

УДК 576.7:612.82

ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОГЕНЕЗА В ЦНС ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА: ОТ ТЕОРИИ К ЭКСПЕРИМЕНТУ

¹Обухов Д.К., ²Пущина Е.В., ²Вараксин А.А., ²Стуканева М.Е., ³Цехмистренко Т.А.

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург;

²Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток;

³Российский университет дружбы народов, Москва, e-mail: dkobukhov@yandex.ru

В работе представлен краткий обзор собственных и литературных данных об эмбриональных и постэмбриональных периодах развития ЦНС животных и человека. С позиций современной нейробиологии обсуждаются вопросы об эмбриональных источниках нервных и глиальных клеток, факторах и сигнальных молекулах, влияющих на пролиферацию и дифференцировку нейрональных стволовых клеток и их потомков на примере развития головного мозга млекопитающих. Особое внимание уделено вопросу об участии газообразных субстанций NO, CO, H₂S и нейромедиаторов в регуляции и контроле нейрогенеза. Подчеркивается ведущая роль клеток радиальной глии в миграции и дифференцировке нейронов в пре- и постнатальном развитии. Показано, что популяция нейронов в формирующейся коре головного мозга – смешанная и имеет разные источники формирования. Большая часть нейронов коры образуется из нейрональных стволовых клеток, расположенных в субпаллиальных нейрогенных зонах (MGE и LGE). Также дискутируется вопрос о постнатальном нейрогенезе, его значении в регенерации нервной ткани, как в норме, так и при патологии. Подробно освещается проблема сходства и различия нейрогенных зон в ЦНС млекопитающих и других позвоночных животных. Обсуждаются перспективы изучения постнатального нейрогенеза для регенерации мозга. Приводятся данные об экспериментах по изучению нейрогенеза в мозге после травмы.

Ключевые слова: ЦНС позвоночных и человека, нейрональные стволовые клетки, пре- и постнатальный нейрогенез, регенерация нервной системы

FEATURES OF NEUROGENESIS IN THE CNS OF VERTEBRATES AND HUMANS: FROM THEORY TO EXPERIMENT

¹Obukhov D.K., ²Puschina E.V., ²Varaksin A.A., ²Stukaneva M.E., ³Tsekhmistrenko T.A.

¹Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg;

²National Center Marine Biology RAS, Vladivostok;

³People Friendship University, Moscow, e-mail: dkobukhov@yandex.ru

Work presents brief survey its own and literature data about the embryonic and postembryonal development periods CNS of animals and man. From the positions of contemporary neurobiology are discussed questions about the embryonic sources of nerve and glial cells, the factors and the signal molecules, which influence on the proliferation and differentiation of neuronal stem cells and their descendants based on the example of the development of the brain of mammals. Special attention is given to a question about the participation of gaseous substances NO, CO, H₂S and neuromediators in the regulation and the control of neurogenesis. Is emphasized the leading part of the cells of radial glia in migration and differentiation of neurons in pre – and postnatal development. It is shown that the population of neurons in the forming cerebral cortex – mixed and has the different sources of shaping. The large part of the neurons of crust is formed from neuronal stem cells, located in subcortical neurogenic zones (MGE and LGE). Also discuss a question about the postnatal neurogenesis on the CNS vertebrate animals and man, its value in the regeneration of nerve tissue both within the standard and with the pathology. In detail is consider the problem of similarity and difference in the neurogenic zones in CNS of mammalian and other vertebral animals. The prospects of studying the postnatal neurogenesis for the regeneration of the brain are discussed. Data on experiments on neurogenesis in the brain after injury are presented.

Keywords: CNS of vertebrates and humans, neuronal stem cells, pre- and postnatal neurogenesis, nervous system regeneration

Процессы раннего развития ЦНС животных и человека всегда были в центре внимания биологов и медиков. Именно в этот период происходят наиболее важные события, касающиеся будущей судьбы отделов ЦНС, нарушение формирования которых драматически сказываются на всей дальнейшей судьбе организма [1, 2]. Появление в последние годы новых методов исследования нервной системы (иммуногисто- и цитохимия, электронная и конфокальная микроскопия, геномный анализ и др.) привели к существенным изменени-

ям во взглядах на процессы формирования нервной системы в пре- и постнатальных периодах развития организма позвоночных животных и человека. Особое внимание заслуживают данные по экспериментальным моделям изучения нейрогенеза во взрослом мозге в норме и после травмы [3, 4].

