Історичні нариси

УДК 616.83-089:611-018.8:616-074/-078:061.6«1962–2012»

Семенова В.М.

Лаборатория культивирования тканей, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, г. Киев, Украина

Лаборатории культивирования тканей Института нейрохирургии — 50 лет

Начало становления и развития метода тканевых культур в Институте нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова относится к 60-м годам. Идея создания такой лаборатории принадлежала академику А.И.Арутюнову и профессору Б.С. Хоминскому — основателю и руководителю отдела нейропатоморфологии. Профессор Б.С. Хоминский высоко ценил метод культивирования тканей, поскольку хорошо знал его возможности. Еще в 1951 г. им опубликованы результаты наблюдений длительного культивирования опухолей мозга человека совместно с А.Д. Тимофеевским, впоследствии академиком — фундатором метода культивирования тканей в бывшем Советском Союзе, автором первой монографии «Эксплантация опухолей человека» (1947). Уже тогда метод культивирования тканей часто использовали для решения спорных вопросов гистогенеза различных опухолей.

Создание подобной лаборатории в Институте первоначально было продиктовано необходимостью получить экспериментальную модель роста опухолей мозга для углубленного изучения биологии этого процесса. С этой целью в 1962 г. по рекомендации проф. Б.С. Хоминского Т.П. Верхоглядова, тогда кандидат медицинских наук, была командирована в Московский институт морфологии человека, в котором успешно освоила этот метод под руководством акад. А.Д. Тимофеевского, и в 1962 г. организовала лабораторию культивирования ткани в Институте. С 1965 г. в лаборатории начала работать врач, научный сотрудник В.М. Семенова.

В 1963 г. получены первые результаты эффективного роста астроцитом в первичных культурах. Со временем под руководством доктора медицинских наук профессора Т.П. Верхоглядовой благодаря ее творческой энергии и энтузиазму лаборатория стала серьезной базой оригинальных экспериментальных исследований как в области нейроонкологии, так и нейробиологии.

Вначале для лаборатории были оборудованы небольшие боксы на территории отдела нейропатоморфологии. Затем лаборатория получила более просторное помещение в смежном одноэтажном корпусе, в котором располагалась тогда лаборатория биохимии, с 1981 г. — лаборатория культивирования тканей размещается в лабораторном корпусе Института.

На протяжении почти двух десятилетий основным научным направлением лаборатории являлось исследование в первичных (эксплантационных) культурах гистобиологических особенностей роста опухолей мозга. Благодаря привлечению комплекса методических приемов (цитохимия нуклеиновых кислот, гликогена, липидов, ряда окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов, цитоспектроморфометрия ДНК) исследованы структурно-метаболические свойства глиом различного генеза, а также архитектоника и активность пролиферации культур роста в зависимости от степени анаплазии исходных опухолей. Так, установлена способность к астроцитарной цитотипической дифференцировке опухолевых клеток изоморфноклеточного варианта глиобластом — наиболее злокачественного типа глиом недифференцированного клеточного состава, что подтвердило их астроцитарный гистогенез (Т.П. Верхоглядова, 1968; В.М. Семенова, 1981).

Внедрение в 1967 г. метода кинематографической регистрации для изучения пролиферации культур позволило наблюдать процессы прижизненного деления опухолевых клеток, а также особенности их реакции на воздействие противоопухолевых препаратов различного механизма действия.

Накопленный обширный экспериментальный материал — 112 наблюдений роста макроглиальных опухолей мозга в культуре ткани с характеристикой их метаболизма и чувствительности к противоопухолевым препаратам проанализирован и обобщен в докторской диссертации Т.П. Верхоглядовой «Макроглиальные опухоли головного мозга (патоморфология, гистохимия, культура ткани)» (1970).

Впоследствии на культурах злокачественных глиом продолжалось тестирование ряда новых противоопухолевых препаратов. Полученные результаты учитывали при разработке индивидуальных схем антибластического лечения нейроонкологических больных. Результаты этих экспериментальных исследований обобщены Ю.Д. Сосновым в докторской диссертации «Комбинированное лечение злокачественных глиальных опухолей больших полушарий головного мозга (хирургическое вмешательство и химиотерапия)» (1981).

На основании анализа результатов исследований, проведенных в культуре ткани, обоснован и апробирован способ контактной химиотерапии глиом с использованием после операции биосовместимого полимерного пленочного депонатора, нагруженного химиопрепаратом. Эти экспериментальные разработки стали основой кандидатской диссертации А.Н. Морозова «Контактная химиотерапия глиом головного мозга с применением пленочного депонатора» (1988).

