

О.А.Рибачук, Т.А. Півнева

## Роль нейральних стовбурових клітин в регенерації центральної нервової системи

*Центральна нервова система (ЦНС) дорослих ссавців, а також і людей, є типовим прикладом органів, які не відновлюються. Проте нині зростає інтерес до розвитку інноваційних методів лікування, які спрямовані на регенерацію пошкодженої тканини ЦНС, основою яких є досягнення в галузі стовбурових клітин та неврології. Відновлення нормального розвитку нервової системи стало життєво важливою стратегією регенерації ЦНС. Нормальний розвиток ЦНС ініціюється індукцією стовбурових клітин у ній, тобто нейральних стовбурових клітин (НСК). Таким чином, введення або мобілізація НСК, як очікується, може регенерувати ЦНС активацією як ендогенної регенерації, так і трансплантацією НСК. Огляд висвітлює останні дані вивчення фундаментальної біології стовбурових клітин, механізми онтогенетичного розвитку, перспективи ідентифікації, потенціал диференціації, а також їх терапевтичне застосування.*

*Ключові слова: ембріональні стовбурові клітини, нейральні стовбурові клітини, нейрогенез, нейросфери, індукція плюрипотентних стовбурових клітин.*

### ВСТУП

Нейральні стовбурові клітини (НСК), чи стовбурові клітини центральної нервової системи (ЦНС) – клітини, що мають потенціал диференціюватися у нейрони, астроцити та олігодендроцити, а також самовідновлюватися для забезпечення потрібної кількості клітин у мозку [35, 42]. Мозок традиційно не розглядався як система, що містить стовбурові клітини (СК), через парадигму про те, що ця тканина не здатна до регенерації. Більше як 80 років тому Ramon у Cajal [48] написав: “коли розвиток було закінчено, першоджерело росту та регенерації ... зникло безповоротно”. Цей постулат називається “догма Cajal”. Отже, дослідники намагаються спростувати цю догму, користуючись останніми досягненнями біонауки та медицини, особливо у галузі стовбурових клітинних технологій [39, 40]

Нейроонтогенез нейральних стовбурових клітин. Не так давно були знову переглянуті оригінальні спостереження про те, що у деяких ділянках мозку дорослого організму

відбувається нейрогенез, та доповнені дослідженнями з ідентифікації прогеніторних клітин, відповідальних за ембріональний і постнатальний розвиток нейронів. Нині у ЦНС хребетних мультипотентні клітини ідентифіковані як *in vitro*, так і *in vivo*. Лінійні експерименти *in vitro* показали, що нейрони та глія можуть бути отримані із спільного ембріонального попередника; ЦНС дорослого організму також містить мультипотентні попередники для нейронів, астроцитів та олігодендроцитів [5, 31] (рисунок).

На ранньому етапі ембріонального розвитку НСК представлені як нейроепітеліальні (чи клітини матриці) в нервовій трубці, яка симетрично ділиться [17]. Згодом, на початку нейрогенезу, вони існують у вигляді радіальної глії (чи як клітини матриці) у вентрикулярній зоні (VZ) нервової трубки [47]. Останні дослідження показали, що НСК продовжують нейрогенез у дорослих ссавців [29, 57] та у людини [16, 46]. Результати цих досліджень (наявність НСК у ЦНС дорослого організму) дали змогу припустити потенційну терапев-

тичну стратегію з використанням НСК для регенерації пошкоджених тканин ЦНС [41].

Дослідники показують, що нервова тканина ссавців (у тому числі і людини) протягом I триместра вагітності на 90 % складається із нейральних стовбурових та прогеніторних клітин. НСК наявні у вентрикулярній зоні, стріатумі та корі ембріонального мозку. Нейральні прогеніторні клітини наявні у постнатальному мозку людини та ссавців, завдяки їм може здійснюватися оновлення / або відновлення тканин і органів, проте кількість зон мозку, в яких відбувається регенерація нейронів, є лімітованою [1–3, 64].

Стосовно нейроонтогенезу, то вже на ранніх етапах ембріонального розвитку клітинний склад нервової тканини є неоднорідним у відношенні генетичної експресії. При подальшому розвитку клітини поступово диференціюються в окремі типи та види. Певні зміни відбуваються і в популяції нейральних стовбурових та прогеніторних клітин ЦНС. Як різні типи нейронів і глії диференціюються (генеруються) з НСК чи прогеніторних клітин протягом розвитку ЦНС – є найважливішим питанням вивчення нейробіології [43]. Потенціал диференціації НСК, як відомо,

контролюється просторовими та часовими регулювальними механізмами під час онтогенетичного розвитку ЦНС [58].

На стадії одношарового призматичного нейроепітелію відбувається функціональне відокремлення СК, які здатні підтримувати свій прогеніторний потенціал. Ці клітини і є НСК. Точно невідомо, скільки поколінь відділяє первинні НСК від прогеніторів нервової тканини. Іншими словами, чи існують частково детерміновані СК і в чому виражається така детермінація?

Як показали дослідження особливостей росту СК у культурі ізольованих на різних ділянках ЦНС зародків щура, НСК розвиваються в зрілі нейроти [58]. Більше того, нейросфери, отримані при культивуванні різнотопічних варіантів НСК, експресують специфічні регіональні маркери [59].

