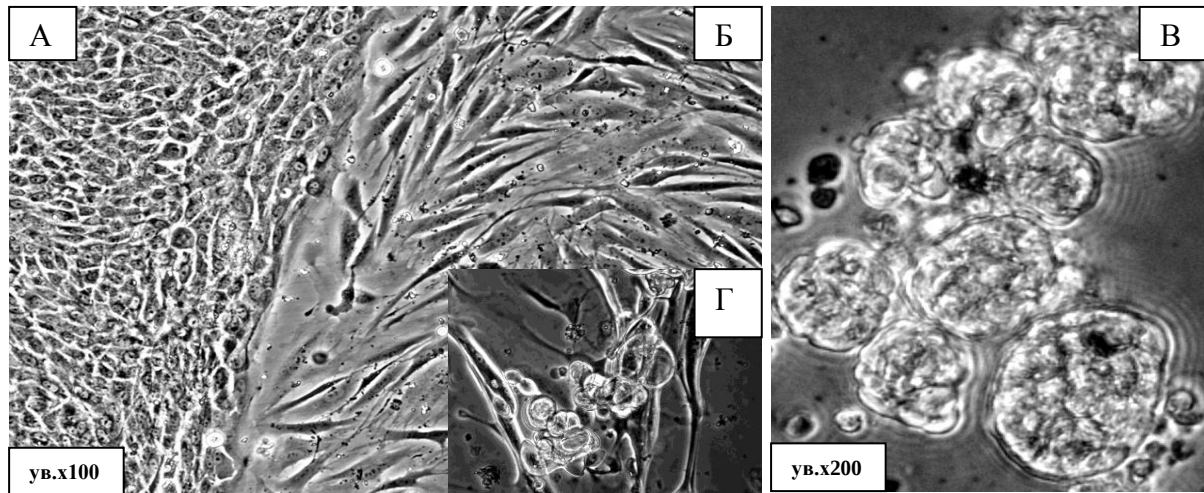
При первичном посеве клеток в количестве не менее 500 тыс в объеме 1 мл ростовой среды DMEM/F12 с добавлением 30% сыворотки адгезия клеток и эксплантатов происходила в течение 1-2 суток. Затем в течение 5 суток ежедневно добавляли свежую ростовую среду, содержащую 10% сыворотки, доводили объем до 5 мл. Данные условия обеспечили поддержание высокого пролиферативного потенциала клеток и образование монослоя, который формировался в течение 10- 14 суток.

Морфологический состав первичных культур ОВ был представлен следующими типами клеток: крупными эпителиоподобными клетками с маленьким ядром и одним-двумя ядрышками (рис.1, А), клетками небольших размеров полигональной формы с длинными ветвящимися отростками и крупным ядром, морфологически сходными с глиальными и фибробластоподобными, веретеновидными клетками (рис.1, Б).

В процессе роста в части культур (5 из 12) на 5-7 сутки выявлялась популяция клеток, формирующая флотирующие структуры в виде цитосфер двух типов. Начало первому их типу давали неприкрепившиеся клетки, растущие в условиях суспензии (рис. 1, В), второму типу – очаги быстро делящихся фибробластоподобных клеток в монослое (рис. 1, Г), единичные из

которых или их кластеры с течением времени отделялись от поверхности и далее пролиферировали в суспензии, формируя цитосферы.

Рис. 1. Морфология культивируемых клеток ОВ человека (первичная культура, 7-е сутки *in vitro*), фазово-контрастная микроскопия.



А - клетки эпителиоподобного морфотипа; Б - фибробластоподобные клетки; В - флотирующие в суспензии цитосферы; Г - очаг быстро делящихся фибробластоподобных клеток в монослое.

В результате фенотипирования популяции культивируемых клеток первичных культур выявлены ГФКБ-, цитокератин 18-, фибронектин - и нестин -положительные клетки. Эти данные свидетельствуют о присутствии в культурах клеток глиальной природы, клеток-предшественников эпителия и фибробластов. Наличие нестин-положительных клеток было характерно для флотирующих цитосфер, что свидетельствует о пролиферации в культуре стволовых и прогениторных клеток.