Представлен краткий обзор собственных исследований и данных литературы о проблемах пре- и постнатального развития нервной системы позвоночных животных. Особое внимание уделено вопросам репарации нервной системе в условиях травмы.

Особенности пренатального развития нервной системы

Пренатальное развитие ЦНС человека обычно разделяют на эмбриональный (первые 8 недель) и фетальный периоды (с 9 недели до рождения) [1, 5]. В процессе формирования нервной пластинки и нервной трубки на клетки первичного эпителия действует большое количество сигнальных молекул: хордин (chordin), ноггин (noggin) и фоллистатин (follistatin), индуцирующих процесс образования нейроэпителия и нейрональных стволовых клеток (НСК), из которых будут формироваться все элементы нервной ткани. Особо следует отметить регуляторные белки из семейства BMP, которые влияют на разнообразные процессы в развивающемся мозге: пролиферацию региональных стволовых клеток и их потомков; клеточную гибель; миграцию и дифференцировку НСК, а также определяют градиент ростро-каудального и дорсо-вентрального развития ЦНС [5, 6].

Нейральные стволовые клетки активно делятся и в процессе прохождения клеточного цикла претерпевают сложные превращения, связанные с последовательным перемещением ядродержащей части клетки по отросткам, получившие наименование – интеркинетическая ядерная миграция. В результате формируется одно из первых структурных образований развивающейся стенки нервной трубки – вентрикулярный слой или зона (VZ). Наиболее важным для развития мозга является фактор-SHH (sonic hedgehog), направляющий дифференцировку НСК в сторону нейронного дифферона и регулирующий развитие вентральных отделов нервной трубки. Дорсальную часть нервной трубки (крыловидную пластинку) контролируют морфогенетические белки BMP4 и BMP7, секретлируемые клетками эктодермы и ряд других ростовых и транс-

крипционных факторов (Pax 3,4,6), FGF8 – фактор роста фибробластов, GDNF – нейротрофический фактор глии, BDNF, NT3,4 – нейротрофические факторы мозга и др.). SHH контролирует разделение вентральных отделов переднего мозгового пузыря на медиальный (MGE) и латеральный (LGE) ганглионарные гребни, НСК которых формируют популяции нейронов, мигрирующие в подкорковые и корковые отделы полушарий конечного мозга. Относительно недавно было установлено, что некоторые нейротрофины (BDNF, NT-3 и NT-4) способны поддерживать как пролиферацию, так и плюрипотентность НСК клеток [6, 7].

В настоящее время показано, что популяции клеток, составляющих вентрикулярный (VZ) и формирующийся несколько позднее субвентрикулярный (SVZ) слои, неоднородны. В зависимости от присутствия у клеток отростков и характера их контакта с поверхностями стенки мозга выделяют три класса клеток предшественников: монополярные, биполярные и неполярные. Биполярные клетки (или апикальные предшественники AP) – представляют собой либо НСК клетки, либо клетки так называемой радиальной глии (RG), в которые НСК превращаются на самых ранних этапах нейрогенеза. Монополярные предшественники появляются на более поздних стадиях, когда в стенке мозга формируется субвентрикулярный (SVZ) слой, содержащий так же как и вентрикулярный слой НСК. Во внутренних слоях субвентрикулярной зоны у человека недавно были обнаружены клетки предшественники с неполярной морфологией. Характерной чертой этих клеток является ретракция отростков перед митозом и потеря их контакта с апикальной и базальной поверхностью стенки мозга. Они получили наименование – базальные предшественники (BP) [2, 5].