Проводилися дослідження проліферативної активності та нейрального потенціалу НСК, ізольованих з рострального кінця нервової трубки 9-тижневого зародка людини. Спостерігали активне утворення нейросфер, клітини яких давали ріст нейронам, астроцитам та олігодендроцитам, тобто проявляли мультипотентність. При цьому

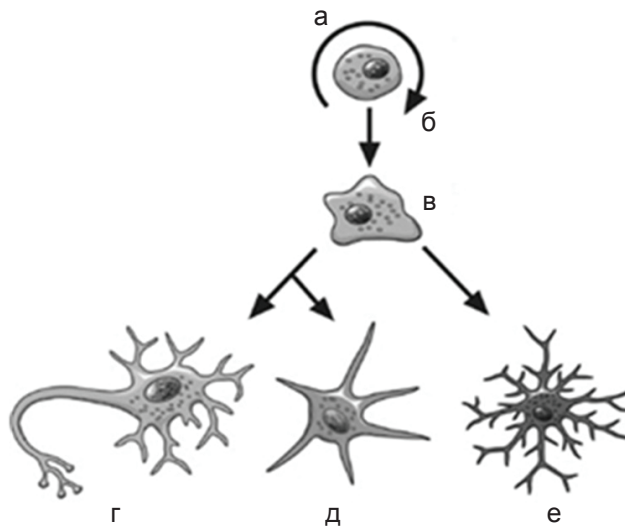


Схема диференціації загального ембріонального мультипотентного попередника в центральній нервовій системі:

а – клітинний родовід; б – власне поновлювальні стовбурові клітини; в – ранні прогеніторні клітини; г – нейрон; д – олігодендроцит; е – астроцит

вдалося встановити дві суттєві відмінності між СК різних відділів головного мозку. По-перше, НСК, ізольовані із ростральних ділянок нервової трубки, проявляли більшу проліферативну активність, ніж нейральні клітини каудальних відділів головного мозку [55]. По-друге, в однакових умовах культивування серед нейронального потомства нейральних клітин середнього та проміжного мозку більшою мірою визначалися нейрони, які експресують тирозингідроксилазу (ТН). При цьому ТН-позитивні нейрони, отримані із нейральних клітин проміжного та середнього мозку, характеризувалися великим розміром, мультиполярністю та відсутністю експресії гама-аміномасляної кислоти, тобто бути дофамінергічними нейронами [23]. Таким чином, зберігаючи широту лінійної диференціації, НСК під час нейроонтогенезу підлягають просторовій специфікації.

Кількість НСК у загальній масі клітин нейроепітеліального типу під час ембріогенезу прогресивно зменшується. Топологія їхнього розташування на початку нейруляції, а також здатність НСК до міграції між різними ділянками ЦНС в більш пізні періоди нейроонтогенезу залишається невивченими. Проте на сьогодні відомо, що міграція НСК тісно пов'язана з їх мультипотентним статусом. Встановлено, що висока активність промотору гена нестину корелює з активністю експресії  $\alpha 5\beta 1$ -інтегрину [65]. Це означає, що останній є специфічним для НСК фактором поверхневої адгезії і може брати участь у забезпеченні їх міграції. Відомо, що НСК експресують також і інший фактор адгезії – білок PSA-NCAM, який визначає їх міграцію і, можливо, відіграє роль у стабілізації потентного статусу цих клітин [18].

Можливо, що НСК на стадіях спеціалізації нейроцитів під час нейроонтогенезу набувають певний досвід відносно реалізації різних варіантів топологічної інформації, завдяки чому поступово розширюється набір варіантів топологічних перебудов тканини мозку. Слід зазначити, що інтенсивний нейро-

генез у різних ділянках кори великих півкуль людини продовжується до 7-го року життя. Протягом цього періоду число кіркових нейронів збільшується майже удвічі.

Докази нейрогенезу в ЦНС дорослих особин. Уперше явище нейрогенезу у мозку дорослих ссавців вказав Altman [4], який за допомогою методу тимідинової гістоавтордіографії виявив НСК у передньому мозку мишей та їх міграцію у нюхову цибулину з наступним формуванням у ній зрілих нейронів. Пізніше, у 1990-ті роки, ці дані були підтверджені в експериментальних роботах з використанням нових методів мічення проліферуючих клітин нервової системи (ретровірус, бромдезоксипуридин – маркер S-фази клітинного циклу). Так, після ін'єкції ретровірусної мітки у різні ділянки субвентрикулярної зони мозку ссавців імуногістохімічно визначали експресію  $\beta$ -галактидази у нащадків інфікованих клітин [33]. Це означає, що окремі регіони передньої частини субвентрикулярної зони генерують велику кількість НСК, які цілеспрямовано мігрують у нюхову цибулину і диференціюються там у локальні гранулярні та перигранулярні нейрони – два важливі типи інтернейронів нюхової цибулини. Інші дослідники вказують, що після ретровірусного мічення НСК субвентрикулярної зони мозку щурів з застосуванням відеомікроскопії зрізів на різних рівнях було виявлено два напрямки міграції прогеніторних мічених клітин: 1 – радіальний – в білу речовину та кору мозку з диференціацією у астроцити та олігодендроцити; 2 – рострально-каудальний – у нюхову цибулину з трансформацією у інтернейрони [56]. Таким чином, була доведена різноспрямована міграція із субвентрикулярної зони клітин-попередників глії та нейронів.

Крім того, був також встановлений факт утворення нових нейронів у зубчастій звивині гіпокампа дорослих ссавців [13].

