

УДК 616.831 / .832-089 : 611.018.82.018.013

## Генеалогія, ідентифікація та клінічне використання нейрональних стовбурових прогеніторів

Цимбалюк В.І., Медведєв В.В.

Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова АМН України, м.Київ, Україна

На основі аналізу даних літератури розглянуті такі проблемні питання біології та клінічного використання нейрональних стовбурових клітин (НСК), як: їх астроцитарна генеалогія, транс- та дедиференціаційні властивості, локалізація та регенераторна активність в зрілому організмі, участь в генеруванні енграм пам'яті, методичні підходи маркерної ідентифікації, вирощування культури та клінічного використання для лікування патологічних станів, що супроводжуються нейродегенеративними процесами.

Ключові слова: *нейрональна стовбурова клітина, потентність прогеніторних клітин, гемопоетична стовбурова клітина (ГСК), диференціація, детермінація, рестрикція, астроцитарні та нейрональні маркери, астроцитарна глія, точкові мутації, еволюція.*

### Основні визначення та поняття біології стовбурових клітин (СК)

СК мають дві патогномонічні ознаки: здатність до самовідтворення в наступному поколінні та можливість трансмітотичної диференціації. Перша властивість вимагає наявності серед двох дочірніх клітин хоча б однієї з ідентичними материнській цитохімічними, молекулярними та іншими характеристиками й аналогічним рівнем проліферативного потенціалу. Диференціювання нащадків СК відбувається в проміжках між наступними поділами дочірніх клітин за умови супутньої рестрикції їх проліферативного потенціалу та широти спектру диференціації. Потентність прогеніторних клітин виражають чотири рівнями: тотипотентність, плюрипотентність, мульти (полі-) потентність та монопотентність. До пулу мультипотентних СК (МСК) відносять частково детерміновані, мультипотентні кровотворні прогенітори (загальні попередники лімфо- та мієлопоєзу), епідермальні (ЕпСК) та інтестинальні (ендодермальні ЕнСК) СК [16, 26, 49]. Важливими ознаками МСК є відносно низька частота поділу та повільний перебіг процесів клітинного циклу. Проте, МСК дають початок високоактивним проліфераторам — ампліфаерам прогеніторно-диференціаційного ряду [16].

Менш інформативною класифікацією СК є виділення серед них так званих ембріональних СК (ЕСК) та зрілих СК (ЗСК). До ЕСК відносять відсепаровані тотипотентні клітини-бластомери на стадії морули або плюрипотентні клітини внутрішньої клітинної маси бластоцисти [16, 44]. Експериментально встановлено, що бластоцити здатні активно експресувати ген *ket4*, і підтримують свій плюрипотентний статус за умови стійкої присутності в оточуючому середовищі фактору LIF (Leukemia inhibitory factor) [16], а за його відсутності культуровані ЕСК утворюють агрегати, в межах яких диференціюються

до рівня дефінітивних клітинних видів [10, 12]. Деякі автори виділяють підтипи НСК за здатністю до прояву одного з двох типів росту в культурі: нейросферного (за такої ситуації НСК називають NS-IC — Neurosphere-initiating cells) або адгерентного [16, 17, 42]. За підтримання певного рестриктивного спрямування плюрипотентної СК відповідають наступні транскрипційні фактори : Sox2, GATA-2, Tcf4, *ket4*, Mash1, LH2 та SCL/tal-1 [12, 16, 42, 44], при цьому потентність СК регулюється за допомогою епігеномних механізмів. Всі МСК містяться в своєрідних тканинних нішах, побудованих з специфічних для даної тканини елементів, і, таким чином, перебувають під дією синтезованих оточенням різноманітних чинників. Описують п'ять видів ніш МСК: епідермальна та фолікулярна — для ЕпСК, інтестинальна — для ЕнСК, кілька нейрональних регенераторних осередків для НСК, кістковомозкові ретикулярні мікрооточення гемопоетичних СК (ГСК) [16, 45, 50].

### Трансдиференціація та дедиференціація СК

Існують факти, що свідчать про наявність трансдиференціаційних переходів між різними типами МСК. Так, два колективи авторів незалежно один від одного встановили наявність нейрогенного диференціювання ГСК кісткового мозку *in vivo* [9, 31]. Іншою дослідною групою доведено, що НСК, введені трансгенним мишам з сублетальною відсутністю ГСК, відтворювали ріст повного спектру нащадків ГСК [5, 7]. Встановлено, що НСК має регенераторний потенціал щодо поперечно-посмугованих м'язів мишей та людини, оскільки мічені ядра нащадків введених НСК виявляли в щойно регенерованих волокнах посмугованих м'язів [18]. Шляхом імплантування частково очищених мічених мезенхімальних стовбурових прогеніторів, отриманих з дерми, в субвентрикулярну зону мозку новонароджених ми-

шей, було показано, що під час розвитку тварин вони давали початок астроцитарним елементам, які мігрували в різні ділянки кори та підкіркових структур півкуль головного мозку (ГМ) та мозочка [24]. Це дає змогу припустити наявність плюрипотентних та трансдиференційних властивостей як у ГСК, так і у НСК [16]. Місцем наведених змін диференціації МСК, очевидно, є гістоспецифічні ніші, клітинний склад який має необхідний для забезпечення відповідної дедиференціації набір факторів росту і спрямовує детермінацію СК в новообраному напрямку. За наявності у зрілому організмі вільно курсуючих тотипотентних СК, з огляду на спорідненість між гермінативними СК (ГМСК) та соматичними СК (ССК) [50], можна припустити, що ССК, включаючись в генеалогічну лінію ГМСК, здатні трансферувати надбані епігенетичні та мутаційні зміни в наступні покоління, і в такий спосіб реалізовувати позадарвінівські механізми еволюції.