В первичных культурах изучены особенности пространственной архитектоники и пролиферации

опухолевых клеток таких сравнительно редких опухолей ЦНС, как эпендимомы, эпендимоастроцитомы, олигодендроглиомы, медуллобластомы. Материалы гистологических и гистохимических исследований эпендимом и эпендимоастроцитом обобщены в кандидатской диссертации В.М. Семеновой «Эпендимомы и эпендимоастроцитомы центральной нервной системы (патоморфология, гистохимия, культура ткани)» (1971).

Результаты проведенных профессором Т.П. Верхоглядовой исследований потенций роста менингиом и сарком в условиях культивирования существенно расширили представления о гистобиологических особенностях этих новообразований, что нашло отражение в монографии А.П. Ромоданова, В.Г. Станиславского, Т.П. Верхоглядовой «Саркомы головного мозга» (1977).

Под руководством профессора Т.П. Верхоглядовой в лаборатории выполнена кандидатская диссертация Е.Н. Жмаревой «Индукция и экспериментальное исследование опухолей головного мозга крыс» (1984). В ходе ее выполнения впервые получены культуры штаммов перевивных линий злокачественных глиом, индуцированных путем интрацеребрального введения крысам вируса саркомы Молони. На штаммах этих клеточных линий исследована эффективность антибластических препаратов из ряда нитрозомочевин. Линии 35 и 2211 включены в каталог Всесоюзной коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 1991).

Освоение метода тимидиновой гистоавторадиографии позволило получить количественные характеристики активности роста культивируемых глиом различного генеза и степени анаплазии и благодаря этому объективизировать оценку индивидуальной чувствительности этих опухолей к тестируемым противоопухолевым препаратам (В.М. Семенова, 1980–1983). Важно подчеркнуть, что результаты параллельного тестирования чувствительности глиом к этим же препаратам на модели субкапсулярной гетеротрансплантации фрагментов опухолей мозга подтвердили достоверность прогнозирования ответной реакции культивируемых глиом на их антибластические свойства в эксперименте (Г.М. Олейник, В.М. Семенова, 1988). Полученные данные учитывали при разработке индивидуальных схем антибластической терапии нейроонкологических больных в клинических условиях.

Результаты комплексных экспериментальных разработок по исследованию индивидуальной чувствительности глиом головного мозга на моделях тканевых культур и в субкапсулярном тесте в сочетании с морфологической оценкой признаков лечебного патоморфоза глиом у нейроонкологических больных, которым назначали различные схемы антибластической терапии, на материале биопсий при первичных и повторных операциях обобщены в докторской диссертации В.М. Семеновой «Экспериментально-морфологическая оценка эффективности антибластической терапии глиом головного мозга» (1993).

В последующем метод культивирования тканей применяли для исследования прямого цитотоксического действия на культуры анапластических и злокачественных глиом ряда новых противоопухолевых препаратов по мере их поступления.

В 1992 г. лаборатория культивирования тканей выделена в самостоятельное научное подразделение в связи с началом разработки в Институте ряда новых научных направлений нейробиологии и нейроонкологии: нейротрансплантация, лазерная нейрохирургия, фотодинамическая терапия злокачественных глиом, изучение эффекта воздействия на нейроклетки ЦНС малых доз радиации, исследование пластичности и роли глиального компонента в эпилептогенезе, биологические свойства нейральных стволовых клеток эмбрионального и постнатального мозга. В связи с этим руководство лабораторией было поручено доктору медицинских наук В.М. Семеновой. В этот период лаборатория была оснащена современным на то время оборудованием.

В связи с необходимостью моделирования роста клеток нервной ткани в лаборатории были освоены методы получения диссоциированных и аггрегированных культур из нервной ткани экспериментальных животных различного возраста, разработаны методы получения клеточных фракций, обогащенных нейроцитами и глиоцитами, а также освоен метод совместного культивирования эмбриональных и опухолевых тканей.

Так, в рамках разработки проблемы нейротрансплантации в лаборатории получена культура эмбриональных нейробластов, использованных для субпиальной нейротрансплантации на префронтальную кору мозга крыс в целях коррекции нарушений метаболизма и поведенческих реакций животных с моделированным эквивалентом гипо- и гиперактивности после биорбитальной лейкотомии. После нейротрансплантации культивированных нейробластов от эмбрионов 12–14 нед у животных отмечен положительный лечебный эффект. Наряду с этим, культуру нейронов использовали для нейротрансплантации экспериментальным животным (крысам) в целях устранения агрессивности, индуцированной двусторонней септумэктомией. Результаты этих исследований стали основой кандидатской диссертации Е.И. Слынько «Експериментальна нейрохірургічна корекція поведінкових порушень» (1993), а затем отражены в монографии В.И. Цымбалюка, Т.П. Верхоглядовой, Е.И. Слынько «Нейрохирургическое лечение психических заболеваний» (1997).