Накопичені дані різносторонніх експериментальних досліджень підтвердили наявність регіональних НСК та їх попе-

редників у різних відділах нервової системи дорослих ссавців і людини та довели, що вони є джерелом трьох диференційованих типів спеціалізованих клітин як *in vitro*, так і *in vivo*. Розробка методів виділення, ідентифікації та клонування регіональних НСК і клітин-попередників нейронів і глії відкрила широкі можливості для проведення численних експериментів з їх внутрішньомозковою трансплантацією та сприяла поглибленню і накопиченню знань про біологію цих клітин [10, 11, 15, 21, 62]. Нині ці дослідження стали одними з найбільш перспективних в експериментальній і клінічній нейротрансплантології, які стрімко розвиваються.

Уперше клітини ЦНС дорослих особин, що мали здатність диференціюватися *in vitro* у три основні фенотипи клітин, були виділені зі стріаторної зони мозку мишей та названі клітинами-попередниками нервових клітин [49]. Вони виявились імунореактивними відносно нестину – унікального маркера білка проміжних нейрофіламентів і показали здатність диференціюватися у нейрони, астроцити та олігодендроцити *in vitro*. Таким чином, нестин був названим маркером недиференційованих НСК у ЦНС. Були також ідентифіковані інші селективні маркери молекул НСК, зокрема Musashi1, що належать Sox-антитілам, які експресуються у недиференційованих НСК у ЦНС. Musashi1 – білок, який специфічно експресується в НСК як в ембріональній, так і в постнатальній ЦНС та ідентифікований як білок, що еволюційно належить до RNA-зв'язаних білків [19, 28, 37, 38, 51, 52].

Надалі попередники нервових клітин були виділені також і з інших зон ЦНС дорослих гризунів: з головного мозку мишей [50]; із субвентрикулярної зони мишей [36] і щурів [45]; із гіпокампа щурів [8]; із перегородки та стріатума щурів [45]; з нюхової цибулини і рострального подовження субвентрикулярної зони мозку мишей [20], а також із різних відділів спинного мозку мишей і щурів, у тому числі із перивентрикулярної зони [27].

Виявлення НСК у ЦНС дорослої людини становить особливий інтерес. НСК знайдені у субвентрикулярній зоні мозку [8], у гіпокампі [12], в корі головного мозку [8], в нюховій цибулині [44]. Таким чином, виявлення СК та клітин-попередників у різних ділянках ЦНС дорослих індивідуумів було безсумнівним доказом того, що процеси нейрогенезу та гліогенезу здійснюються протягом усього постнатального життя людини.

Ці дослідження дали змогу багато дізнатися про резервні можливості ЦНС та по-новому поглянути на патофізіологію ЦНС. Вони стимулювали розгортання широкомасштабних експериментальних досліджень з вивчення регуляторних механізмів проліферації НСК, особливостей їх просторової міграції та кінцевої диференціації у різних відділах мозку, а також дали можливість виявити такі унікальні властивості НСК, як пластичність і трансдиференціація.

Таким чином, показано, що НСК, будучи ендогенними попередниками нейрональних та гліальних клітинних типів ЦНС, можуть відігравати певну роль у цитогенезі та гістогенезі головного мозку дорослих індивідуумів. Водночас вплив різних позаклітинних факторів локального мікрооточення через каскадні системи передачі сигналів зумовлює життєзабезпечення, самовідновлення, спрямовану міграцію та термінальну диференціацію у нейрони та специфічні види глії, які поповнюють відповідні клітинні пули в ембріональному та дорослому мозку ссавців і людини. Проте регуляторні молекулярні механізми самовідновлення та диференціації ендогенних НСК, а також позаклітинні фактори їх активації та інгібування поки що до кінця не розкриті та інтенсивно досліджуються.

Як відомо, НСК мають три основні ознаки, патогнологічні для СК: здатність до самовідновлення у постмітотичному поколінні, до міграції та до трансмітотичної термінальної диференціації. Проте, на відміну від СК, у НСК менший проліферативний потенціал та обмежене число поділів [18].

Відомо, що НСК відносяться до мультипотентних регіональних СК, які при симетричному поділі самовідновлюються, а при асиметричному – здатні відновлювати різні типи клітин однієї лінії диференціації – нейрональні та гліальні клітини. У цьому разі, одна із дочірніх клітин залишається стовбуровою, а інша комітується та входить у диференціацію під впливом локальних медіаторів міжклітинної взаємодії (цитокінів) та факторів росту. Безпосередніми нащадками мультипотентних НСК є клітини-прогенітори, з певним та обмеженим сектором диференціації, формуючи однотипово диференційований пул клітин – нейронів чи глії.

Нейральні стовбурові клітини при старінні. Наявність НСК у тканині головного мозку протягом усього життя людини є неспростовним фактом. Проте поки що, з незрозумілих причин, швидкість нейрогенезу у SVZ-бічних шлуночках та SGZ зубчастої фасції головного мозку ссавців з віком поступово зменшується [32]. НСК, які ізолювали з SVZ-бічних шлуночків старих щурів, за культуральними властивостями нічим не відрізнялись від НСК переднього мозку молодих тварин.