НСК, отримані з різних ділянок ЦНС зародків щурів, розвиваються в нейроцити, характерні для донорської ділянки, і під час культивування експресують специфічні регіональні маркери. Отже, під час онтогенезу відбувається часткова топічна диференціація НСК [45], проте, повністю дистанційована від рестрикції потентного статусу СК. При цьому не визначено здатність НСК до міграції між окремими генеративними ділянками ЦНС в більш пізні періоди нейроонтогенезу.

Встановлено, що в регуляції часової диференціації НСК основну роль відіграють такі фактори, як FGF (Fibroblast-growth factor), BMP (Bone-morphogenic proteins) та ноггін (noggin). На початку нейроембріогенетичних процесів відбувається блокування ноггіном та його синергістами функціональної активності молекул BMP-сімейства, що зумовлює проліферацію нейроектодермальних клітин, підвищення чутливості НСК до FGF та диференціювання за нейрональним типом [37]. Із збільшенням концентрації FGF виликається ноггінний блок BMP, починається гліогенетична стадія диференціації активно проліферуючих НСК, під час якої під дією високої концентрації FGF та BMP в НСК активується експресія рецепторів до EGF (Epidermal-growth factor). Збільшення концентрації EGF в тканинах зумовлює відносне пригнічення чутливості НСК до FGF. На пізніх стадіях ембріонального розвитку всі три фактори — FGF, EGF та BMP підтримують стійку гліальну спрямованість диференціації НСК, що зберігається протягом усього життя [21, 30, 37]. Проте, це не означає, що нейрональний шлях диференціації НСК виключається взагалі.

#### **Нейрогенераторні системи зрілого організму**

Найбільш вивченою нейрогенераторною ділянкою мозку ссавців є субвентрикулярна зона

латеральних шлуночків (SVZ). Серед клітинних елементів проліферативних острівців SVZ виділяють центрально розташовані проліферуючі нейробласти (А-клітини), слабопроліферуючі великі клітини з астроцитарними маркерами (В-клітини), а також активні ампліфасерні прогенітори (С-клітини) [45]. В-клітини здатні випускати між сусідніх епендимцитів тонкий виросток з набором філаментів, притаманним циліарним відросткам ембріональних нейроепітеліальних клітин, внаслідок чого В-клітини фактично стають елементом вистилки шлуночків. Деякі автори, на основі вивчення експресії епендимцитами антигену Кіі, висувають гіпотезу про можливе інтраепендимальне розташування НСК [21, 41]. Інші дослідники показали, що, як у відсепарованих епендимальних тканинах, так і в тканинах SVZ під час вирощування культури виявляли активно проліферуючі клітини, проте, лише прогенітори, екстраговані з культур SVZ-дериватів, були здатні самооновлювати популяцію, що наводить на думку про субвентрикулярне розташування НСК [17].

Під дією таких факторів росту, як FGF2, комбінації факторів росту EGF та FGF2, поєднання FGF2 і PGKF культивовані ЕСК набувають і підтримують свій нейрогенний потенціал, тоді як при дефакторизації культурального середовища вони диференціюються в оліго- та астроцити. При введенні в латеральні шлуночки рекомбінантного EGF підвищувалась проліферативна активність в SVZ, тоді як кількість клітинних елементів субгранулярної зони (SGZ) зубчастої звивини (ГК) практично не змінювалась на фоні видимого зсуву наявних популяцій клітин в бік гліального типу. В той же час, після введення в порожнину шлуночків FGF2 збільшувалась кількість нейрональних елементів в обох регенераторних системах [17]. Встановлено, що BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) сприяє збільшенню маси клітин ЦНС, проте, невідомо, за рахунок яких саме елементів [17].

До інших автономних регенераційних систем зрілої нервової системи ссавців відносять прогеніторні елементи нюхового аналізатора та сітківки ока. НСК мігрують до Bulbus olfactorius (Вк) рostrальною міграторною системою (RMS), розміщуючись в останньому шарі ВО, де відбувається їх подальша диференціація в мігральні і перигранулярні нейроцити та елементи спеціалізованої глії. З іншого боку, похідні нюхових плакод теж можна вважати повноцінними НСК, оскільки саме з них розвивається і постійно підтримується популяція нейрорецепторних клітин та гліоцитів, які беруть участь в утворенні filii olfactorial [38].

Встановлено, що ретинальні СК (РСК) ссавців розташовані серед пігментцитів війкового тіла.

Під час вирощування культури та диференціації РСК утворюються специфічні для гістологічної структури сітківки типи клітин. Комітування нейрональних прогеніторних клітин під час нейроембриогенезу на шлях РСК відбувається, очевидно, за участю гомеобоксного гену *Chx10* [47].

Вважають, що основні прогеніторні елементи регенераторної системи спинного мозку (СМ) локалізуються в епендимальному та (або) субепендимальному шарах. Проте, під час експериментального моделювання травматичного ураження СМ активувалися виключно гліогенні репаративні процеси [21].

