

Neural stem cells

Г.П.Павлова

- **1965** году Джозеф Алтман (Joseph Altman) с коллегами показали, что новые нейроны регулярно появляются у взрослых крыс в гиппокампе, - область мозга важная для обеспечения ранних фаз обучения и памяти.
- **1980** году Фернандо Ноттебом (Fernando Nottebohm) обнаружил, что мозг певчих птиц, таких как канарейки, продуцирует новые нервные клетки в течение того времени, пока птицы учатся петь новые песни. Эта работа интересна тем, что демонстрирует связь образования новых нейронов с конкретным видом поведения. Позже Ноттебом показал, что новые нейроны в гиппокампе образуются в течение всей жизни птиц.
- **1998** году Фред Гэйдж (Fred Gage) и Питер Эрикссон (Peter Eriksson) проанализировали гиппокампальную ткань, изъятую у пяти пациентов, которые умерли от рака. Эти пациенты, в свое время, получили инъекцию BrdU в диагностических целях (поскольку BrdU накапливается в делящихся клетках, то с его помощью можно найти раковые клетки). Гейдж и Эрикссон обнаружили большое количество нейронов, помеченных BrdU в гиппокампальной ткани у всех пяти пациентов. Возраст этих пациентов был в пределах 57-72 года. Авторы полагают, что новые нейроны образуются в гиппокампе в течение всей жизни человека.
- **1999** году в «Science» Элизабет Гоулд (Elizabeth Gould) и Чарлз Гроссом (Charles Gross), было показано, что зрелый мозг продуцирует новые нейроны в количестве нескольких тысяч в день в течение всей жизни.

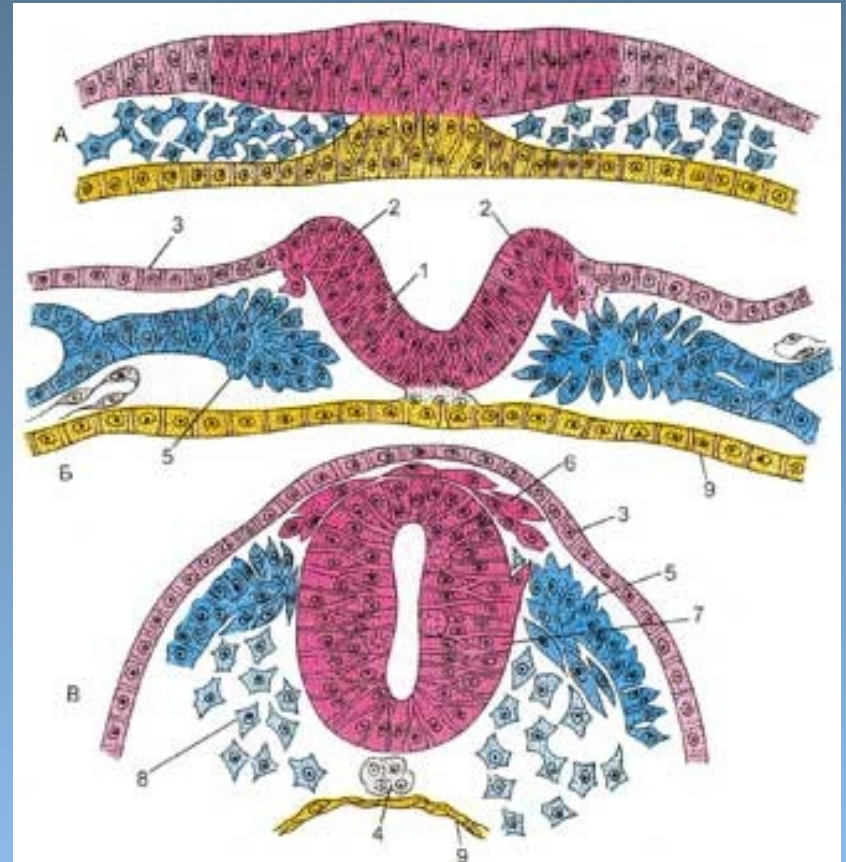
- *Нейральные (нейрональные) (neural stem cells) стволовые клетки в головном мозге* - тканеспецифичные стволовые клетки располагающиеся в определенных зонах мозга, отвечают за обновление клеточной популяции, первыми активируются при повреждении. НСК дают начало трем основным типам клеток: нервным клеткам (нейронам) и двум группам не нейрональных клеток - астроцитам и олигодендроцитам.

- Чем отличаются нейральные стволовые клетки и нейрональные стволовые клетки?

Одна из версий классификации

- Нейральные стволовые клетки – мультипотентные клетки, чьи дочерние клетки могут дифференцироваться во все типы нейральных клеток
- Нейрональные стволовые клетки- клетки, которые дают начало нейронам (тогда причем тут мультипотентность?)