Деякі вчені вважають, що зниження проліферативної та нейральної активності зубчастої фасції старих тварин пов'язано з порушенням гормонального балансу в період старіння [35]. Інші ж показують, що зниження нейрогенезу в похилому віці може бути пов'язано зі зменшенням кількості НСК головного мозку, подовженням тривалості клітинного циклу комітованих нейрональних і гліальних попередників, а також зі збільшенням концентрації клітинних інгібіторів проліферації прогеніторів. Дослідники показали, що як специфічний маркер G<sub>1</sub>-періоду клітинного циклу може використовуватися фактор реплікації MCM2. Виявилось, що прогенітори SVZ-бічних шлуночків мозку молодих і старих мишей, які мали фенотип нестин (+) / Musashi (+), відрізнялися майже вдвічі зниженою проліферативною активністю. Схожу тенденцію автори спостерігали і у здатності давати ріст клітинним нейросферам [34].

Було також продемонстровано, що після 90 хв оклюзії середньої мозкової артерії щура, пік збільшення експресії PSA-NCAM у SVZ-бічного шлуночка іпсилатеральної півкулі у молодих і зрілих тварин спостерігався на 1-шу добу після ішемії, а у старих тварин – на 3-тю добу. У контролі максимальну експресію PSA-NCAM дослідники знайшли у вентро-дорсальній частині SVZ-бічного шлуночка старих тварин і в дорсальній частині SVZ – молодих тварин [53].

Цікаво відмітити, що вік тварин не впливає на постішемичну активацію потенціалу нейральних прогеніторів гіпокампа; ймовірніше, вік накладає певні обмеження на життєздатність молодих нейронів [63].

Схожі зміни проліферативної активності були виявлені і в нейральних клітинах периферичних відділів нервової системи. Наприклад, встановлено, що з віком проліферативна активність нейральних прогеніторів нюхового епітелію гвінейських свинок зменшується, тоді як кількість TUNEL – позитивних апоптотичних клітин залишається стабільним [22]. У свою чергу інші дослідники довели, що з віком нейронпродукуюча активність пігментоцитів сітківки ока людини *in vitro* зменшується [7].

Під час старіння відбуваються зміни геному НСК, показано, що в клітинах нейросфер, отриманих при культивуванні НСК головного мозку старих тварин, втрачається гетерозиготність за деякими хромосомами, що пояснюється виникненням хромосомних аберацій. При цьому, на думку авторів, протягом усього життя відбувається відбір клітин, які проявляють підвищену здатність до виживання в тканині старіючого мозку [9].

Отже, активність нейрогенезу за участі НСК і регенераційні можливості нервової тканини ссавців після народження низькі та зменшується з віком. Це супроводжується неухильним прогресуванням дегенеративних змін структури тканини головного та спинного мозку, а також периферичних відділів нервової тканини.



Вплив факторів мікрооточення на диференціацію НСК дорослого мозку *in vivo* та *in vitro*. Нині накопичено багато даних про цитотипову пластичність НСК, трансплантованих у різні відділи мозку дорослих тварин [6, 14, 30]. При цьому підтверджується вплив локальних факторів мікрооточення на процеси направленої та фенотипової термінальної диференціації трансплантованих нейроклітин [26]. Так, показано, що НСК гіпокампа, імплантовані в гіпокамп, формували нейрони, подібні нейронам зубчастої фасції гіпокампа [60]. На відміну від цього, при трансплантації у ділянках рострального міграційного тракту такі клітини мігрували у нюхову цибулину та перетворювалися там у нейрони, які експресували тирозингідроксилазу, типові для нюхової цибулини, але не для гіпокампа [61]. При трансплантації НСК у прозору перетинку та діагональну смугу формувалися холінергічні нейрони, характерні для цієї зони. Водночас НСК стріатума, імплантовані в кору головного мозку, диференціювались у типові кіркові нейрони з наявністю характерних аксональних зв'язків.

Встановлено регуляторний і вибірковий вплив факторів росту на потенційні властивості НСК як *in vivo*, так і *in vitro*. Так, введення у бічні шлуночки мозку рекомбінантного фактора росту EGF стимулювало підвищення проліферативної активності НСК у субвентрикулярній зоні. Водночас у субгранулярній ділянці зубчастої звивини кількість клітинних елементів у цих умовах не змінювалася при чіткому зміщенні наявних популяцій клітин у бік гліального типу. Але після введення в порожнину бічних шлуночків фактора росту фібробластів-2 (FGF2) збільшувалася кількість нейроклітин в обох регенераційних системах [32]. При цьому показано, що основний фактор росту фібробластів (bFGF) не має індукуючого впливу на проліферацію НСК, ізольованих зі стріатума дорослого мозку. Проте після попереднього субкультування з bFGF вони набували здатності до самовідновлення та проліферували за наявності згаданого фактора.

Визначена направленість зрушень у співвідношенні нейрональних і гліальних популяцій під впливом факторів росту прослідковується і в умовах культивування НСК. Відомо, що EGF проявляє мітогенний вплив на довготривалі культури стовбурових клітин-попередників, стимулюючи проліферацію мультипотентних НСК як ембріонального, так і постнатального дорослого мозку з обмеженням потенціалу до диференціації.

За наявності таких факторів росту, як FGF2, а також сумісної дії факторів росту EGF і FGF2, культивовані НСК проліферують, не вступаючи у диференціацію, тоді як при видаленні цих факторів з поживного середовища культур НСК диференціюються в олігодендроцити та астроцити.

Таким чином, нейрональну диференціацію НСК в клоні забезпечує в основному родина факторів росту фібробластів. Астроцитарну диференціацію індукує циліарний нейротрофічний фактор (CNTF), а диференціацію в олігодендроцити викликає тиреотропний гормон трийодтиронін. Отримані *in vitro* дані показують, що центральним механізмом формування фенотипових клітинних типів термінальної диференціації є дія певних екстрацелюлярних інструктивних сигналів епігенетичної стимуляції на той чи інший клас мультипотентних НСК, що і визначає подальшу долю цих клітин.