Існує кілька важливих чинників щодо впливу деяких ендогенних речовин на проліферативну активність і нейрогенеративні процеси в SGZ GK морського коника [25]. На великому експериментальному матеріалі продемонстровано, що проліферативні процеси в SGZ GK прямо пов'язані з запам'ятовуванням інформації специфічної гіпокампальної модальності [19, 20, 36, 43]. Серед генерованих при цьому клітин 25% є нейронального типу, причому більшість з них гинуть на 2 — 9-му тижні після утворення [20]. За ураження кількох структур морського коника можливі розлади чіткості функціонування регенераторної системи GK. Такий стан може спричинити гіпокампальну форму скроневої епілепсії [17]. Встановлено, що пригнічення регенераторних процесів в GK є однією з причин виникнення депресивних станів [28].

#### ***Астроцитарні маркери НСК та астроцитарна генеалогія НСК***

Багатьма дослідженнями з виключенням активно проліферуючих елементів SVZ (А- та С-клітин) було показано, що подальша мітотична активність В-клітин зумовлювала відновлення всього клітинного спектру SVZ. З іншого боку, саме клітини, які продукують нейрони нюхового аналізатора та гліальні субвентрикулярні елементи, мають специфічний астроцитарний поверхневий маркер RCAS, який бере участь у регуляції експресії гену кислого гліального протеїну (GFAP) [11]. Тому вважають, що функцію НСК в цій ділянці ЦНС виконують власне В-клітини [3, 4, 45]. Тривале перебування мічених специфічним імуофлуоресцентним маркером клітин в SVZ свідчить про їх здатність самовідтворюватися. В-клітини SVZ мають такі специфічні для ранніх НСК властивості, як експресія нестину та наявність вентрикулярного війкового виростка [3]. Крім того, факти свідчать, що на стадії активної міграції та проліферації нейробластів роль СК виконують саме радіарні гліоцити, для яких встановлені фактори специфічності нейроепітеліоцитів, міжмітотична міграція ядер, притаманна раннім нейроепітеліальним стовбуровим прогеніторам [3], доведена

здатність радіарних гліоцитів, отриманих з тканини ГМ в різні періоди нейрогенезу, відтворювати *in vitro* різні за структурою колонії нейробластів та гліоцитів [27]; візуалізовано безпосередній процес білябазального поділу радіарних гліоцитів з утворенням активно мігруючих вздовж відростка клітин з потенціал-залежною кондуктивністю та високим вхідним опором, тобто нейробластів [33]. Отже, можна зробити висновок, що для НСК характерна певна астроцитарна мімікрія [3, 4], проте, невідома глибина її поширення на внутрішньоклітинні молекулярні процеси в НСК. Така властивість НСК може відігравати важливу роль в еволюціонуванні генетичного матеріалу. На стадії передпоптозу в нейронах виникає здатність мутагенної зміни локусів, що в даний момент максимально експресуються. Отже, тиск негативного фактору збільшує кількість мутаційних варіантів та розширює ймовірнісну вибірку відбору. Оскільки астроцитарна глія виконує функцію презентації антигенів [1] та гомеостазування навколонейронного простору, під час активного ремодельовання тканин, очевидно, вони недосконало виконують власне астроцитарні функції, що зумовлює значне збільшення проапоптозності та концентрації потенційно мутагенних перекисних сполук в цитоплазмі НСК. Тому в умовах постійного безрезультатного генерування нових топологічних характеристик нейрональних сіток зростає ймовірність мутаційної дивергенції позиційних генів, тим більше, що в третини постонтогенетичних нейронів кори великого мозку ссавців виявлені хромосомні аберації [40].

#### ***Методи вивчення та маніпулювання НСК***

Першим етапом будь-яких маніпуляцій з НСК є виділення НСК з зрілого ГМ або зародкових тканин на стадіях бластуляції, гастрюляції, нейроляції чи нейрогістогенезу, залежно від поставлених перед конкретним дослідженням задач. Наступним кроком є адекватна дезагрегація та дисоціювання гістологічного матеріалу з перенесенням суспензії клітин в підтримувачі проліферативних потенцій СК, які фактично перебувають в стані типового аноїкозу. Зараз використовують розчини з різноманітним поєднанням високої концентрації одного або обох відомих факторів росту: FGF2 та EGF. Причому, не менш важливе значення для вирощування адгезивних культур має підбір адекватного культурального адгеренту.

З метою ідентифікації НСК використовують нейроепітеліальний маркер нестину — білка проміжних філаментів нейрональних прогеніторів. Для визначення нейронального типу утворених диференційованих клітин визначають експресію нейроспецифічних антигенів MAP2a, MAP2b, MAP2c, гену бета-тубуліну третього типу (*TuJ1*),