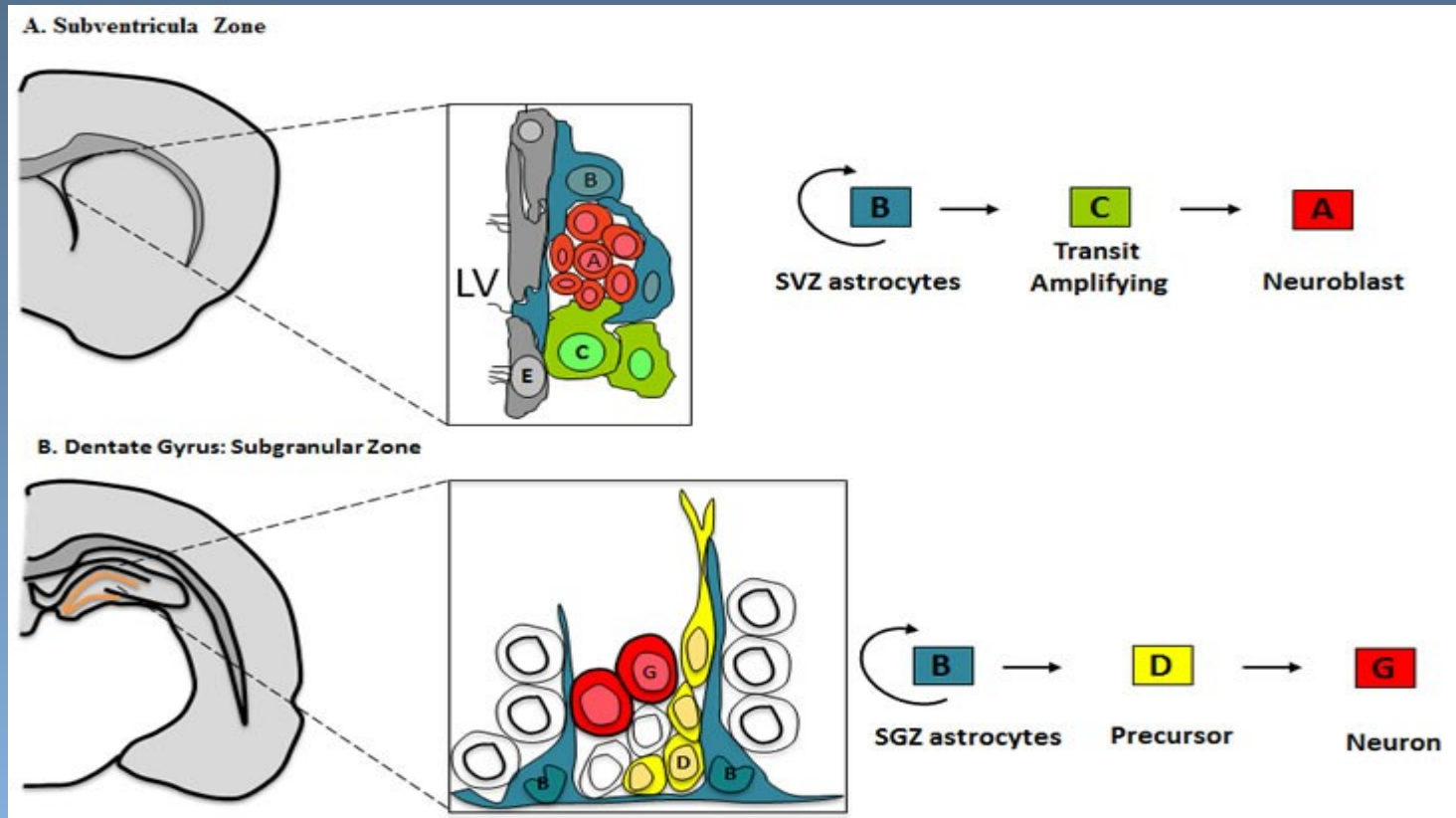
- Нервная ткань развивается из дорсальной эктодермы. У 18-дневного эмбриона человека эктодерма по средней линии спины дифференцируется и утолщается, формируя **нервную пластинку**, латеральные края которой приподнимаются, образуя **нервные валики**, а между валиками формируется **нервный желобок**.
- Передний конец нервной пластинки расширяется, образуя позднее головной мозг. Латеральные края продолжают подниматься и растут медиально, пока не встретятся и не сольются по средней линии в **нервную трубку**, которая отделяется от лежащей над ней кожной эктодермы. Полость нервной трубки сохраняется у взрослых в виде системы желудочков головного мозга и центрального канала спинного мозга.
- Часть клеток нервной пластинки не входит в состав ни нервной трубки, ни кожной эктодермы, а образует скопления по бокам от нервной трубки, которые сливаются в рыхлый тяж, располагающийся между нервной трубкой и кожной эктодермой, — это **нервный гребень** (или ганглиозная пластинка).
- Из нервной трубки в дальнейшем формируются нейроны и макроглия центральной нервной системы. Нервный гребень дает начало нейронам чувствительных и автономных ганглиев, клеткам мягкой мозговой и паутинной оболочек мозга и некоторым видам глии: нейролеммоцитам (шванновским клеткам), клеткам-сателлитам ганглиев. Из нервного гребня развиваются также клетки мозгового вещества надпочечников, меланоциты кожи, часть клеток APUD-системы, сенсорные клетки каротидных телец.



Во взрослом мозге НСК сохраняются в структурах переднего мозга –

- 1. В субвентрикулярной зоне (subventricular zone, SVZ) боковых желудочков, где локализованы клетки-предшественники нейронов обонятельных луковиц,**
- 2. В субгранулярной зоне (subgranular zone, SGZ) зубчатой извилины гиппокампа, где образуются гранулярные нейроны, участвующие в поддержании памяти**

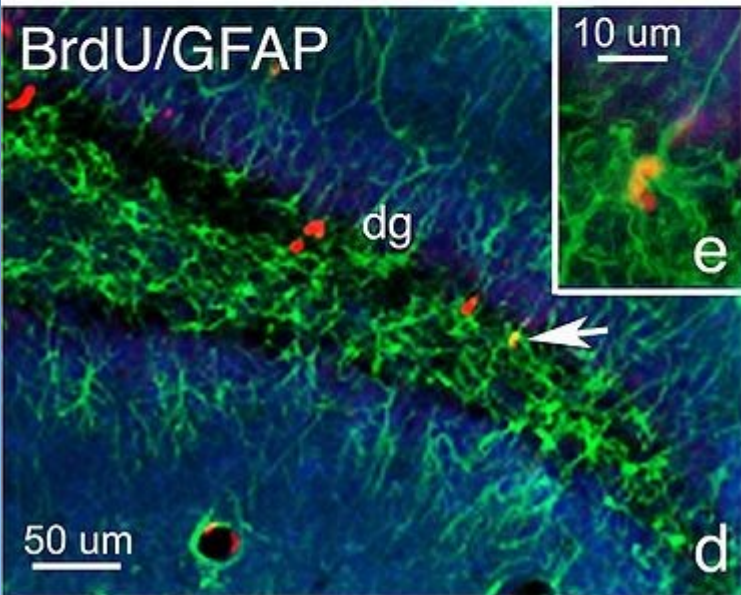
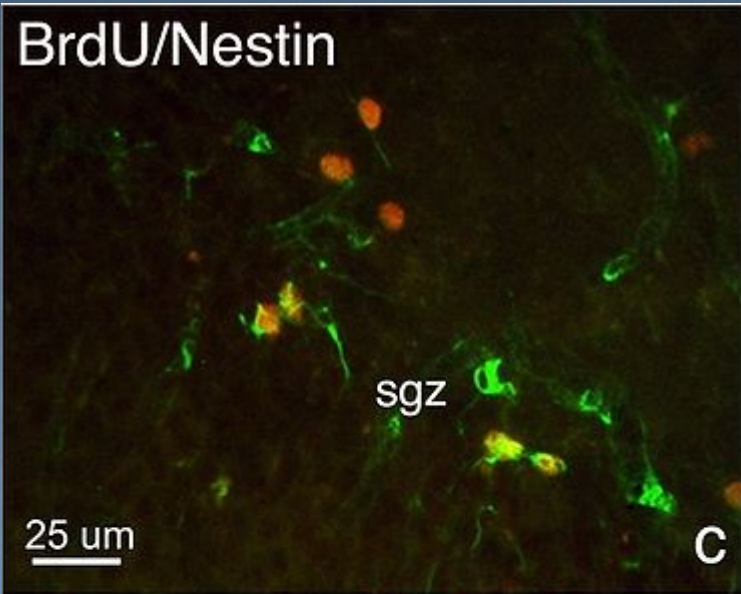
Cellular composition and cytoarchitecture of germinal regions within the adult brain



- **A) Frontal schema of the Subventricular zone in the adult mouse brain and the cell types from which it is composed.** Multi-ciliated ependymal cells (E, Gray) line the lateral ventricle (LV). SVZ astrocytes (B, Blue) are primary progenitors which generate neuroblast (A, Red) through a rapidly dividing transit amplifying cell (C, Green). Occasionally Type B cells extend a short primary cilium into the ventricle.
- **B) Frontal schema of the Subgranular Zone within the dentate gyrus of the adult mouse brain.** The cell types that compose the SGZ include, SGZ astrocytes (B, Blue), the in-vivo primary precursors of new granule neurons (G, Red) through an intermediate precursor Type D cell (D, Yellow).