Слід зазначити, що НСК наявні також у спинному мозку дорослих індивідуумів [24]. Проте в умовах *in situ* клітини проліферують та диференціюються виключно в астроцити, але не у нейрони навіть після пошкодження спинного мозку. На відміну від цього, в умовах *in vitro* та при трансплантації у зубчасту звивину гіпокампа, НСК спинного мозку здатні диференціюватися в нейрони [54]. У той час прогеніторні нейральні клітини спинного мозку, трансплантовані в субвентрикулярну зону переднього мозку, радіально мігрують до фронтальної та окципітальної кори і у нюхову цибулину, але не у гіпокамп. Незалежно від кінцевої ланки міграції ці

клітини не диференціюються у глію. А, отже, міграційні властивості потенціалу до диференціації нейральних прогеніторів спинного мозку відрізняються від аналогічних клітин у субвентрикулярній зоні головного мозку [25].

Нейральні стовбурові клітини – стратегія регенерації тканини ЦНС. Джерелом НСК у дорослих особин є: 1) субвентрикулярна зона головного мозку (нейрональні та гліальні попередники); 2) епітелій нюхового тракту та нюхова цибулина (НЦ); 3) зубчасте ядро гіпокампа; 4) асоціативна кора (маври); 5) мозочок; 6) голосові центри кори стріатума (птахи).

Мозок дорослих ссавців має дуже обмежену здатність генерувати нові клітинні елементи при різних видах пошкодження. Тому трансплантація НСК у мозок може поповнити втрачені популяції нейронів і глії [2]. У своїх дослідженнях учені отримували НСК з 8–12-тижневих плодів людини, культивували у середовищі NPBM з додаванням hFGF, HEGFNSF-1 протягом 14 діб. Перед трансплантацією культивовані клітини були пофарбовані бісбензидом (Hoehst 33342), а потім ін'єкційовані у різні відділи мозку дорослих щурів. Результати мікроскопічного дослідження, проведеного через 10 та 20 діб після трансплантації, показали, що у мозку всіх щурів-реципієнтів знаходилися трансплантати НСК людини. Кластери трансплантованих клітин локалізувалися у корі мозку, білій речовині, латеральному шлуночку, хвостатому ядрі та у всіх шарах мозочка, тобто розташовувалися по ходу ін'єкції. Донорські клітини, що мігрували, розподілялися серед нейронів мозку реципієнта і не виділялися від оточуючої тканини бар'єром, крім того, вони зберігали проліферативний потенціал. Частина НСК людини мігрувала вздовж капілярів мозку реципієнта та по поверхні волокнистих пучків. Така локалізація передбачала їх диференціацію у астроцити, що підтвердилася при імуногістохімічній реакції на маркер GFAP. Фарбування антитілами проти віментину та нестину свідчило про те, що у трансплантатах НСК людини

знаходилися клітини прогеніторного типу, які ще не перейшли до диференціації [27].

Відомо, що донорські нейробласти, імплантовані у різне тканинне середовище, здатні перетворюватися в спеціалізовані клони нейронів і нейроглії, причому фактори навколишнього середовища контролювали напрямок спеціалізації клітин.

Міграція дозріваючих нейронів з вентрикулярної зони у відповідні ділянки головного мозку направляється радіальною глією, яка не функціонує у постнатальний період. У дорослих реципієнтів донорські клітини із зони інокуляції у місце пошкодження переміщуються послідовно – тобто низкою компактно взаємоприлягаючих клітин, які обгортаються глією. Вважають, що основним регулятором таких клітинних взаємодій є полісїалювана молекула адгезії нервових клітин (PSA-NCAM). Існування нерадіальних форм міграції дає змогу розробити стратегію адресної доставки трансплантованих нейральних попередників у зрілу нервову систему [18].

Отримані численні експериментальні дані, які підтверджують можливість трансплантації у головний мозок функціонально повноцінних клонів диференційованих нервових клітин. Так, щурам з пошкодженими дофамінергічними нейронами вводили клітини гліальної лінії, яка продукує нейротрофічний фактор (GDNF). Показано, що при трансплантації клітин у мозок щура краще відновлювалася пошкоджена сенсомоторна зона.

При трансплантації НСК мишам з пошкодженим спинним мозком функція спинного мозку відновлювалася на 9-ту добу після пошкодження. Через 2–5 тиж було встановлено, що частина трансплантованих клітин вижила і диференціювалася у астроцити, олігодендроцити та нейрони. Показано, що НСК людини зберігали життєздатність не менше трьох місяців, мігрували та диференціювалися у нейрони та глію в тканинах пошкодженого спинного мозку дорослих мишей [14]. Трансплантовані культивовані НСК мозку людини успішно виживали, зберігали

мультипотентний статус і виявляли нейропротекторний вплив на дегенеруючі нейрони у мозку дорослих щурів після гіпоксії.

Таким чином, трансплантація НСК є перспективною для лікування пошкоджень головного та спинного мозку як через заміщення втрачених клітинних елементів, так і за рахунок відновлення пошкоджених нервових ділянок. Завдяки здатності генерувати всі клітинні типи у нервовій системі, НСК є багатообіцяючими «кандидатами» для розвитку клітинної та генної терапії захворювань нервової системи, зокрема нейродегенеративних захворювань.

## ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

Починаючи з кінця 80-х років минулого століття реалізується міжнародна програма присвячена актуальній проблемі клітинної біології – вивченню потенціалу СК зокрема нейральних, що може сприяти значному прогресу у лікуванні багатьох хвороб людини та тварин, клонуванню органів і тканин, і, як результат, новим можливостям у вирішенні проблем трансплантації.

Відкриття НСК і виявлення їх у мозку ембріонів і дорослих особин трансформувало уявлення про пластичність ЦНС. На зміну постулату, що нервові клітини не діляться і не відновлюються, прийшло твердження, що у дорослому організмі за рахунок НСК відновлюються функції пошкоджених нейронів. НСК стали об'єктом інтенсивного вивчення в усьому світі та в Україні зокрема, і нині накопичено вже достатньо експериментального та клінічного матеріалу з їх застосування при різних захворюваннях, зокрема, при ішемії.

У зв'язку з цим вивчення властивостей НСК, розробка методів отримання, виділення, збагачення та їх диференціації повинні випереджати їх клінічне застосування. Слід також вивчити питання практичного застосування, а саме, показання до застосування, значення дози, місця та кратність введення, характер супутньої терапії, значення стадії розвитку захворювання.

Незважаючи на перші успіхи у вивченні НСК, залишається ще багато питань і проблем, які потребують широких комплексних досліджень. Серед головних є такі: 1 – онкогенність – здатність СК при введенні в організм реципієнта викликати розвиток злоякісних пухлин, 2 – здатність СК до непередбаченої диференціації та важкості отримання поки що направленої їх диференціації, 3 – імунологічна несумісність СК з організмом реципієнта у разі їх ксеногенного походження.

Без адекватного вирішення цих проблем, пов'язаних з біологією НСК, ефективне застосування цих клітин у клінічній практиці неможливе.

**О.А. Рыбачук, Т.А. Пивнева**

## РОЛЬ НЕЙРАЛЬНЫХ СТОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Центральная нервная система (ЦНС) взрослых млекопитающих и, в частности, людей, является типичным примером органов, которые не восстанавливаются. Тем не менее, растущий интерес к развитию инновационных методов лечения, которые направлены на регенерацию поврежденной ткани ЦНС, основывается на последних достижениях исследований в области стволовых клеток и неврологии. Восстановление нормального развития нервной системы стало жизненно важной стратегией ее регенерации. Нормальное развитие ЦНС инициируется индукцией стволовых клеток в ЦНС, т.е. нейральных стволовых клеток (НСК). Таким образом, введение или мобилизация НСК, как ожидается, может привести к регенерации ЦНС путем активации как эндогенной регенерации, так и трансплантацией НСК. В обзоре приведены последние данные изучения фундаментальной биологии стволовых клеток; механизмы онтогенетического развития; перспективы идентификации; потенциал дифференциации, а также их терапевтическое применение.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, нейральные стволовые клетки, нейрогенез, нейросферы, индуцированные плюрипотентные клетки.

**О.А. Rybachuk, T.A. Pivneva**

## NEURAL STEM CELLS – STRATEGIES OF REGENERATION OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Central nervous system (CNS) of adult mammalian and, in particular of people, is a typical example of organs that are not



