

Исследование мультипотентных свойств нейроцитов субвентрикулярной зоны эмбрионального мозга в условиях культивирования

Study of Multipotent Properties of Neurocells of Subventricular Zone of Embryonic Brain During Culturing

Представлен анализ литературы по биологии нейральных стволовых клеток (НСК) субвентрикулярной зоны (СВЗ) боковых желудочков эмбрионального головного мозга и собственные наблюдения по культивированию фрагментов СВЗ эмбрионального мозга экспериментальных животных. Обсуждаются гистобиологические свойства и мультипотентность спонтанной дифференцировки культивируемых НСК в нейрональном и глиальном направлениях.

Ключевые слова: нейральные стволовые клетки, нейрогенез, субвентрикулярная зона, культивирование клеток, эмбриональная нервная ткань.

Наведено аналіз літератури щодо біології нейральних стовбурових клітин (НСК) субвентрикулярної зони (СВЗ) бокових шлуночків головного мозку і дані власних досліджень з культивування на адгезивному субстраті фрагментів СВЗ ембріонального мозку експериментальних тварин. Показано біологічні властивості та мультипотентність диференціювання ембріональних НСК в нейрональному та гліальному напрямках в умовах культивування.

Ключові слова: нейральні стовбурові клітини, нейрогенез, субвентрикулярна зона, культивування клітин, ембріональна нервова тканина.

There is presented the analysis of literature on the biology of neural stem cells (NSCs) of subventricular zone (SZ) of lateral ventricles of brain and the own findings on culturing of SZ fragments of embryonic brain of experimental animals on an adhesive substrate. The biological properties and multipotency of differentiation of embryonic NSCs in neuronal and glial directions under culturing have been shown.

Key-words: neural stem cells, neurogenesis, subventricular zone, cell culturing, embryonic nerve tissue.

Успехи современной нейробиологии позволяют надеяться на повышение эффективности лечения ряда дегенеративных заболеваний нервной системы с помощью заместительной клеточной терапии с использованием нейральных стволовых клеток (НСК). Это обуславливает актуальность экспериментального исследования потенциальных свойств НСК различных регионов головного мозга. Возможность сохранения нейрогенеза в постнатальной ЦНС млекопитающих и человека в настоящее время доказана. В зрелом мозге установлено не менее 4-х нейрогенераторных регионов: зубчатая извилина гиппокампа, обонятельная луковица, субэпендимарная зона спинного мозга, субвентрикулярная зона (СВЗ) боковых желудочков, наиболее изученная и рассматриваемая как поздний герминативный матрикс эмбрионального мозга, в котором локальное клеточно-молекулярное микроокружение (стволовые ниши) поддерживает нейрогенез путем пролиферации мультипотентных НСК и нейральных прогениторов [3, 7].

В СВЗ взрослого мозга человека НСК персистируют в СВЗ по ходу всей желудочковой системы

мозга в количестве около 1% полноценных НСК клеток и 1% от 1×10^5 митотических клеток, при этом половина их подвергается спонтанной гибели [14]. Предполагается как интраэпендимарная, так и субвентрикулярная локализации НСК [6, 9]. Считается, что практически в каждом послеоперационном образце из СВЗ взрослых пациентов выявляются мелкие и крупные нейросферы из НСК, окруженные плотным матриксом из фидерного слоя астроглии, формирующего стволовую нишу [10]. Установлена также стойкая направленность к глиальной дифференцировке НСК в пределах СВЗ мозга в постнатальном периоде, что подтверждается секрецией ими глиогенных факторов FGF, TGF и BMP при сохранении возможности нейронального пути развития. Выявленные в нейроцитах СВЗ маркеры НСК Musashi-1, нестин, виментин, GFAP и Noggin указывают на гетерогенность ее клеточного состава с наличием не менее 2-х пролиферирующих популяций, различающихся по кинетическому профилю [4]. Преобладание глиогенной "настроенности" НСК в СВЗ наблюдается также при различной патологии головного мозга и

ГУ "Институт нейрохирургии им. акад. Ромоданова АМН Украины", г. Киев

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Мануильского, 32, г. Киев, Украина 04050; тел.:+38 (044) 483-92-08

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

* To whom correspondence should be addressed: 32, Manuilskogo str., Kharkov, Ukraine 04050; tel.:+380 44 4839208

связано с повышением концентрации двух пролиогенных факторов: FGF и EGF [9].