Таким образом, в течение 10-14 суток культивирования клеток ОВ происходит образование равновесной системы из монослойной и суспензионной частей. При отдельном культивировании клеток цитосфер наблюдается снижение степени их пролиферации в субпассажах, что подтверждает зависимость их функциональной и пролиферативной активности от присутствия других типов клеток ОВ, являющихся продуцентами факторов роста. Это согласуется с данными других исследователей, которые показали, что для культивирования популяции сферообразующих клеток требуется дополнительное внесение ряда ростовых факторов в питательную среду (13).

Установлено, что при субпассировании эпителиоподобные клетки замедляют деление, не пролиферируют более 1-2 пассажей, что свидетельствует о их возможной дифференцировке. Фибробластоподобные клетки ведут себя по иному, при пассировании происходит постепенная селекция клеток по пролиферативной активности и адгезивной способности. Уже на первом пассаже можно отметить, что монослой представлен практически одним морфотипом фибробластоподобных клеток. При фенотипировании клеток 3-его пассажа было установлено, что практически все они экспрессируют маркеры мезенхимальных стволовых клеток CD90 ($98,4 \pm 0,7\%$), CD105 ($95,3 \pm 3,2\%$) (рис. 2, А, В), белок промежуточных филаментов недифференцированных клеток – нестин ($98,7 \pm 0,6\%$ (рис. 2, С). При этом до 25-38% клеток экспрессируют маркер гематопозитических стволовых клеток – CD34 (рис. 2, А), в то же время все клетки отрицательны на CD45 – пан-лейкоцитарный маркер (рис. 2, А). Экспрессия гематопозитического маркера CD34 при отсутствии на поверхности клеток CD45 исключает возможность контаминации исходного образца ткани гематопозитическими стволовыми клетками и позволяет идентифицировать 2-й тип стволовых клеток ОВ.

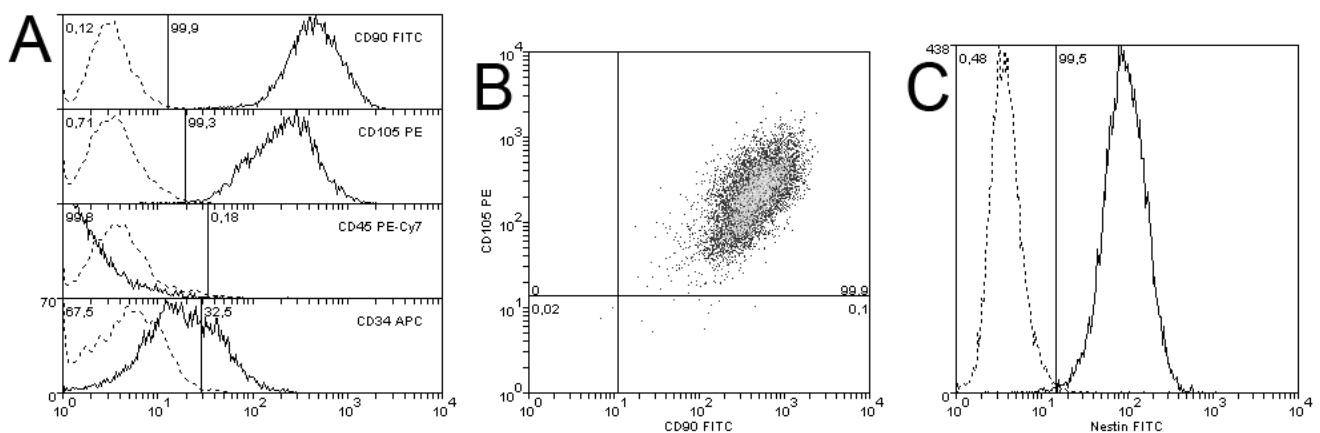


Рис. 2. Экспрессия маркеров мезенхимальных стволовых клеток популяций фибробластоподобных клеток ОВ человека (3-й пассаж, 5-е сутки). А - экспрессия маркеров: CD105, CD90, CD45, CD34; В- экспрессия маркеров: CD90, CD105; С- экспрессия нестина.