Основные маркеры нейральной дифференцировки

- **нестин** - маркер для идентификации стволовых клеток в различных областях развивающейся и зрелой ЦНС.
- **виментин** – белок, экспрессирующийся в нервных и глиальных клетках-предшественниках, реактивных астроцитах, клетках мезенхимного ряда, фибробластах
- **GFAP** - глиальный фибриллярный кислый белок– маркер клеток астроглии
- **β-тубулин III** - маркерный белок нейробластов (не зрелый нейрон)
- **Нейрофиламенты** – белки, экспрессирующиеся в дифференцированных нейронах
- **NeuN** – ДНК-связывающий белок, экспрессирующийся исключительно в дифференцированных нервных клетках
- **MAP2 (Microtubule-associated protein 2)** - ассоциированный с микротрубочками белок (маркер зрелых нейронов)

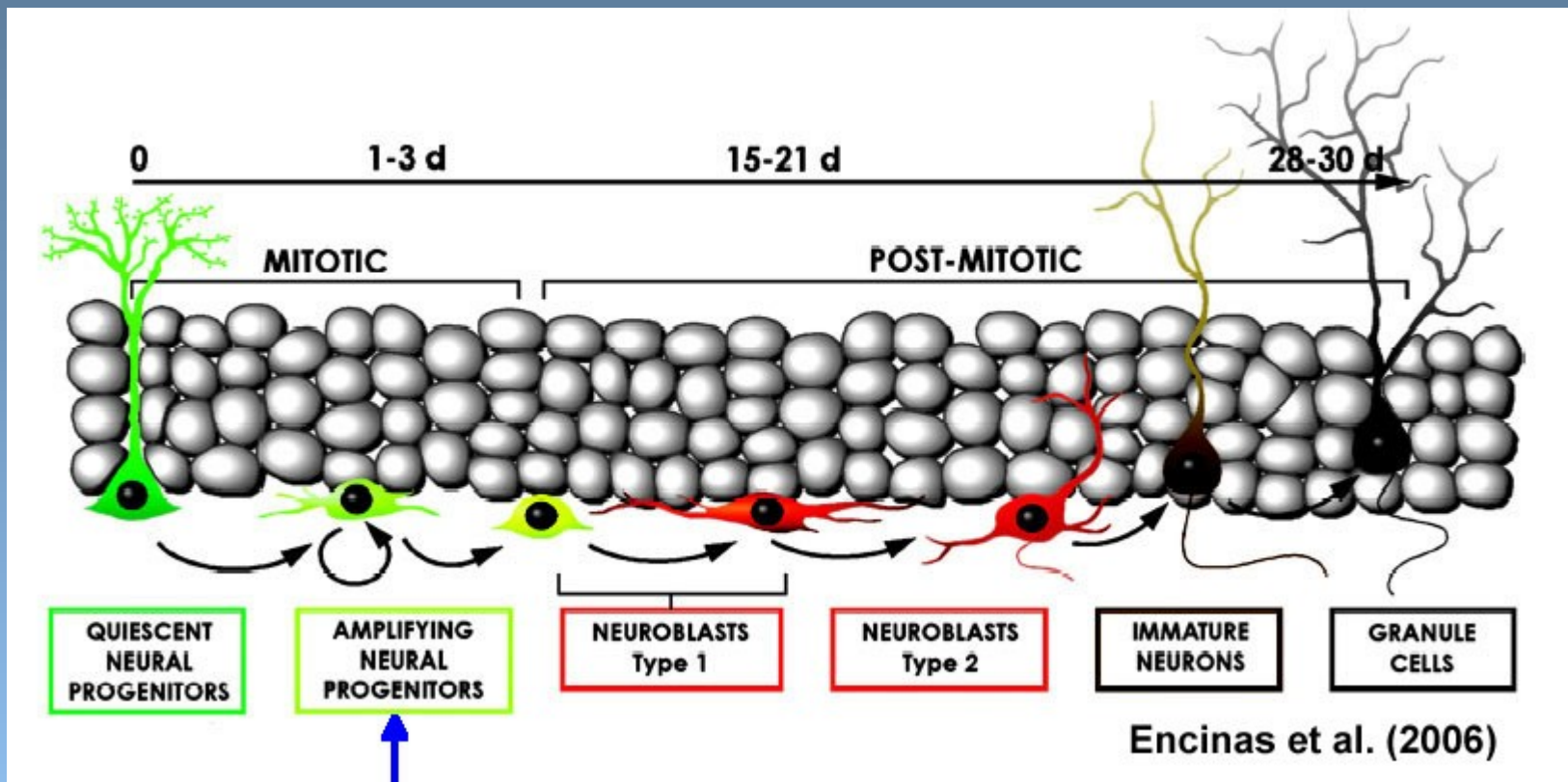


BrdU (красный),
маркер
реплицирующейся
ДНК.

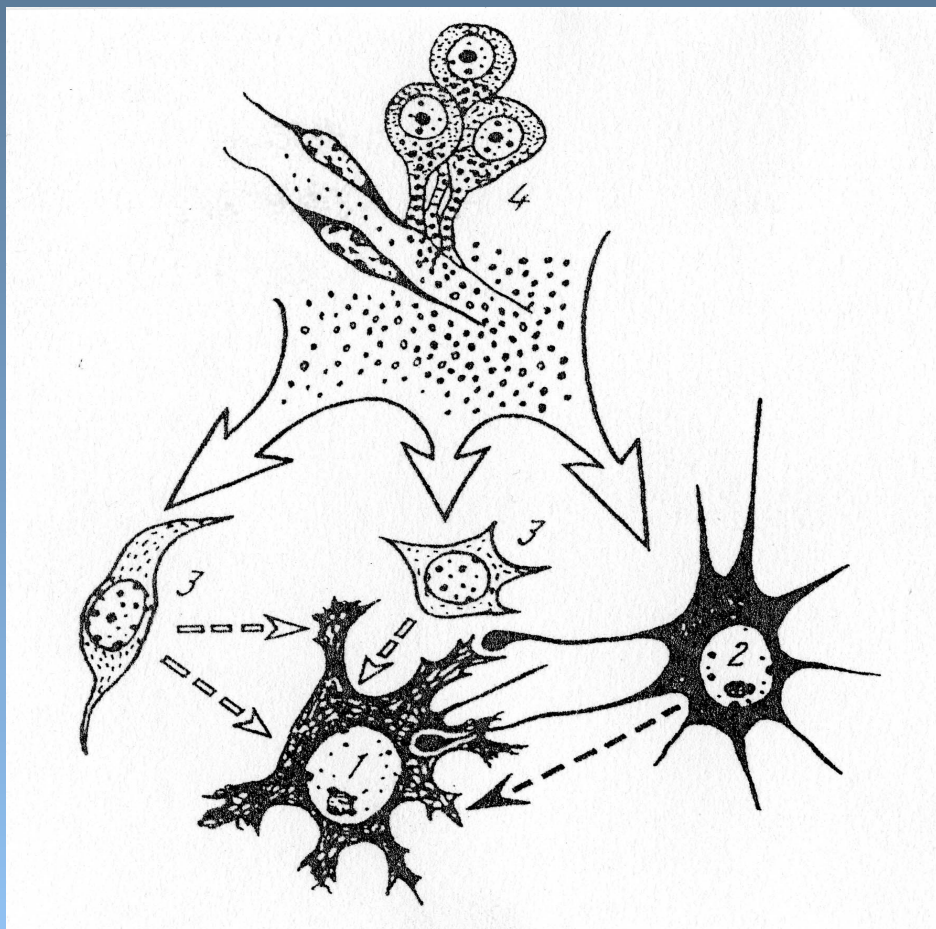
Нейрогенезис в
субгранулярной
зоне гиппокампа.