В экспериментах показано регуляторное влияние факторов роста на потенциальные свойства НСК из СВЗ. Так, внутрижелудочковое введение рекомбинантного EGF стимулирует повышение пролиферативной активности НСК в СВЗ в отличие от субгранулярной зоны зубчатой извилины. После аналогичного введения FGF-2 количество нейроцитов повышалось в обеих регенераторных зонах [6]. Увеличение нейрогенных прогениторов стимулируют факторы роста BDNF [2], CNTF [15], а также Noggin [12]. Введение в спинномозговую жидкость EGF, FGF-2 и гепарина увеличивает пролиферативную активность НСК в СВЗ четвертого желудочка зрелой мыши [12].

Установлена также способность НСК к направленной миграции к патологическому очагу в мозге. При эпилептическом статусе у взрослых крыс [13] активируется миграция нейроцитов и нейроцитов-предшественников из СВЗ в ольфакторную луковицу (ОЛ). Повреждение коры головного мозга мыши угнетает миграцию НСК из СВЗ в ОЛ, но стимулирует ее из СВЗ в очаг повреждения мозга. Направленная миграция нейрональных предшественников из СВЗ в поврежденный участок мозга провоцируется введением TGF α [5]. Транзиторная ишемия переднего мозга крысы усиливает пролиферацию НСК СВЗ и их миграцию к ОЛ с активацией глиальных предшественников [8]. Таким образом, НСК в топографически различных участках СВЗ обладают регионарной неоднородностью и различными функциональными свойствами. В связи с этим интенсивно изучается влияние различных биологических факторов на миграцию НСК.

Цель работы – изучение в условиях культивирования гистобиологических свойств нейроцитов, выделенных из СВЗ боковых желудочков эмбрионального мозга экспериментальных животных. При постановке задач мы учитывали, что в СВЗ наиболее содержится НСК, а их культивирование на адгезивном субстрате создает условия для проявлений морфогенеза и спонтанной генетически детерминированной дифференцировки.

Материалы и методы

Фрагменты эмбриональной нервной ткани (ЭНТ) из СВЗ мозга экспериментальных животных кроликов ($n = 5$) и крыс ($n = 5$) культивировались на покровных стеклах, покрытых полиэтиленгликолем, в питательной среде стандартного состава и условий содержания [1]. Культуры наблюдали прижизненно в инвертированном микроскопе БИОЛАМ П-3 и изучали на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином Караччи и тионином по

Нисслию на цитоанализаторе изображения Ibas-2000 (Германия) с последующей микрофоторегистрацией.

Результаты и обсуждение

В динамике наблюдения культур прослежены последовательные стадии трансформации нейроцитов из первоначально безотростчатых форм с минимальным фенотипом в клетки нейронального и глиального ряда. В первые дни культивирования в центральных отделах разрыхляющихся микроагрегатов наблюдались признаки митотического деления части нейроцитов, постепенная регенерация их отростков и миграция в зону роста культур. Затем на территории разрыхленных микроэксплантатов появлялись комплексы медуллобластов, окруженные эпителиоподобным монослоем мало дифференцированных глиоцитов с персистирующими на его поверхности островками нейроцитов униполярной или пирамидальной формы. В последующем медуллобласты превращались в более зрелые формы нейроцитов мультиполярной формы с хорошо развитыми отростками, что отражает фенотипическую дифференцировку НСК по нейрональному типу. На 27–30 сутки наблюдалось заметное удлинение отростков нейроцитов с признаками ветвления в связи с реализацией программы терминальной нейрональной дифференцировки.

В динамике культивирования прослеживалась также нарастающая цитотипическая дифференцировка глиоцитов, которые к 14–20 сутки формировали сетевидные разрастания преимущественно протоплазматических астроцитов звездчатой формы с множественными отростками. Реже определялись нейроциты олигодендроцитарного фенотипа. Обнаружены также многоядерные клеточные комплексы, имитирующие эпендимарный покров желудочков мозга с тенденцией к ориентированному расположению нейроцитов униполярной формы с базальным отростком и хорошо выраженной апикальной цитоплазмой.