restored. However, the growing interest in the development of innovative treatments that are aimed at the regeneration damaged tissue CNS is based on the latest research in the field of stem cells and neurology. The recapitulation of normal neural development has become a vital strategy for CNS regeneration. Normal CNS development is initiated by the induction of stem cells in the CNS, i.e., neural stem cells (NSCs). Thus, the introduction or mobilization of NSCs could be expected to lead to CNS regeneration by recapitulating normal CNS development, in terms of the activation of the endogenous regenerative capacity and cell transplantation therapy. In this review we summarized the recent progress in study of basic stem cell biology, on the prospective identification of NSCs, the elucidation of the mechanisms of ontogenic changes, potential differentiation, and their therapeutic applications. Keywords: embryonic stem cells, neural stem cells, neurogenesis, neurosphere, induced pluripotent stem cells.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Запорожан В.Н., Бажора Ю.И. Стволовые клетки. – К.: Одесса: Одес. гос. мед. ун-т. – 2004 – 228 с.
2. Зозуля Ю.А., Лисяний Н.И., Цымбалюк В.И., Семенова В.М. Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток. – К.: УИПК “ЕксОб”. – 2005. – 368 с.
3. Цымбалюк В.И., Медведев В.В. Нейрогенные стволовые клетки. – К.: ”Коваль”. – 2005. – 596 с.
4. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats // *J. Comp. Neurol.* – 1965. – **124**, № 3. – P. 319–335.
5. Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo J.M., Tramontin A.D. An unified hypothesis on the lineage of neural stem cells // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2001. – **2**. – P. 287–293.
6. Amarglio N., Hirshberg A., Scheithauer B.W., Cohen Y., Loewenthal R., Trakhtenbrot L., Paz N., Koren-Michowitz M., Waldman D., Leider-Trejo L., Toren A., Constantini S., Rechavi G. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient // *PLoS Med.* – 2009. – **6**, № 2. – Suppl.
7. Amemiya K., Haruta M., Eguchi G. Adult human retinal pigment epithelial cells capable of differentiating into neurons // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2004. – **316**, № 1. – P. 1–5.
8. Arsenijevic Y., Villemure J. G., Brunet J. F., Bloch J. J., Deglon N., Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult brain // *Exp. Neurol.* – 2001. – **170**, №1. – P. 48–62.
9. Bailey K. J., Maslov A. Y., Pruitt S. C. Accumulation of mutations and somatic selection in aging neural stem/progenitor cells // *Aging Cell.* – 2004. – **3**, № 6. – P. 391–397.
10. Bakogiannis C., Tousoulis D., Androulakis E., Briasoulis A., Papageorgiou N., Vogiatzi G., Kampoli A.M., Charakida M., Siasos G., Latsios G., Antoniadis C., Stefanadis C. Circulating endothelial progenitor cells as biomarkers for prediction of cardiovascular outcomes // *Curr Med. Chem.* – 2012. – **19**, № 16. – P. 2597–2604.
11. Bandyopadhyay A., Dong Q., Sun L.Z. Stem/progenitor cells in murine mammary gland: isolation and functional characterization // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – **879**. – P. 179–193.
12. Cameron H.A., McKay R.D. Restoring production of hippocampal neurons in old age // *Nat. Neurosci.* – 1999. – **2**, №10. – P. 894–897.
13. Corotto F.S., Henegar J.A., Maruniak J.A. Neurogenesis persist in the subependymal layer of the adult mouse brain // *Neurosci. Lett.* – 1993. – **149**, № 2. – P. 111–114.
14. Cummings B.J., Uchida N., Tamaki S.J., Salazar D.L., Hooshmand M., Summers R., Gage F.H., Anderson A.J. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – **102**, № 39. – P. 14069–14074.
15. Day R.M. Epithelial stem cells and tissue engineered intestine // *Curr. Stem. Cell Res Ther.* – 2006. – **1**, № 1. – P. 113–120
16. Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A., Gage F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus // *Nat. Med.* – 1998. – **4**, № 11. – P. 1313–1317.
17. Fujita S. The matrix cell and cytotogenesis in the developing central nervous system // *J. Comp. Neurol.* – 1963. – **120**. – P. 37–42.
18. Gage F. N. Mammalian neural stem cell // *Science.* – 2000. – **287**, № 5457. – P. 1433–1438.
19. Good P, Yoda A, Sakakibara S, Yamamoto A, Imai T, Sawa H, Ikeuchi T, Tsuji S, Satoh H, Okano H. The human Musashi homolog 1 (MSI1) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells // *Genomics.* – 1998. – **52**, № 3. – P. 382–384
20. Gritti A., Bonfanti L., Doetsch F., Caille I., Vescovi A.L. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents // *J. Neurosci.* – 2002. – **22**, № 2. – P. 437–445.
21. Harkness L., Prokhorova T.A., Kassem M., Blagoev B. Stable isotope labelling with amino acids in cell culture for human embryonic stem cell proteomic analysis // *Methods Mol Biol.* – 2012. – **873**. – P.297–305.
22. Higushi Y., Nakamura H., Takahashi S. The dynamics of precursor cells in the olfactory epithelium of juvenile and adult guinea pigs // *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* – 2004. – **43**. – P. 148–153.
23. Horiguchi S., Takahashi J., Kishi Y., Hashimoto N. Neural precursor cells derived from human embryonic brain retain regional specificity // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – **75**, № 6. – P. 817–824.
24. Horner P., Power A., Palmer T., Gage F. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the infact adult rat spinal cord // *J. Neurosci.* – 2000. – **20**, № 6. – P. 2218–2228.