В связи с применением в клинических условиях метода нейротрансплантации эмбриональной нервной ткани (ЭНТ) практически важными оказались также исследования по сравнительной оценке жизнеспособности и активности роста культур из фрагментов ЭНТ при различных условиях и длительности ее хранения в питательной среде перед культивированием. Это позволило установить оптимальный режим для сохранения эмбрионального материала перед проведением нейротрансплантации ЭНТ в клинике.

Чернобыльская авария в Украине обусловила особую актуальность выяснения реакции клеток мозга на воздействие малых доз радиации. В связи с этим в лаборатории проводилась серия экспериментов, моделирующих влияние малых доз радионуклида ^{137}Cs и прямого рентгеновского облучения на культуры нейроклеток из мозга новорожденных крыс и эмбрионов пренатального периода. Результаты этих разработок отражены в монографии Ю.П. Зозули, Н.А. Атаманюка, В.А. Барабоя и др. «Хроническое

влияние малых доз облучения на нервную систему. Экспериментальные исследования и клинические наблюдения» (1998).

Начало изучения проблемы эпилептогенеза и роли глиального компонента в формировании эпилептогенного очага в разных структурах головного мозга потребовало отработки методики получения культур, обогащенных глиальными клетками, с преобладанием астроцитов при культивировании фрагментов нервной ткани из различных отделов мозга экспериментальных животных. В полученных культурах идентификация клеток астроглии подтверждена по данным иммуноцитохимических исследований путем выявления в их цитоплазме кислого фибриллярного белка — маркера астроцитов, а клеток нейронального ряда — путем выявления активности нейронэнолазы. Суспензию культивированных глиоцитов использовали для их имплантации в мозг с последующей оценкой биоэлектрической активности мозга в динамике наблюдения за животными и проведением морфологического контроля в целях изучения эффективности приживления и дифференцировки имплантированных нейроклеток. Результаты этих исследований включены в кандидатскую диссертацию К.Р. Костюка «Вплив гетеротопічної алотрансплантації тканини гипокампу на динаміку біоелектричної активності мозку та функціонально-морфологічної інтеграції імплантату з реципієнтом» (1999).

В связи с началом разработки в Институте проблемы иммуногенеза ЦНС в течение ряда лет на культурах глиальных опухолей мозга исследовали иммуноподобные свойства клеток головного мозга в онтогенезе. В рамках этой проблемы изучены реакции клеток культивированных глиом головного мозга на действие клеточных суспензий, обогащенных нейроцитами и глиоцитами, а также их супернатантов. Эти материалы отражены в коллективной монографии Н.И. Лисяного, В.А. Руденко, И.А. Гнедковой и др. «Иммунная система головного мозга» (1999).

В 1996–1999 гг. в лаборатории культивирования тканей под руководством профессора В.Д. Розуменко проведены многоплановые эксперименты по отработке оптимальных режимов достижения эффекта фотодеструкции опухолевых клеток первоначально на культурах экспериментальной перевивной глиомы мозга крыс (штамм 101.8 анапластической глиомы), а затем в культурах глиом мозга человека II–IV степени анаплазии. В сравнительном аспекте на этих культурах тестирована активность различных фотосенсибилизаторов (гематопорфирин, фталоцианин, фотосенс) при разных режимах последующего лазерного облучения культур от различных источников.

В рамках проблемы лаборатории нейроиммунологии по изучению цитокинового статуса нейроонкологических больных в лаборатории культивирования тканей исследован эффект прямого воздействия α-интерферона на опухолевые клетки глиом различной структуры и степени злокачественности в краткосрочных суспензионных культурах с параллельным определением уровня апоптоза в опытных и контрольных культурах.