Выводы

Проведенные исследования показали, что на адгезивном субстрате в культурах ЭНТ из СВЗ экспериментальных животных проявляется способность части нейроцитов к пролиферации и к спонтанной дифференцировке в нейрональном и глиальном направлениях. Первоначально переживающие в микроэксплантатах комплексы медуллобластов постепенно дифференцируются в основные фенотипические типы нейроцитов униполярной, пирамидной и мультиполярной формы с длинными отростками с признаками ветвления. Длительное переживание нейроцитов на поверхности глиаль-

ного монослоя согласуется с общеизвестным положением о трофической роли глии в обеспечении жизнедеятельности нейронов. Эти наблюдения подтверждают также установленный факт, что в условиях культивирования происходит ускоренная дифференцировка эмбриональных нейроклеток в нейроны в течение 10–15 дней, тогда как в эмбрионе аналогичный процесс занимает 5–7 недель. Как известно, спонтанная дифференцировка *in vitro* представляет одно из характерных свойств эмбриональных стволовых клеток, в том числе эмбриональных НСК.

В культурах нейроклеток из СВЗ прослеживается также дифференцировка глиальных предшественников в зрелые протоплазматические астроциты, олигодендроциты и эпендимоциты. При визуальной оценке долевого распределения дифференцированных нейроклеток по их фенотипу в поздние сроки культивирования отчетливо выявляется количественное преобладание клеток астроцитарной глии, что отражает свойство стойкой “глиальной настроенности” большинства НСК. Это подтверждается их способностью к секреции ряда глиогенных факторов при сохранении ими и нейронального пути дифференцировки.

Таким образом, в культурах СВЗ эмбрионального мозга на адгезивном субстрате воспроизводятся гистобиологические свойства прогениторных популяций – пролиферация, миграция и генетически детерминированная дифференцировка постмитотических клеток в направлении нейронов, астроцитов, олигодендроцитов и эпендимоцитов, что подтверждает их мультипотентные свойства.

Литература

1. Божкова В.П. и др. Руководство по культивированию нервной ткани: Методы. Техника. Проблемы.– М.: Наука, 1988.– 316 с.
2. Benraiss A., Lerner K., Chmielnicki E. et al. Adenoviral transduction of the ventricular wall with a BDNF expression vector induced neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain // *Mol. Ther.*– 2000.– Vol. 1, N1.– P. 35–36.

3. Doetsch F., Caille I., Lim D.A. et al. A subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain // *Cell.*– 1999.– Vol. 97, N6.– P. 1–20.
4. Doetsch F., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain // *J. Neurosci.*– 1997.– Vol. 17, N13.– P. 5046–5061.
5. Fallon J., Reid S., Kinyamu R. et al. *In vivo* induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 2000.– Vol. 97, N26.– P. 14686–14691.
6. Gage F.H. Mammalian neural stem cells // *Science.*– 2000.– Vol. 287, N 5457.– P. 1433–1438.
7. Gritti A., Bonfanti L., Doetsch F. et al. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents // *J. Neurosci.*– 2001.– Vol. 22, N2.– P. 437–445.
8. Iwai M., Salo K., Kamada H. et al. Temporal profile of stem cells division, migration, and differentiation from subventricular zone to olfactory bulb after transient forebrain ischemia in gerbils // *J. Cereb. Blood Flow Metab.*– 2003.– Vol. 23, N3.– P. 331–341.
9. Johansson C.B., Momba S., Clake D.L. et al. Identification of neural stem cell in the adult mammalian central nervous system // *Cell.*– 1999.– Vol. 96, N1.– P. 25–34.
10. Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O. et al. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain // *Exp. Neurol.*– 1999.– Vol. 156, N2.– P. 333–344.
11. Lim D.A., Tramontin A.D., Trevejo J.M. et al. Noggin antagonizes BMP signalling to create a niche for adult neurogenesis // *Neuron.*– 2000.– Vol. 28, N3.– P. 713–726.
12. Martens D.J., Seaberg R.M., van der Kooy D. *In vivo* infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitor around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord // *Eur. J. Neurosci.*– 2002.– Vol. 16, N6.– P. 1045–1057.
13. Parent J.M., Valentin V.V., Lowenstein D.H. Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway // *J. Neurosci.*– 2002.– Vol. 22, N8.– P. 3174–3188.
14. Sanai N., Tramontin A.D., Quinones-Hinojosa A. et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration // *Nature.*– 2004.– Vol. 427, N 6976.– P. 740–744.
15. Temple S. The development of neural stem cells // *Nature.*– 2001.– Vol. 414, N6859.– P. 112–117.

Поступила 30.05.2008