25. Jang Y., Park J., Lee M., Yoon B., Kim S. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord hematopoietic stem cells // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – **75**, № 4. – P. 573–584.
26. Jenny B., Kanemitsu M., Tsupykov O., Potter G., Salmon P., Zraggen E., Gascon E., Skibo G., Dayer A.G., Kiss J.Z. Fibroblast growth factor-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential // *Stem Cells.* – 2009. – **27**, № 6. – P. 1309–1317.
27. Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L. Identification of neural stem cell in the adult mammalian central nervous system // *Cell.* – 1999. – **96**, № 1. – P. 25–34.
28. Kaneko Y., Sakakibara S., Imai T., Suzuki A., Nakamura Y., Sawamoto K., Ogawa Y., Toyama Y., Miyata T., Okano H. Musashi-1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells // *Dev. Neurosci.* – 2000. – **22**, № 1–2. – P. 138–152.
29. Kempermann G., Gage F.H. New nerve cells for the adult brain // *Sci. Amer.* – 1999. – **280**. – P. 48–53.
30. Koch P., Kokaia Z., Lindvall O., Bruestle O. Emerging concepts in neural stem cell research: autologous repair and cell-based disease modelling // *Lancet Neurol.* – 2009. – **8**, №9. – P. 819–829.
31. Kriegstein A., Noctor S., Martinez-Cerdeno V. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2006. – **7**. – P. 883–890.
32. Limke T.L., Rao M.S. Neural stem cell therapy in the aging brain: pitfalls and possibilities // *J. Hematother. Stem. Cell.* – 2003. – **12**, № 6. – P. 615–623.
33. Luskin M.B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone // *Neuron.* – 1993. – **11**. – P. 173–189.
34. Maslov A.Y., Barone T.A., Pruitt S. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice // *J. Neurosci.* – 2004. – **24**, № 7. – P. 1726–1733.
35. McKay R. Stem cells in the central nervous system // *Science.* – 1999. – **276**, № 5309. – P. 66–71.
36. Morshead C.M., Kooy D. v. d. Disguising adult neural stem cells // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2004. – **14**, № 1. – P. 125–131.
37. Okano H., Imai T., Okabe M. (2002) Musashi: a translational regulator of cell fates // *J. Cell Sci.* – 2002. – **115**, № (Pt 7). – P. 1355–1359.
38. Okano H., Kawahara H., Toriya M., Nakao K., Shibata S., Takao I. Function of RNA binding protein Musashi-1 in stem cells // *Exp. Cell Res.* – 2005. – **306**. – P. 349–356.
39. Okano H. Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system // *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 86. – 2010. – **86**. – P. 438–450.
40. Okano H. Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application // *Keio J. Med.* – 2002. – **51**. – P. 115–128.
41. Okano H., Sawamoto K. Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair // *Phil. Trans. R. Soc.* – 2008. – **363**. – P. 2111–2122.
42. Okano H. Stem cell biology of the central nervous system // *J. Neurosci. Res.* – 2002. – **69**, № 6. – P. 698–707.
43. Okano H., Temple S. Cell types to order: Temporal specification of CNS stem cells // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2009. – **19**. – P. 112–119.
44. Pagano S., Impagnatiello F., Girelli M., Cova L., Grioni E., Onofri M. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb // *Stem Cell.* – 2000. – **18**, № 4. – P. 295–300.
45. Palmer T.D., Ray J., Gage F.H. FGF2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain // *Mol. Cell. Neurosci.* – 1995. – **6**, № 5. – P. 474–486.
46. Pincus D., Keyoung H., Restelli C., Sakakibara S., Okano H., Goodman R. FGF2/BDNF-associated maturation of new neurons generated from adult human subependymal cells // *Ann. Neurol.* – 1998. – **43**. – P. 576–585.
47. Rakic P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2009. – **10**. – P. 724–735.
48. Ramon y Cajal, S. Degeneration and regeneration of the nervous system. (Translated by RM Day from the 1913 Spanish edition). – Oxford, University Press, Oxford. – 1928.
49. Reynolds B.A., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system // *Science.* – 1992. – **255**, № 5052. – P. 1707–1710.
50. Richards L.J., Kilpatrick T.J., Bartlett P.F. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain // *PNAS USA.* – 1992. – **89**, № 18. – P. 8591–8595.
51. Sakakibara S., Imai T., Hamaguchi K., Okabe M., Aruga J., Nakajima K., Yasutomi D., Nagata T., Kurihara Y., Uesugi S., Miyata T., Ogawa M., Mikoshiba K., Okano H. Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell // *Dev Biol.* – 1996. – **176**, № 2. – P. 230–242.
52. Sakakibara S., Okano H. Expression of neural RNA-binding proteins in the post-natal CNS: implication of their roles in neural and glial cells development // *J. Neurosci.* – 1997. – **17**, № 21. – P. 8300–8312.
53. Sato K., Hayashi T., Abe K. Temporal and spatial differences of PSA-NCAM expression of neural markers in human umbilical cord blood // *Exp. Neurol.* – 2001. – **922**, № 1. – P. 135–139.
54. Shihabuddin L., Horner P., Ray J., Gage F. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus // *J. Neurosci.* – 2000. – **20**, № 23. – P. 8727–8735.
55. Smith R., Bagga V., Fricker-Gates R. Embryonic neural progenitor cells: the effects of species, region, and culture conditions on long-term proliferation and neuronal differentiation // *J. Hematother. Stem Cell Res.* – 2003. – **12**, №6. – P. 713–725.
56. Suzuki S.O., Goldman J.E. Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone have distinct mi-

- gratory migratory pathways: adynamic study of glial and neuronal progenitor migration // *J. Neurosci.* – 2003. – **23**, №10. – P. 4240–4250.
57. Temple S., Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 1999. – **9**. – P. 135–141.
58. Temple S. The development of neural stem cells // *Nature.* – 2001. – **414**, № 6859. – P. 112–117.
59. Tropepe V., Hitoshi S., Ekker M. Neural stem cells and their progeny express region-specific gene in the developing CNS, but this expression is not irreversible and can be altered by lokal inductive cues // *Soc. Neurosci. Abstr.* – 2000. – **23**, № 1. – P. 107–121.
60. Tsupykov O. M., Pivneva T. A., Poddubna A. O., Kyryk V. M., Kuchuk O. V, Butenko G. M., Skibo G.G. Migration and differentiation of fetal neural progenitor cells in the brain of ischemic animals // *IJPP.* – 2010. – **1**, № 1. – P. 25–34.
61. van Praag H., Schinder A., Gage F. Functional neurogenesis in the adult hippocampus // *Nature.* – 2002. – **415**, № 6875. – P. 1030–1034.
62. Wright N.A. Stem cell identification--in vivo lineage analysis versus in vitro isolation and clonal expansion. // *J. Pathol.* – 2012. – **227**, № 3. – P. 255–266.
63. Yagita Y., Kitagawa K., Matsumoto M. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus // *Stroke.* – 2001. – **32**, № 8. – P. 1890–1896.
64. Yao J., Mu Y., Gage F.H. Neural stem cells: mechanisms and modeling // *Protein Cell.* – 2012. – **3**, №7. – P. 559.
65. Yoshida N., Hishuyama S., Hisatsune T. Decrease in expression of  $\alpha 5\beta 1$ -integrin during neuronal differentiation of cortical progenitor cells // *Exp. Cell. Res.* – 2003. – **287**, № 1. – P. 240–254.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*  
*E-mail: pta@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до редакції 19.12.2012*