наявність цитоплазматичного білка tau та нейрофіламентів L, M і H; експресію РНК—зв'язуючого білка Hc, нуклеарного маркера більш зрілих нейронів NeuN, функціональних маркерів детермінованих субтипів нейроцитів (KARPP32 — нейрони смугастого тіла, кальбіндин — внутрішні гранулярні клітини СА3-поля морського коника, САК67 — GABA-ергічні нейрони, TH — дофамінергічні нейрони) [15, 17]. Для ідентифікації гліального ряду використовують імуногістохімічне визначення протеїнів GFAP (астроцитарний маркер) та GalC, k4, p75 (маркери олігодендроцитів). Специфічною для епендимальних клітин вважають експресію теплостійкого антигену HSA (Heat-stable antigen) та (або) антигену Kіl [21, 41]. Маркерами периферичних нейронів може бути білок периферин [32]. Водночас виникає потреба у використанні методів верифікації ГСК — поверхневі антигени СК34, СК90.2, СК117, СК135; здатність зв'язувати РНА (Peanut agglutinin). Ендотеліальним вважають маркер СК31, для міогенних СК характерна рання експресія генів  $\alpha$ -актинину-2 та важкого ланцюга молекули міозину (MyHC — myosin heavy chain) [41]. Взагалі, поки що в методичному арсеналі ідентифікаційних методів переважають непрямі підходи. Наявність в культурі НСК визначають за допомогою диференціації антиген-однорідного складу клітин на певні субтипи, притаманного потентності СК, диферону. Для цього можливе імплантування суспензій клітин, мічених за допомогою ретровірусів з інкорпорованим бета-галактозидазним опероном, у відповідний регіон піддослідного організму того самого виду. З метою візуалізації активнопроліферуючих клітин використовують як трансфекційні ретровірусні методи, так і реплікативну інкорпорацію ядрами мітотично-активних клітин мічених попередників нуклеїнових основ — тимідину та бромодезоксиуридину (BrdU) [39].

#### **Нейрохірургічні аспекти використання НСК**

Беручи до уваги нові дані про функціонування системи НСК в зрілому організмі, активно вивчаються та розробляються методи впливу на НСК при неврологічних чи нейрохірургічних захворюваннях [48] та імплантації НСК в пошкоджені ділянки нервової системи [6, 44]. В організм людини НСК вводять як системно, так і локально, з огляду на можливість трансдиференціації між окремими представниками СК. Для вирощування культури та отримання необхідних СК з певною потентністю можна використовувати не лише ембріональний (клонований) аутогенний матеріал, а й отримані пункційним методом власні СК, не обов'язково нейронального типу. Це створює можливість анонкогенної трансформації культивованих НСК і напівдиференційованих клітин, а також генерування допоміжних клітин-вказівників

спрямованого росту закінчень імплантованих нейроцитів. При цьому можливе використання нейтральних щодо зрілих нейроцитів синтетичних імплантаційних атракторів росту, здатних поступово утилізуватися гліальними елементами нервової тканини, а також моделювання навколо введених НСК анонкогенного тимчасового псевдоембріонального оточення.

Ще з початку 80-х років ХХ ст. ведуться активні дослідження трансплантаційних методів лікування хвороби Паркінсона. Останнім часом отримані дані про тривале функціонування імплантованих клітин, проте, це не забезпечує поліпшення стану всіх оперованих пацієнтів [6, 13, 34]. Це особливо активно стимулює впровадження в клінічну практику рекомбінованих аутохтонних НСК з персистуючим високим синтезом дофаміну та забезпечення постімплантаційного розвитку внутрішньомозкових зв'язків між елементами екстрапірамідної системи, притаманних неураженому ГМ [6, 17, 35, 45].

Менш розроблені питання імплантації НСК при інших патологічних станах нервової системи, що супроводжуються дефіцитом нейрональних елементів: хворобі Альцгеймера [17, 45], хорей Гентингтона (ХГ) [22], розсіяному склерозі [45], скроневій епілепсії [14, 46], ішемічному інсульті [8, 23]). Так, при ХГ вважають за необхідне імплантацію СК в ділянки пошкоджених ядер стріопалідарної системи, чорної субстанції, зубчастого та субталамічного ядер, а також в певні шари премоторної кори [2, 6]. Активно вивчаються можливості застосування НСК при різних видах травматичного пошкодження ГМ та СМ. Так, імплантування ЕСК в зону травматичного ураження СМ піддослідних тварин сприяло поліпшенню процесів росту регенеруючих аксонів і створювало умови для функціонального відновлення втрачених нейро-моторних та провідникових функцій [29]. Часткове функціональне відновлення спостерігали і після трансплантації НСК в ділянки СМ щурів з вибірково дифузним ураженням мотонейронного пулу [12]. Трансплантація нейрональних прогеніторів, отриманих з плюрипотентних клітин ембріональної карциноми, в мозок щурів, у яких змоделювали церебральну ішемічну атаку чи травматичне ураження ГМ, сприяла зменшенню моторного та когнітивного дефіциту у тварин [8]. При демієлінізуючих захворюваннях рекомендують використання гліальних потенцій НСК [10] з паралельною активацією власного гліогенезу шляхом локального чи системного введення гліогенних факторів росту [48].

Отже, необхідні подальше вивчення, експериментальна розробка та клінічне впровадження методів нейрохірургічного лікування різних захворювань НС з використанням НСК.