Представляют интерес данные о том, что при трансплантации в куриный эмбрион CD34-негативных стволовых клеток ОВ другой популяции, а именно стволовых клеток нейросфер нейроэпителиального происхождения, они через некоторое время начинают экспрессировать данный маркер (13). Вероятно, экспрессия CD34 частью клеток популяции является

приобретенным свойством, вызванным условиями микроокружения и взаимным влиянием различных типов клеток ОБ в процессе культивирования.

На основании выше изложенных данных популяцию фибробластоподобных клеток можно отнести к недавно идентифицированным обонятельным эктомезенхимальным стволовым клеткам (ЭМСК) (18). Установлено расположение ЭМСК в ОБ, а именно - в *lamina propria*, и они, как полагают, ведут свое происхождение из нервного гребня и имеют сходство по характеристикам с мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга, обладают остеогенным и нейрогенным дифференцировочным потенциалом (18, 21).

Результаты наших исследований показали, что ЭМСК были получены во всех случаях из биоптатов области как верхнего, так и среднего носового ходов. Эти данные свидетельствуют о том, что область локализации популяции ЭМСК клеток шире по сравнению с базальными стволовыми клетками и они присутствуют в соединительной ткани как нейро-, так и респираторного эпителия. Общая площадь, занимаемая ОБ у человека, составляет около 500 мм² или 3% площади слизистой оболочки носовой полости, что относительно меньше, чем у других млекопитающих. Обонятельный нейроэпителий человека располагается отдельными участками и не представляет собой непрерывный однородный пласт ткани, а перемежается респираторным эпителием и имеет вид «шахматной доски». Как установлено, площадь нейроэпителия зависит от индивидуальных особенностей и может сокращаться в течение жизни человека под воздействием внешних факторов, перенесенных вирусных инфекций и др. и замещаться респираторным эпителием (22). Поэтому довольно сложно получить образец ткани нейроэпителия без примеси респираторного. Указанные ограничения следует принимать во внимание при получении культур разных популяций стволовых клеток из тканей обонятельной области для их накопления *in vitro* и последующего использования при трансплантации.

Выводы

Разработана технология выделения и культивирования клеток из области средних и нижних раковин носовой полости человека, охарактеризованы фенотипические и морфофункциональные свойства клеток ОБ:

1. Оптимальными условиями дезагрегации биоптатов ОБ на отдельные клетки и фрагменты для их последующего прикрепления и пролиферации является обработка ткани смесью диспазы 1 и коллагеназы панкреаса краба в конечной концентрации 0,5% в течение 30

мин, которые позволяют выделять жизнеспособные клетки с высокой адгезивной способностью.

2. Ростовая среда на основе DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10-% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота позволяет поддерживать рост в культуре различных морфо- и фенотипов клеток ОВ с высокой пролиферативной активностью. Первичная культура клеток ОВ представляет собой гетерогенную популяцию клеток эпителиальной, фибробластной, глиальной природы, а также стволовых и прогениторных клеток.

3. Установлена пролиферация в субкультурах ОВ двух популяций стволовых и прогениторных клеток, получение которых возможно из области верхних и средних носовых ходов: нестин-положительные клетки, формирующие цитосферы; фибробластоподобные ЭМСК, обладающие высоким пролиферативным потенциалом, которые экспрессируют маркеры мезенхимальных стволовых клеток -CD90, CD105, а также CD34 и нестин.

4. Возможность выделения и накопления в условиях культуры биомассы стволовых и прогениторных клеток двух популяций (нейральных и эктомезенхимальных) из ОВ является основой для разработки протоколов лечения при травматических повреждениях и дегенеративных заболеваниях ЦНС, а также других патологиях, путем трансплантации аутологичного клеточного материала.