Faiz et al., 2005.

Этапы дифференцировки нейральных клеток



Формирование фенотипа нейронов.



Влияние на
нейральную
дифференцировку
in vivo:

1. Гормональный статус организма
2. Влияние экспрессии генов в клетках окружения
3. Экспрессия генов в собственно дифференцирующейся клетке

По Корочкину Л.И.

Выбор пути дифференцировки по Уоддингтону

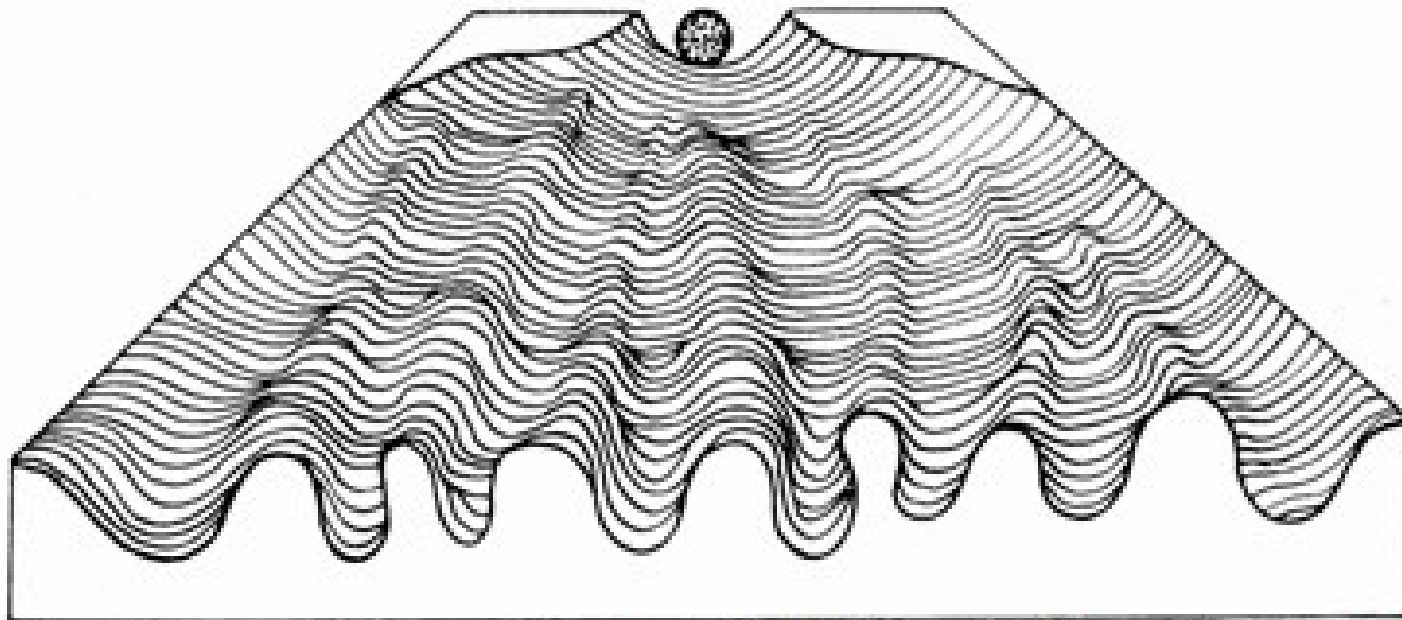
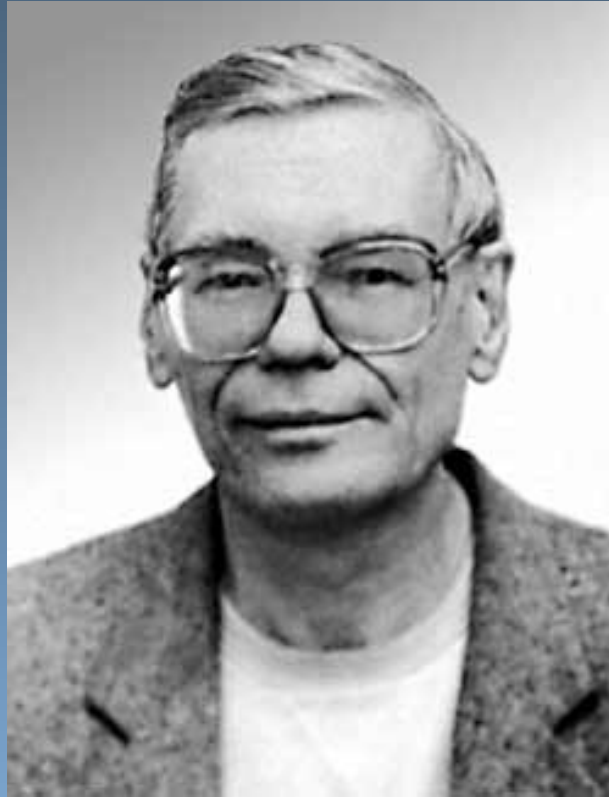
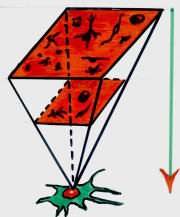


Рис. 33. Эпигенетический ландшафт Уоддингтона

Леонид Иванович Корочкин



1. Теория «качелей»
2. исследование иерархической зависимости генетической активации (гены-господа и гены-рабы)
3. Один из первых предложил использовать аутологичные стволовые клетки (опасаясь туморогенности другого мклеточного материала)
4. Утверждал, что для правильной дифференцировки нейральных клеток необходима «ниша»



**Схема клеточной
дифференцировки по
Уоддингтону.
Последовательное и
однонаправленное сужение
перспективных потенциалов**

Принцип «качелей»