## Список літератури

1. Руденко В.А., Маркова О. В. Иммуные свойства клеток головного мозга // Иммунная система головного мозга /Под. ред. Н.И.Лисяного. — К.: ВИПОЛ, 1999. — С.32-49.
2. Цимбалюк В. І., Медвед'єв В. В. Молекулярні та філогенетичні аспекти патогенезу захворювання Гентингтона // Укр. нейрохірург. журн. — 2002., №4.— С. 11-16.
3. Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo J.M. Tramontin A. K. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells // Nat. Rev. Neurosci. — 2001. — V.2, N4. — P.287-293.
4. Barres B. A. A new role for glia — generation of neurons // Cell — 1999. — V.97., N6. — P.667-670.
5. Bjornson C. R. R., Rietze R. L., Reynolds B. A. et al. Turning brain into blood : a hematopoietic fate adapted by adult stem cells in vivo // Science. — 1999. — V.283, N5401. — P.534-566.
6. Bjorklund A., Lidvall K. Cell replacement therapies for central nervous system disorders // Nat.Neurosci. — 2000. — V.3. — P.537-544.
7. Bjorklund A., Svendsen C. Breaking the brain-blood barrier // Nature. — 1999. — V.397, N6720. — P.569-570.
8. Borlongan C. V., Tajima Y., Trojanowski J. Q. et al. Cerebral ischemia and CNS transplantation : differential effects of grafted fetal rat striatal cells and human neurons derived from a clonal cell line // NeuroReport. — 1998. — V.9. — P.3703-3709.
9. Brazelton T. R., Rossi F. M. V., Keshet G. I. From marrow to brain : expression of neuronal phenotypes in adult mice // Science. — 2000. — V.290, N5497. — P.1775-1779.
10. Brustle K. et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors : a source of myelinating transplants // Science. — 1999. — V.285. — P.754-756.
11. Koetsch F., Caille I., Lim K. A. et al. A subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain // Cell. — 1999. — V.97, N6. — P.1-20.
12. Konovan P. Gearhart J. The end of begining for pluripotent stem cells // Nature. — 2001. — V.414. — P.92-97.
13. Kunneth S. B., Bjorklund A., Linvall K. Cell therapy in Parkinson's disease — stop or go ? // Nat. Rev. Neurosci. — 2001. — V.2. — P.365-369.
14. Ferencz I. et al. Suppression of kindling epileptogenesis in rats by intrahippocampal cholinergic grafts // Europ. J. Neurosci. — 1998. — V.10. — P.213-220.
15. Fricker R. A., Carpenter M. K., Winkler C. et al. Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain // J. Neurosci. — 1999. — V.19. — P.5990-6005.
16. Fuchs E., Segre J. A. Stem cells: a new lease on life // Cell. — 2000. — V.100, N1. — P.143-155.
17. Gage F. H. Mammalian neural stem cells // Science. — 2000. — V.287, N5451. — P.1433-1438.
18. Galli R., Bordello U., Gitti A. et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells // Nat. Neurosci. — 2002. — V.3, N10. — P.986-991.
19. Gould E., Beylin A., Tanapat P. et al. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation // Nat. Neurosci. — 1999. — V.2, N3. — P.260-265.
20. Gould E., Vail N., Wagers M. et al. Adult generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence // PNAS USA. — 2001. — V.98, N19. — P.10910-10917.
21. Johansson C. B., Momma S., Clarke K. L. et al. Identification of neural stem cell in the adult mammalian central nervous system // Cell. — 1999. — V.96, N1. — P.25-34.
22. Kendall A. L. Functional integration of striatal allografts in a primate model of Huntington's disease // Nat. Med. — 1998. — V.4. — P.727-729.
23. Kondziolka K., Wechsler L., Goldstein S. et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke // Neurology. — 2000. — V.55, N4. — P.565-569.
24. Kopen G. C., Prockop K.I., Phinney K.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum and they differentiate into astrocytes after injection in neonatal mouse brains // PNAS USA. — 1999. — V.97, N20. — P.10711-10716.
25. Kuhn H. G., Kieckinckuf-Anson H., Cage F. H. et al. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation // J. Neurosci. — 1996. — V.16., N6. — P.2027-2033.
26. Lovell-Badge R. The future for stem cell research // Nature. — 2001. — V.414, N6859. — P.88-91.
27. Malatesta P., Hartfuss E., Gotz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage // Development. — 2000. — V.127, N24. — P.5253-5263.
28. Malberg J. E., Eisch A. I., Nestler E. I. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus // J. Neurosci. — 2000. — V.20, N24. — P.9104-9110.
29. McDonald J. W., Liu X. Z., Qu Y. et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord // Nat. Med. — 1999. — V.5, N12. — P.1410-1412.
30. Mehler M. F., Mabie P. C., Zhu G. et al. Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate // Dev. Neurosci. — 2000. — V.22. — P.74-85.
31. Mezey E., Chandross K. I., Harta G. et al. Turning blood into brain : cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow // Science. — 2000. — V.290, N5497. — P.1779-1782.
32. Morrison S. J., White P. M., Zock C. et al. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells // Cell. — 1999. — V.96. — P.737-749.
33. Noctor S. C., Flint A. C., Weissmann T. A. et al. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex // Nature. — 2001. — V.409, N6821. — P.714-720.
34. Piccini P., Brooks K. I., Bjorklund A. et al. Dopamine release from nigral transplants visualised in vivo in a Parkinson's patient // Nat. Neurosci. — 1999. — V.2, N12. — P.1137-1140.
35. Potter E.K., Ling Z.K., Carvey P.M. Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons // Cell. Tissue Res. — 1999. — V.296. — P.235-246.
36. Praag H., Kempermann G., Cage F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus // Nat. Neurosci. — 1999. — V.2, N3. — P.266-270.
37. Quian X., Shen Q., Goderie S. K. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and