В последние годы сотрудники лаборатории принимали участие в комплексных исследованиях по изучению пролиферативных свойств и направленной дифференцировки нейральных стволовых клеток (НСК) из различных регенеративных зон эмбрионального и постнатального мозга экспериментальных животных и человека. Эти разработки включены в монографию В.И. Цымбалюка, В.В. Медведева «Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток» (2005). Большое внимание уделено отработке методики культивирования НСК из обонятельной луковицы человека и животных, которая, по последним данным, является резервуаром дифференцирующихся НСК. Результаты исследования пролиферативного и дифференцировочного потенциала НСК из обонятельной луковицы крыс в условиях культивирования позволили использовать суспензию этих нейроклеток в составе полимерного нейрогеля в комплексе лечения травматического повреждения спинного мозга крыс с положительным эффектом. Эти наблюдения, подтвержденные нейрофизиологическим документированием динамики восстановления моторной функции экспериментальных животных, стали основой кандидатской диссертации В.В. Медведева «Вплив імплантації синтетичного макропористого гідрогеля та трансплантації клітин нюхової цибулини на процеси регенерації спинного мозку після його травматичного пошкодження в експерименті» (2008), в последующем включены в монографию В.И. Цымбалюка, В.В. Медведева «Спинной мозг. Элегия надежды» (2009).

При разработке проблемы по изучению профиля генетических нарушений в опухолевых клетках нейроэктодермальных и соединительнотканных опухолей головного мозга для получения популяции опухолевых клеток, освобожденной от клеток сосудисто-соединительнотканного компонента, привлечена модель первичных культур, поскольку зона роста эксплантатов глиом формируется преимущественно опухолевыми клетками, обладающими наиболее высокой миграционной и пролиферативной активностью в условиях культивирования. Получение такой очищенной фракции опухолевых клеток способствовало более дифференцированной оценке особенностей генетических нарушений в изученных опухолях.

В настоящее время в связи с активной разработкой в экспериментальной онкологии методов биотерапии, все шире использующихся в комплексе лечения общеонкологических заболеваний, на культурах глиом проводятся эксперименты по тестированию активности иммуномодуляторов с противоопухолевыми свойствами, а также биологически активних соединений, полученных из различных тканевых фракций эмбрионального и постнатального мозга экспериментальных животных.

Интенсивное развитие в мировой науке методов тканевой терапии и ее применение в лечении ряда труднокурабельных заболеваний ЦНС (нейродегенеративных, дисгенетических, ишемических и др.) диктует необходимость разработки рациональных методов получения клеточного материала (стволовых клеток) из альтернативных источников. С этой целью в настоящее время в Институте начаты исследования по изучению биологии мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделяемых из стромального компонента жировой ткани. Эти исследования направлены на разработку рациональных методов индуцированной дифференцировки МСК в нейроген-

ном направлении с последующим их использованием для нейротрансплантации при ряде моделированных в эксперименте заболеваний ЦНС.

Результаты проведенных в лаборатории исследований неоднократно обсуждались на конференциях, съездах нейрохирургов Украины и России, симпозиумах специалистов Ассоциации клеточных культур Российской Академии Наук. Материалы по разработке теоретических и практических вопросов нейробиологии и нейроонкологии с привлечением метода тканевых культур освещены более чем в 130 публикациях и включены в 4 докторские, 9 кандидатских диссертаций и 7 монографий.

На всех этапах работы лаборатории ее ведущие сотрудники профессор Т.П. Верхоглядова и доктор медицинских наук ныне профессор В.М. Семенова постоянно принимали участие в консультативной диагностической работе биопсийного материала, а также выполнении патоморфологических фрагментов разноплановой научной тематики, разрабатываемой в Институте.

Под руководством профессора Т.П. Верхоглядовой выполнены и защищены 18 кандидатских и 5 докторских диссертаций. Профессор Т.П. Верхоглядова — автор более 150 научных публикаций и соавтор 5 монографий. Под руководством доктора медицинских наук профессора В.М. Семеновой выполнены морфологические фрагменты 5 кандидатских диссертаций. Она является автором 270 научных публикаций и соавтором 7 монографий.

Культуральные исследования успешно осуществляют высококвалифицированные сотрудники лаборатории. В разное время в лаборатории трудились лаборанты Е. Симиренко, Г. Кудрицкая, О. Плахтий. С 1992 г. в лаборатории работает выпускница Киевского государственного университета биолог-цитолог Л.П. Стайно, которая проявила прекрасные способности в работе с культурами, является соавтором 57 научных публикаций. Гистологическую обработку культурального и тканевого материала в настоящее время осуществляет старший лаборант с высшим биологическим образованием О.В. Шевчук. В 2007–2009 гг. в лаборатории трудилась младший научный сотрудник Г.Е. Читаева, которая является соавтором 15 научных публикаций. С 2010 г. в лаборатории работает младший научный сотрудник Д.М. Егорова.

Таким образом, на всех этапах деятельности лаборатория культивирования тканей вносит весомый вклад в разработку разноплановых проблем научной тематики Института.