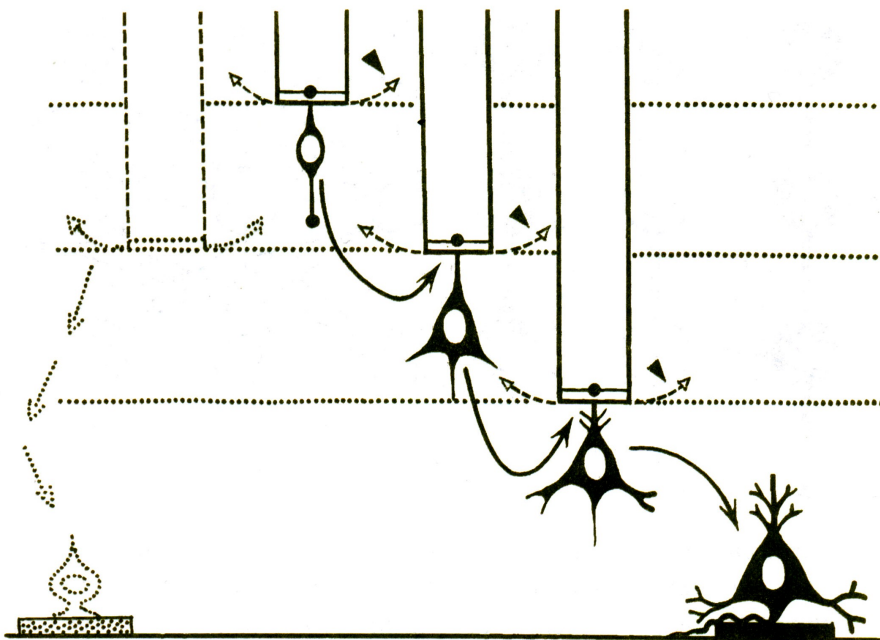
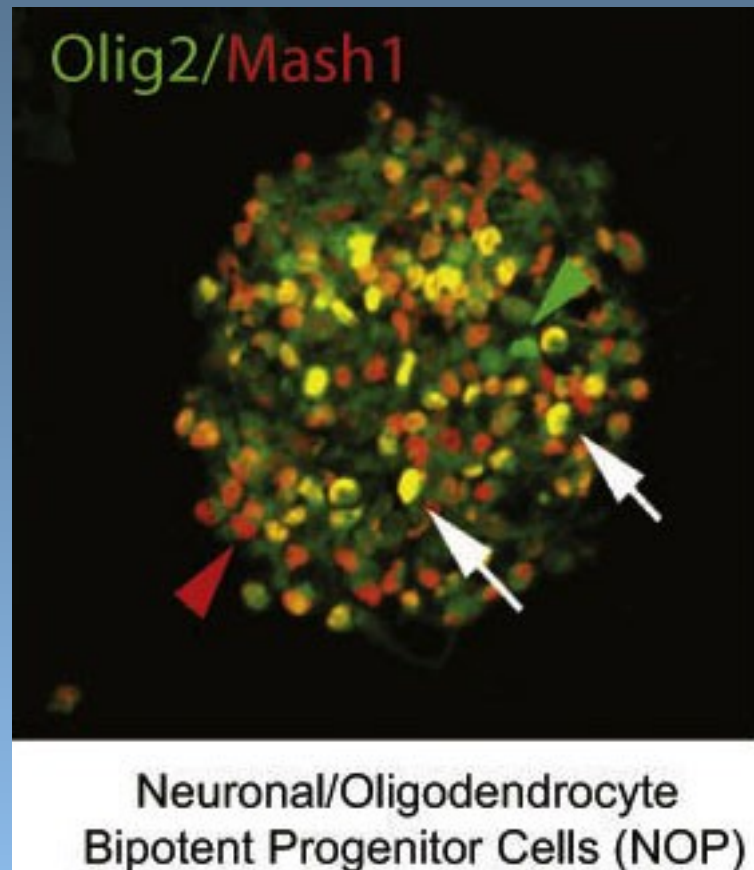


Рис. 5.14. Принцип «качелей». Объяснение в тексте. По Корочкину.

- Например, дифференцирующийся в адренэргическом направлении нейробласт содержит как мРНК, синтезирующую белок, свойственный этому типу нервных клеток (тирозингидроксилазу), так и мРНК, обслуживающую холинэргический путь развития. (*Chikaraichi D. Sinauer Unc Publ. Mass. 1988, Schotzinger R., Landis S. Nature. 1988*)

- J Cell Biochem. 2008 Jul 1;104(4):1342-55.
- **Coexpression of osteogenic and adipogenic differentiation markers in selected subpopulations of primary human mesenchymal progenitor cells.**
- Ponce ML, Koelling S, Kluever A, Heinemann DE, Miosge N, Wulf G, Frosch KH, Schütze N, Hufner M, Siggelkow H.
- Department of Gastroenterology and Endocrinology, Georg-August-University Goettingen, Goettingen, Germany.

Коэкспрессия маркеров (принцип качелей)

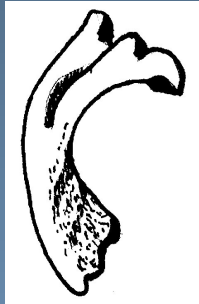


- “Long noncoding RNAs in neuronal-glia fate specification and oligodendrocyte lineage maturation” Mereer et al., BMC Neuroscience 2010

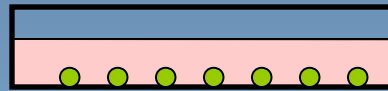
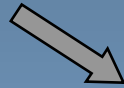
Методы индукции

- **Ко-культивация с клетками, синтезирующими необходимые факторы**
- **Использование кондиционной среды**
- **Использование отдельных индукторов**
- **Получение трансгенных клеток, синтезирующих индуцирующие факторы**

ИНДУКЦИЯ НЕЙРАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

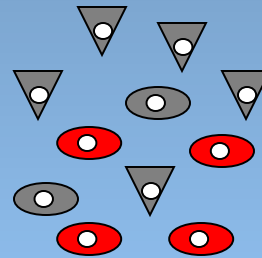
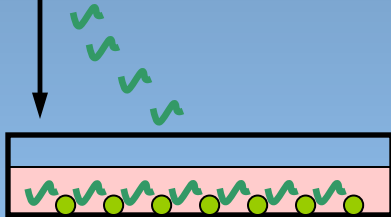
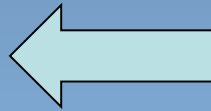


Выделение стромальных клеток из костного мозга человека (из ребра или подвздошной кости)



Культивирование стромальных СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

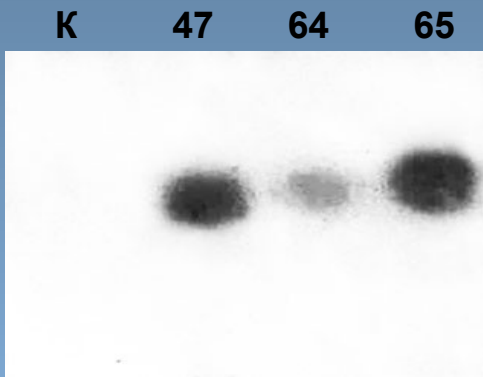
Добавление ретиноевой кислоты в культуру СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК



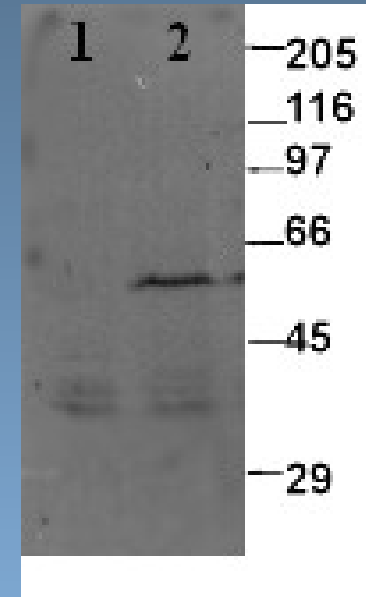
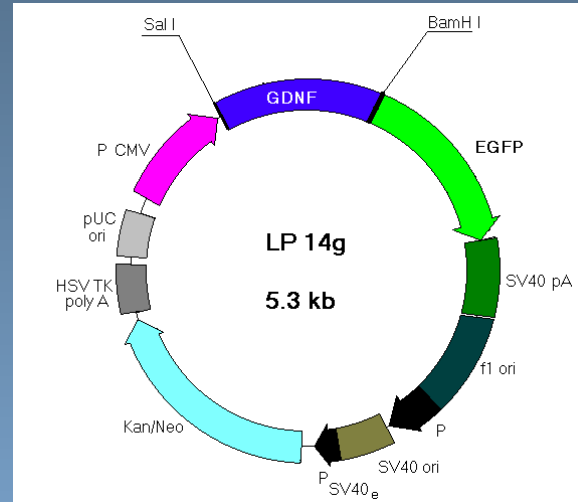
Клетки нейронального ряда
Нейральные элементы

- **Получение трансгенных культур клеток, содержащих гены нейротрофических факторов, в качестве индуцирующих фабрик**

Получение генномодифицированной линии HEK293, содержащей гены *gdnf/gfp*.