- glial cell production from isolated murine cortical stem cell // *Neuron*. — 2000. — V.28, N1. — P.69–80.
38. Raisman G. klfactory ensheathing cells — another miracle cure for spinal cord injury ? // *Nat. Rev. Neurosci.* — 2001. — V.2, N5. — P.369–374.
  39. Rakic R. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence // *Nature Rev. Neurosci.* — 2002. — V.3, N1. — P.65–71.
  40. Rehen S. C., McConnell M. I., Kaushal K. et al. Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system // *PNAS USA*. — 2001. — V.98, N23. — P.13361–13366.
  41. Reitze R. L., Valcanis H., Brooker G. F. et al. Purification of pluripotent neuronal stem cell from the adult mouse brain // *Nature*. — 2001. — V.412. — P.736–739.
  42. Scheffler B., Horn M., Blumcke I. et al. Marrow-mindedness : a perspective on neurogenesis // *TINS*. — 1999. — V.22, N8. — P.348–357.
  43. Shors T. J., Miesegaes G., Beylin A. et al. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories // *Nature*. — 2001. — V.410, N6826. — P.372–375.
  44. Svendsen C.N., Smith A.G. New prospects for human stem-cell therapy in the nervous system // *TNIS*. — 1999. — V.22, N8. — P.357–364.
  45. Temple S. The development of neural stem cells / *Nature*. — 2001. — V.414, N6859. — P.112–117.
  46. Thompson K., Anantharam V., Behrstock S. et al. Conditionally immortalized cell lines, engineered to produce and release GABA, modulate the development of behavioral seizures // *Exp. Neurol.* — 2000. — V.161. — P.481–489.
  47. Tropepe V., Coles B L K, Chiasson B. J. et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye // *Science*. — 2000. — V.287, N5460. — P.2032–2036.
  48. Wagner J.P., Black I., KiCicco-Bloom E. Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic Fibroblast growth factor // *J. Neurosci.* — 1999. — V.19, N14. — P.6006–6016.
  49. Watt F.M., Hogan B. L.H. Out of Eden: stem cells and their niches // *Science*. — 2000. — V.287, N5457. — P.1427–1430.
  50. Weissman I. L. Stem cells : units of regeneration, and units in evolution // *Cell*. — 2000. — V.100, N1. — P.157–168.

Генеалогія, ідентифікація і клінічне застосування нейрональних стовбурових прогениторів

*Цымбалюк В. І., Медведєв В. В.*

На основі аналізу даних літератури розглянуті такі проблемні питання біології і клінічного застосування нейрональних стовбурових кліток, як: астроцитарна генеалогія, транс- і дедифференціаційні властивості, локалізація і регенераторна активність у дорослому організмі, участь у генеруванні енграмм пам'яті, методичні підходи маркерної ідентифікації, вирощування культури і клінічного застосування в лікуванні патологічних станів, супроводжуваних нейродегенеративними процесами.

Genealogy, identification and clinical application of neuronal stem progenitors

*Tsybalyuk V. I., Medvedev V. V.*

On the grounds of publication data, analysis there was carried out the of such problems of the biology and the clinical application of neuronal stem cells, as : astrocytic of its genealogy, trans- and dedifferentiative properties, localization and regenerative activity in adult organism, participation in generation of memory engramms, identification and cultivation, clinical using in the treatment of pathological states, accompanied by neurodegenerative processes.

## Коментарій

*к статті Цымбалюка В.І., Медведєва В.В. "Генеалогія, ідентифікація і клінічне застосування нейрональних стовбурових прогениторів"*

Стаття являється детальним і глибоким оглядом значительного масиву сучасних наукових даних, присвячених вивченню властивостей нервових стовбурових кліток (СК) і перспективам їх застосування в медицині. Дано визначення СК, наведені їх різні класифікації, описані властивості і специфічні маркери, характерні для нервових кліток і їх предшественників.

Інформація о тому, що нервові СК можна виділити з головного мозку дорослих млекопитаючих і їх здатності дедифференціюватися і трансдифференціюватися в клітки інших тканин організму (клітки крові, міоцити) являється достатньо новою і актуальною.

Значительну увагу приділено факторам росту і індукторам нейрогенезу нервових СК, способам їх виділення і культивування поза організмом, походженню і долі кліток в різних відділах ЦНС. Ця інформація має велике значення для розробки оптимальних методів культивування і дифференціювання СК.

В останньому розділі перераховані можливі джерела нервових СК для лікування нейродегенеративних захворювань, наведені дані деяких доклінічних досліджень, виконаних на мишах. Серед інших автори згадують як можливе джерело і клітки кісткового мозку. Використання цих кліток як нового джерела СК може, крім онкологічних, вирішити також імунологічні і етичні проблеми, які виникають при використанні СК, трансформованих клітинних ліній і фетальних кліток.

Стаття являється цінним джерелом нової сучасної інформації о нервових СК для біологів.

*Е.А.Щегельська  
канд. біол. наук, ст. науч. сотр.  
Інститута проблем криобіології  
і криомедицини НАН України*

## КОММЕНТАРИЙ

к статье Цымбалюка В.И., Медведева В.В. "Генеалогия, идентификация и клиническое использование нейрональных стволовых прогениторов"

Представленный к публикации обзор несомненно интересен не только нейрохирургам, но и неврологам и нейробиологам. В обзоре сделана достаточно удачная попытка осмыслить и систематизировать большой, можно сказать, лавинообразный поток научной и клинической информации о стволовых клетках (СК). Особенно широко и активно ведутся в мире исследования в области нервных СК, что обусловлено получением в последние 10 лет ряда фактов, которые позволили взглянуть на ЦНС, головной мозг с несколько иных позиций и наметить пока что теоретически пути принципиально новых технологий лечения многих нервных заболеваний. Так, к концу XX в. в биологии были разрушены два, казалось бы, незыблемых фундаментальных положения (догмы), которые просуществовали более 100 лет. Первое положение, связанное с представлением о том, что нейроны во взрослом организме не регенерируют, было оспорено тем фактом, что у грызунов и у людей в течение жизни в субвентрикулярной зоне рождаются новые нейроны (Eriksson и соавт., 1998; Goge, 2000; J.R.Lancher Ramos и соавт., 2002).