Список литературы

1. **Викторов И.В., Сухих Г.Т.** Медико-биологические аспекты применения стволовых клеток. Вестник РАМН, 2002, 4: 24–30.
2. **Викторов И.В., Савченко Е.А., Ухова О.В., Алексеева Н.Ю., Чехонин В.П.** Мультипотентные стволовые и прогениторные клетки обонятельного эпителия. Клеточные технологии в биологии и медицине, 2006, 4: 185–193.
3. **Lindsay S.L., Riddell J.S., Barnett S.C.** Olfactory mucosa for transplant-mediated repair: a complex tissue for a complex injury? Glia, 2010, 2, 58: 125–134.
4. **Beites C.L., Kawauchi S., Crocker C.E., Calof A.L.** Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. Exp. Cell Res. 2005, 30: 3309–3316.
5. **Roisen F.J., Klueber K.M., Lu C.L.** Human adult olfactory stem cells. Brain Res., 2001, 890:11-22.
6. **Abrous D., Koehl M., Le Moal. M.** Adult Neurogenesis: From Precursors to Network and Physiology. Physiol. Rev. 2005, 85: 523-569.
7. **Wolozin B., Sunderland T., Zheng B.B., Resau J., Dufy B., Barker J., Swerdlow R., Coon H.** Continuous culture of neuronal cells from adult human olfactory epithelium. J. Mol. Neurosci., 1992, 3:137-146.
8. **Calof A., Mumm J.S., Pim P.C., Shou J.** The neuronal stem cells of the olfactory epithelium. J.Neurobiol., 1998, 36:190-205.
9. **Schwob J.E.** Neural regeneration and the peripheral olfactory system. Anat. Rec., 2002, 269: 33–49.

10. **Hahn C-G, Han L-Y, Rawson NE, Mirza N, Borgmann-Winter K, Lenox RH, Arnold SE.** In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium. *J Comp Neurol*, 2005, 483:154–163.
11. **Mackay-Sim A.** Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa. *Archives Italiennes de Biologie*, 2010, 148: 47-58.
12. **Carter L.A. MacDonald J.L., Roskams A.J.** Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conservative multipotent progenitor phenotype. *J. Neuroscience.*, 2004, 24: 5670–5683.
13. **Murrell W., Feron F., Wetzig A. et all.** Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Develop. Dynam.* 2005; 233(2): 496-515.
14. **Feron F, Perry C, Cochrane J, Licina P, Nowitzke A, Urquhart S, Geraghty T, Mackay-Sim A.** Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain*, 2005, 128: 2951-2960.
15. **Huang H, Chen L, Wang H, Xi H, Gou C, Zhang J, Zhang F, Liu Y.** Safety of fetal olfactory ensheathing cell transplantation in patients with chronic spinal cord injury. A 38-month follow-up with MRI. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* , 2006, 20: 439–443.
16. **Mackay-Sim A., Feron F., Cochrane J, Bassingthwaite L., Bayliss C., Davies W., Fronek P., Gray C., Kerr G., Licina P., Nowitzke A., Perry C., Silburn P. A. S., Urquhart S.** Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial. *Brain*, 2008, 131: 2376-2386.
17. **Lima C., Patas-Vital J., Escada P., Hasse-Ferreira A., Capucho C., Peduzzi J.D.** Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *J. Spinal Cord Med.*, 2006, 29: 191–203.
18. **Tomé M., Lindsay S.L., Riddell J.S., Barnett S.C.** Identification of nonepithelial multipotent cells in the embryonic olfactory mucosa. *Stem Cells*, 2009; 27(9): 2196-2208.
19. **Nivet N., Vignes M., Girard S.D., Pierrisnard C., Baril N., Devèze A., Magnan J., Lanté F., Khrestchatisky M., Féron F., Roman F.S.** Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(7): 2808–2820.
20. **Pandit S. R, Sullivan J. M, Egger V., Borecki A. A, Oleskevich S.** Functional Effects of Adult Human Olfactory Stem Cells on Early-Onset Sensorineural Hearing Loss. *STEM CELLS*, 2011, 6: 670–677.
21. **Delorme B., Nivet E., Gaillard J., Häupl T., Ringe J., Devèze A., Magnan J., Sohier J., Khrestchatisky M., Roman F.S., Charbord P., Sensebé L., Layrolle P., Féron F.** The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev.*, 2010, 19(6): 853-66.
22. **Feron F., Perry C., McGrath J.J., Mackay-Sim A.** New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998, 124:861–866.