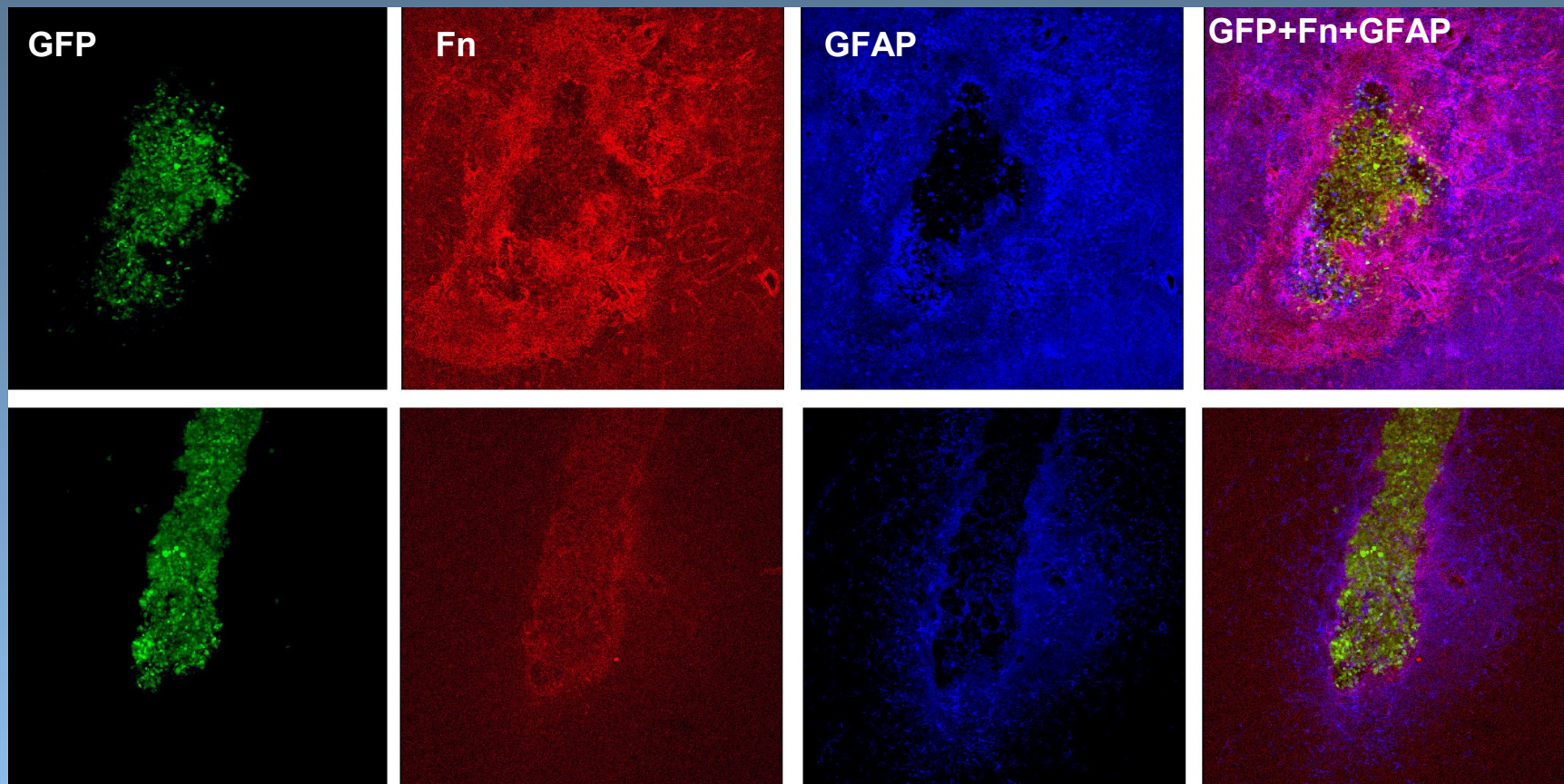
Нозерн-блот гибридизация линии эмбриональных почечных клеток человека (HEK293) с двойной трансфекцией (гены *GDNF/GFP*). К- контроль (исходные клетки). 47,64,65-выбранные варианты трансгенных культур.



Вестерн-блот гибридизация. 1-лизат клеток линии HEK293, трансфицированных рEGFP-N1,2- лизат клеток линии HEK293 *GDNF/GFP*. Цифрами отмечены молекулярные массы белков, входящих в состав маркера.

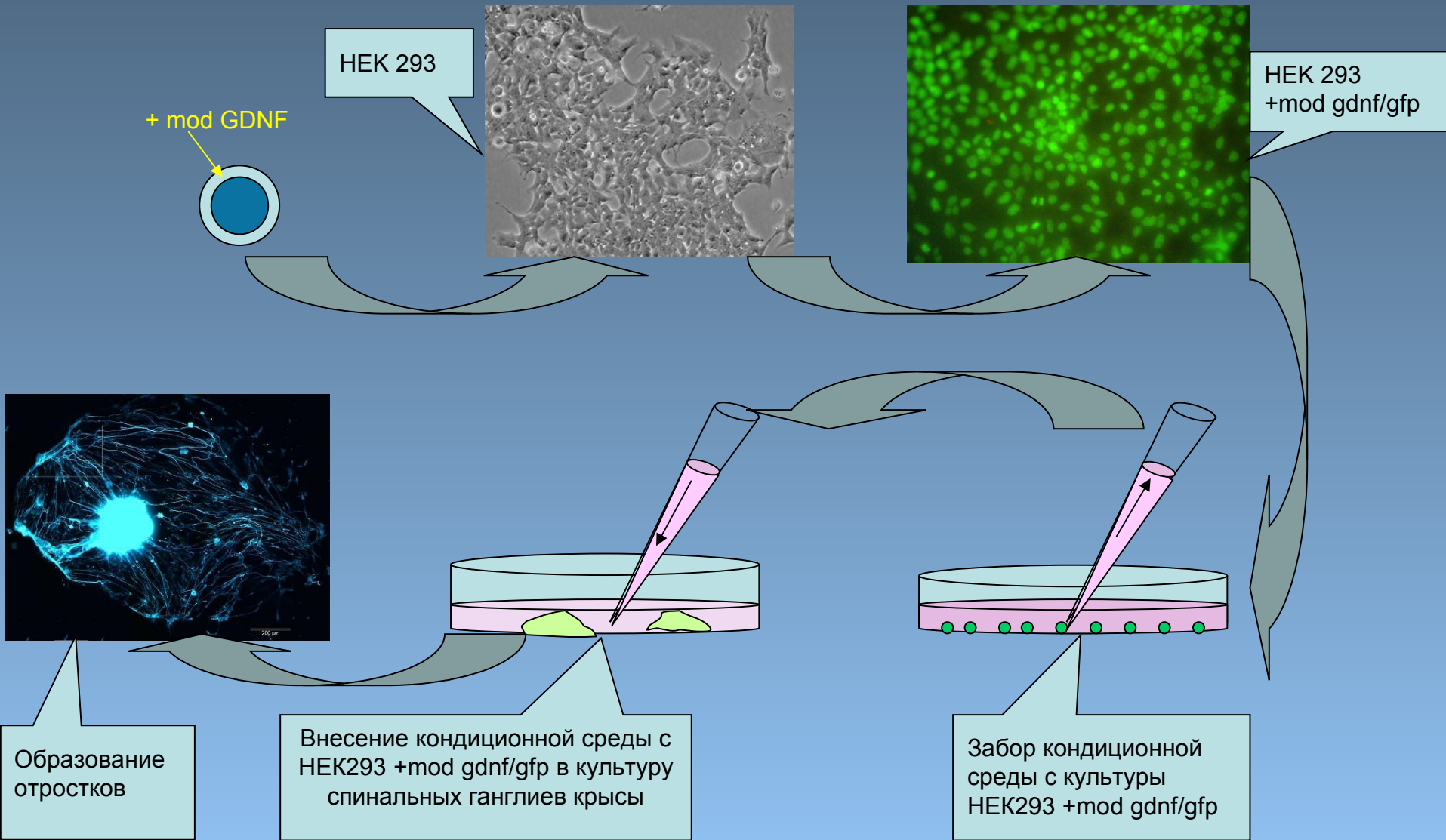
Трансплантация клеток НЕК 293, содержащих LP14g(*gdnf/gfp*) в полосатое тело мозга крысы(18 суток после трансплантации)