Вторая, подвергнутая пересмотру концепция, связана с представлением о филогенетическом ограничении дифференцировки клеток различных органов, а именно, что клетки определенных органов (печени, мышц, костного мозга) не могут изменить свое предназначение и превратиться в другой фенотип. В исследованиях последних 10 лет было показано, что тканеспецифические СК способны давать рост клеткам в норме, не характерным для данного органа или ткани. Например, из нервных СК можно получить линию гемопоэтических клеток (C.R.Vjornson и соавт., 1999) и, наоборот, из стромы костного мозга могут образоваться клетки скелетной мускулатуры (Wakitani и соавт., 1995), миокарда (Mokino и соавт., 1999), овальные гематоциты (Referson и соавт., 1999), а также клетки нейронов и глии ( J.R.Sanchez-Ramos, 2002), то есть возможна трансдифференцировка, "перепрограммирование" одного гистологического типа клеток в другой. В связи с этим возникают теоретические и практические перспективы лечения многих болезней, возможность получать нервные СК не только из фетальных или эмбриональных тканей, но и из собственного костного мозга больного, что позволяет избежать не только многих этических проблем, но и возникновения иммунных реакций отторжения.

В представленном обзоре обсуждаются вопросы о СК головного мозга взрослого, показано, что сегодня существует, как минимум, 4 области мозга, где локализованы нервные СК: субвентрикулярная зона боковых желудочков, зубчатая извилина гиппокампа, луковича обонятельного анализатора и субэпендимарный слой спинного мозга. Возможно, в дальнейшем будут определены и другие области мозга, где могут располагаться и дифференцироваться СК. В связи с установлением наличия СК в головном мозге взрослого организма возникает целый ряд новых вопросов. Наиболее важные из них, на мой взгляд, это как ими управлять, как их стимулировать или подавлять, как они изменяют активность и состав в организме при различных болезнях и в старости, как заставить их пролиферировать и мигрировать в очаг повреждения мозга для устранения неврологического дефицита или восстановления нейросекреторной активности и т.д.

Второе научное направление, связанное со взрослой нервной СК, условно можно назвать "болезни нервной СК", а именно изучение их гиподисфункции или гиперактивации, что может иметь отношение к таким фундаментальным проблемам, как первичные опухоли мозга, например, глиобластома или медуллобластома, которые могут развиваться из этих СК вследствие нарушения их дифференцировки. Кроме того, возможно, что при нарушении целостности СК возникает, как отмечено в обзоре, гиппокампальная височная эпилепсия.

Быстрое старение и атрофия мозга, его слабая пластично-компенсаторная активность, возможно, также связаны с изменением функции (гиподисфункция) СК и существующее представление, что ежедневно в мозгу гибнут миллионы нервных клеток и на их месте синтезируются новые клетки, как раз и оправдано и связано с активностью СК.

Следовательно, изучение «болезней СК» как самостоятельное научное направление представляет определенный интерес в плане дальнейших экспериментальных и клинических нейробиологических исследований. Важной проблемой, также поднятой в этом обзоре, является вопрос о дифференцировке СК в специализированные нервные клетки, особенно в нейроны с заданными свойствами и строением. Это наиболее трудная и пока что недостаточно изученная проблема. Принципиально уже установлены условия дифференцировки *in vitro*, что связано с необходимостью присутствия в питательной среде специальных факторов, а также специальных условий разделения клетки. Оказалось, что нервные СК плохо и медленно дифференцируются в сторону нейронов и легко и быстро — в направлении астроглии и что между этими двумя типами (предшественников глии и нейронов) существует антагонизм, и глиальные элементы опережают и подавляют дифференцировку в направлении нейронов. Поэтому актуальной задачей является подавление глиального пути для дифференцировки или разделения этих клеток на фракции после введения больным уже обогащенной субпопуляции клеток.

Вопрос дифференциации экзогенных трансплантированных СК *in vivo* изучен еще меньше, существуют два альтернативных взгляда. Так, считают, что трансплантируемые СК хорошо приживаются лишь там, где имеется соответствующее микроокружение, т.е. в зонах, где имеются собственные СК, а в других местах они лишь переживают. Другие же исследователи указывают, что СК способны приживаться в разных отделах мозга, независимо от места их естественной локализации.

В последнем разделе обзора обсуждается проблема клинического использования СК в нейрохирургии, приведены данные как клинических, так и экспериментальных исследований последних лет. Отмечено, что успех нейро-трансплантации зависит от целого ряда факторов, начиная от вида и происхождения СК и заканчивая особенностями нейрохирургической патологии. По-видимому, для каждого вида патологии необходимо разрабатывать свои условия и сроки трансплантации. В этом плане интересны исследования группы авторов по трансплантации СК при повреждении спинного мозга, которые ввели в нейротрансплантологию термин «терапевтического окна» (Nakamura и соавт., 2002). Так, в первые 7 сут после травмы, при нали-

чий інтенсивної запальної реакції в зоні ушиба, клітини відторгаються і не приживаються, також і пізніше ніж через 14 днів, коли утворюється гліальний рубець і відбувається організація рани і утворення кисти, трансплантовані клітини не приживаються. "Терапевтичне вікно" — це всього лише короткий проміжок часу між зменшенням вираженості запальної реакції і початком регенерації зв'язуючої і гліальної тканини. По-видимому, ці дані можуть бути одним з пояснень невдач клінічних і експериментальних спроб застосування як СК, так і в цілому ембріональних тканин в лікуванні гострих і особливо довготривалих хронічних захворювань. По-видимому, виходячи з існування вузького "терапевтичного вікна", трансплантат СК більш перспективна при гострій нейрохірургічній, судинній, травматичній або опухольовій патології або циклічному, ремітуючому перебігу хронічних захворювань — энцефаломієліті, розсіяній склерозі і др., хоча це не більш ніж припущення, яке потребує перевірки.