Контроль

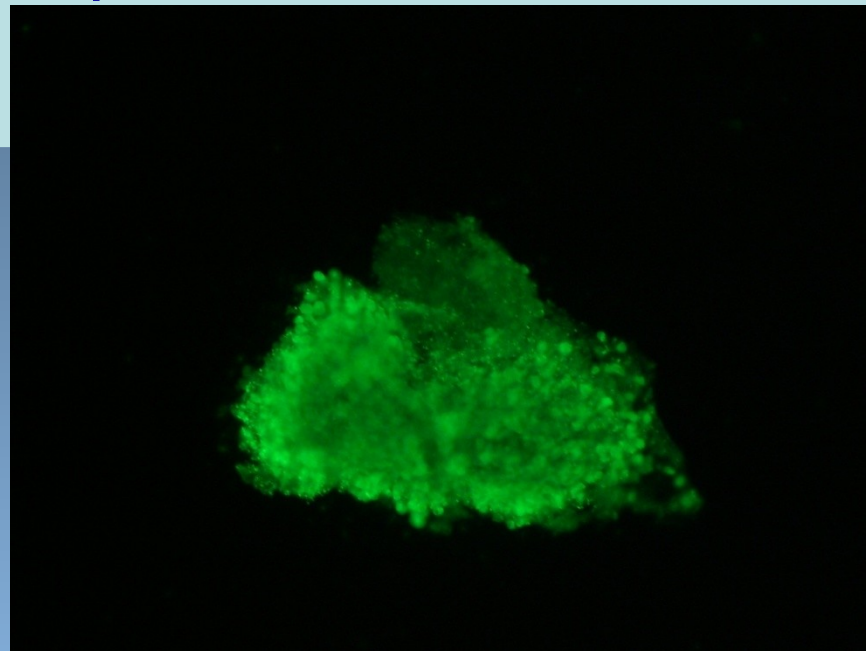
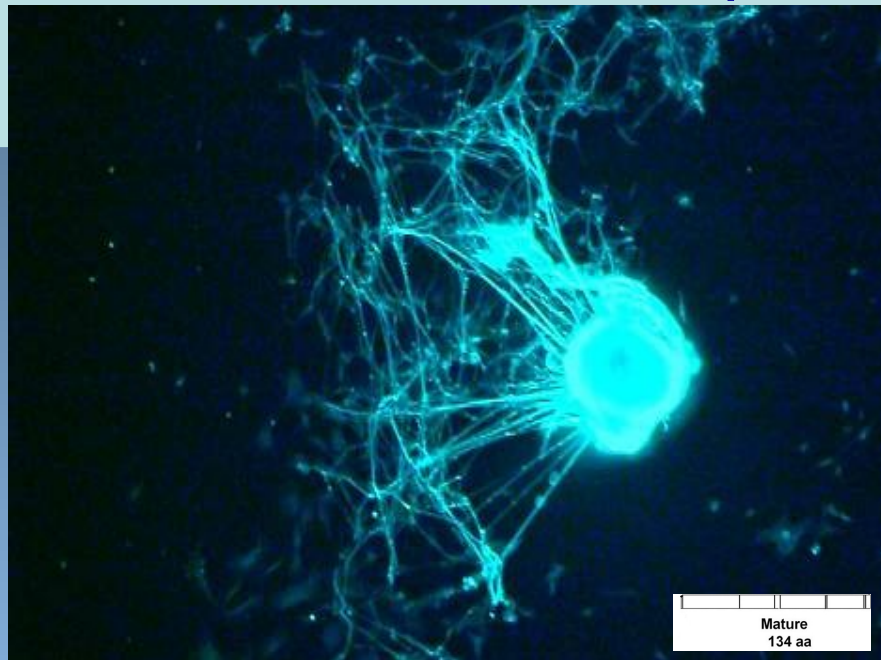


Опыт (GDNF)

СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА ПО ИНДУКЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ НЕЙРАЛЬНЫХ ОТРОСТКОВ В КУЛЬТУРЕ СПИНАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ КРЫСЫ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ modif. gdnf



Влияние трансгенного фактора m-GDNF на образование нейральных отростков у культивированных цельных спинальных ганглиев эмбрионов крысы

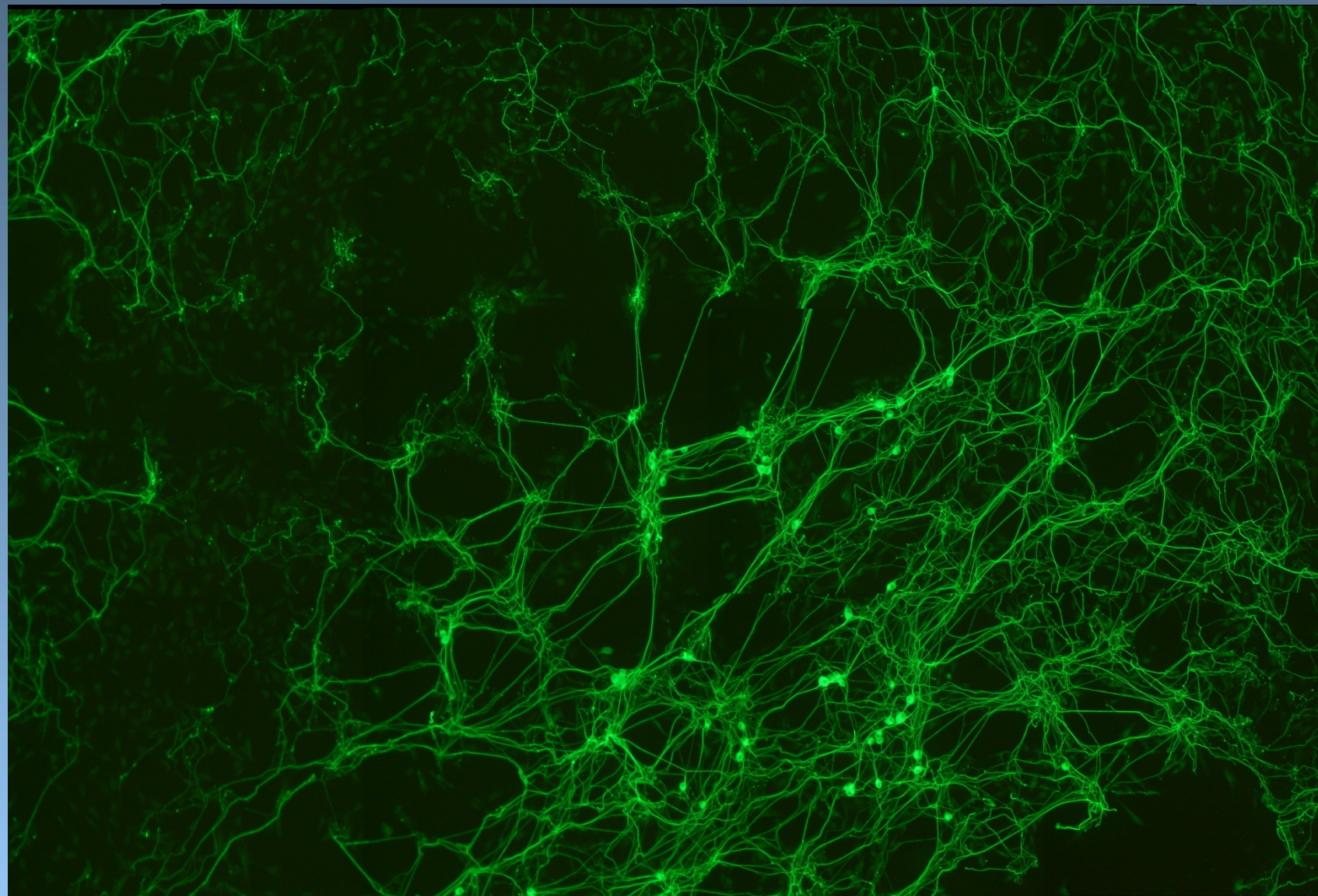


Флуоресцентная микрофотография спинального ганглия прокультивированного 10 дней в присутствии А) m-GDNF, В) контроль (ростовая среда).

Иммуноцитохимическая реакция на бета-3-тубулин, выявленная с помощью вторичных антител конъюгированных с флуоресцентным красителем Cy2.

Масштаб справа внизу – 200 микрометров.

Влияние трансгенного фактора m-GDNF на образование нейральных отростков у культивированных диссоциированных спинальных ганглиев эмбрионов крысы

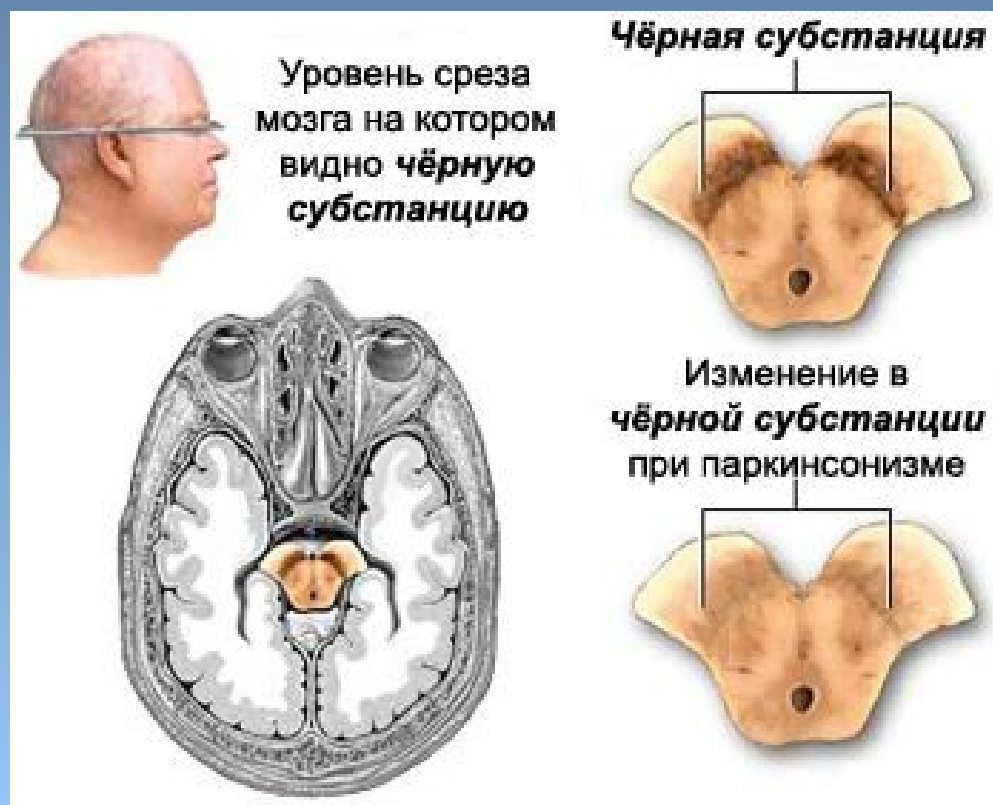


Нейродегенеративные заболевания, которые можно лечить трансплантацией клеток

- **Болезнь Альцгеймера**
- **Болезнь Паркинсона**
- **Амиотрофия Шарко-Мари**
- **Боковой амиотрофический склероз**
- **Макулодистрофия сетчатки**

- **Болезнь Паркинсона – это прогрессирующее заболевание нервной системы, проявляющееся замедлением и уменьшением количества движений, обеднением мимики и жестикуляции, повышением мышечного тонуса и тремором (дрожанием).**

Черное вещество мозга человека содержит дофаминэргические нейроны, которые с возрастом дегенерируют. При паркинсонизме процесс дегенерации нейронов идет ускоренными темпами.



Нарушения путей дифференцировки при культивировании

- 1. При культивировании появляется опасность накопления мутаций
- 2. При культивировании происходит потеря «эффекта ниши»

RAPD-PCR анализ ДНК

Изменения подвижности или появление/утрачивание фрагментов ДНК в RAPD-PCR спектре может быть связано с **геномными перестройками или мутациями**, затрагивающими участки комплементарного связывания ДНК с олигонуклеотидными праймерами.

Таким образом:

Для лечения стволовыми клетками можно использовать материал самого пациента, полученный из разных источников - как-то костный мозг (стромальные стволовые клетки), жировая ткань, носовая полость и т.д.

Необходимо строго контролировать геномную стабильность клеток и их дифференцировку