Касаючись клінічного застосування стовбурових і ембріональних клітин, хотілося звернути увагу і на інші важливі причини невідповідності між теоретичними представленнями, даними експериментальних досліджень і практичними результатами застосування нейротрансплантації. Вважають, що ембріональні клітини мозку, отримані від ембріонів в віці 8–12 тижнів, на 70–80% складаються зі стовбурових і прогениторних клітин на ранніх етапах диференціювання (Г.М.Сухої і співавт., 1988). Їх широке клінічне застосування при різних захворюваннях ЦНС (см., наприклад, матеріали останнього конгресу невропатологів, 2002) шляхом внутрим'язового, внутривенного введення не дало очікуваного результату. Нескільки кращі результати відзначені при внутримозговому введенні ембріональних клітин (В.І.Цымбалюк і співавт., 1996, 1999, 2002), але повного відновлення неврологічних, особливо рухових функцій досягти важко. Виникає питання, в чому ж причина недостатньо високої ефективності нейротрансплантації? Крім описаних вище, їх може бути ще декілька, серед них хотілося виділити наступні.

1. Імунні причини. Вважають, що стовбурові і ембріональні клітини не мають антигенів гистосумісності, а в мозку повільно відбувається реакція відторгнення. Це питання спірні, оскільки в процесі диференціювання на нервових клітинах, особливо на астроцитах представлені антигени HLA-I класу і за міри їх диференціювання починають діяти імунні реакції відторгнення клітин, які визначають їх долю.

Відторгнення аллотрансплантатів в мозку переконливо було показано в експерименті ще 60 років тому, тому в ряду зарубіжних досліджень, наприклад, при лікуванні хвороби Паркінсона пересажували ембріональну тканину в умовах імуносупресивної терапії, однак це не дозволило досягти довготривалого клінічного ефекту. Крім цього, потрібно враховувати, що у більш

останніх має високу нейросенсибілізація, імунна система реагує на антигени мозку і тому навіть трансплантат HLA-сумісних тканин, наприклад з кісткового мозку, може бути невдачною через виникнення аутоімунних реакцій організму. Необхідно проведення глибоких нейроімунних досліджень, направлених на подолання цих реакцій.

2. Фактор мікрооточення. СК локалізовані не дифузійно, а в певних ділянках мозку, де має місце, по-видимому, відповідне мікрооточення, нейротрофічні фактори, що підтримують їх проліферацію і початкову диференціювання (не встановлено, які клітинні структури мозку ці фактори секретують). Можливо припустити, що в тканині мозку і в інших спеціалізованих органах ці фактори відсутні в достатній кількості або мають специфічні інгібітори, що пригнічують диференціювання і проліферацію СК подібно до того, як нервові клітини, а саме нейрони, здатні індукувати апоптоз в лімфоцитах за рахунок Fas-ліганду (Ю.А.Зозуля, Н.І.Лисяній, 2000). Ймовірно, присутні обидва механізми (відсутність факторів і наявність інгібуючих клітинно-гуморальних факторів), які затримують регенераторні потенції СК. Ці фактори мікрооточення діють в основному на нервові СК і їх предшественників, тоді як гліальні, в тому числі мікрогліальні, знаходяться під менш жорстким контролем, тому вони частіше проліферують, беруть участь в утворенні гліальних рубців в зоні пошкодження. В мозку виникають в основному пухли гліального ряду (астроцитома, гліобластома), які розвиваються з гліальних предшественників, тоді як чисті нейрональні пухли дуже рідкі. Можливо, ці механізми «затримання росту СК» затримують ріст опухолей, що походять з нейронів.

3. Механічні фактори. Не виключено, що низький ефект нейротрансплантації обумовлений тим, що функціонуванню СК заважають інші клітини, а саме клітини глії і зв'язуючої тканини, які утворюють і покривають нейрони і заважають інтегруватися з відповідними нейронами і їх нервовими кінцівками. Крім того, для повноцінної диференціювання і функціонування клітин необхідно проростання в нейротрансплантаті судин, нормальне капілярне кровообігання, для цього потрібні фактори росту судин, інакше тканина гіпоксія може пошкодити трансплантат.

Кількість факторів, що впливають на долю нейротрансплантата, по-видимому, значно більше, ніж можна припустити, і це не дивно, оскільки впровадження принципіально нової технології лікування потребує постійного рішення нових завдань.

В висновок необхідно зазначити, що авторами проведена велика робота по складанню огляду, який значно розширює наші уявлення про природу і диференціювання СК, їх клінічне застосування, необхідно подальше вивчення як природи, так і ефективності клінічного застосування СК.

*Н.І.Лисяній  
доктор мед. наук, професор,  
зав. відділом нейроімуннології  
Інститута нейрохірургії  
ім. акад. А.П.Ромоданова АМН України*