Гены и продукты их экспрессии, контролирующие различные процессы развития отделов и структур головного мозга (по: 2, 3, 6, 9)

Ген	Место экспрессии	Функция
Dlx1 Dlx 2, Dlx 5	Субпаллиум (ганглионарные возвышения), промежуточный мозг	Миграция субпаллиальных нейробластов, миграция нейронов в кору из ганглионарных возвышений переднего мозгового пузыря
Emx 1, Emx 2	Конечный мозг	Пролиферация клеток в развивающемся мозге, миграция нейробластов
Lhx 1, Lhx 2, Lhx 5	Передний мозг, кора полушарий	Формирование подкорковых и корковых (архикортекс) отделов полушарий
Nkx 2,1 Nkx 2,2	Вентральные отделы полушарий	Пролиферация и миграция нейробластов в стриатуме
Otx 1, Otx 2	Передний мозг, средний мозг, передние отделы ствола мозга	Формирование структуры полушарий, включая кору мозга
Pax 3, Pax 6	Передний мозг	Миграция нейробластов в дорсальных отделах полушарий

Фактически мы имеем дело с двумя путями образования нейронов в развивающемся мозге. Это путь прямого нейрогенеза, когда источником нейробластов являются непосредственно НСК и нейрогенная радиальная глия (RG), т.е. апикальные предшественники с моно- или биполярной морфологией, и путь непрямого нейрогенеза, когда источником нейробластов служат промежуточные нейрональные предшественники, являющиеся потомками клеток радиальной глии, т.е. базальные предшественники. Непрямой путь нейрогенеза может выступать в роли быстрого увеличения количества нейронов в условиях ограниченного времени (каждое асимметричное деление радиальной глии через стадию промежуточного нейронального предшественника может давать два-четыре нейрона) и тем самым регулировать площадь и толщину стенки мозга [8].

Формирование отделов мозга находится под контролем так называемых «вторичных организаторов» – групп клеток, синтезирующих ряд морфогенетических и транскрипционных факторов, градиент концентрации которых определяет направление миграции и дифференцировки нейронов в разных структурах мозга (таблица).

На более поздней стадии развития формирование зачатков больших полушарий млекопитающих и человека происходит одновременно с развитием так называемого медиального (MGE), латерального (LGE) и каудального (CGE) ганглионарных возвышений, расположенных в вентральных отделах полушарий. Данные структуры принимают участие не только в развитии подкорковых структур полушарий, но и участвуют в формировании нейронных популяций коры. В это же время продолжают активные процессы нейрогенеза в структурах других отделов головного и спинного мозга.

Таким образом, современные исследования процессов раннего нейрогенеза в ЦНС животных и человека позволили сделать ряд заключений, существенно дополняющих прежние представления о развитии мозга:

– в период эмбрионального развития популяция нейронов формируется из разных источников: в первый период эмбрионального развития – из НСК нейрогенного эпителия за счет вертикальной миграции в стенке мозга, а ближе к рождению – из их более поздних потомков – клеток так называемой радиальной глии. Клетки радиальной глии могут продуцировать не только клетки – предшественники нейронов, но и напрямую постмитотические нейроны, составляющие в дальнейшем большую часть нейронной популяции в ряде отде-

лов мозга (в частности, при формировании коры головного мозга и мозжечка);

– найден целый ряд иммуногистохимических маркеров, которые позволяют более или менее надежно идентифицировать НСК и их потомков. Среди них следует отметить: ядерный антиген нервных клеток (нейрогенин) – NeuN; ядерный маркер нейрональной дифференцировки (HuCD), маркер нейробластов – даблкортин (DCX); нейрон-специфическую энлазу –NSE; молекулы адгезии нервных клеток – PSA-NCAM; цитоскелетные белки – нестин, β -тубулин III; транскрипционные факторы – Sox-1, Sox-2, Dlx2, Pax 6, ароматаза В (AgoB) и ряд других [4, 10].

– на пролиферацию и дифференцировку клеток нейрональных предшественников действует большое количество разнообразных ростовых, нейротрофических и транскрипционных факторов;

– большая часть интернейронов мозга (до 40–70%) мигрируют тангентально, беря начало в герминативных зонах (LGE, MGE и CGE), расположенных достаточно далеко в вентральных отделах полушарий. Было показано, что они продуцируют разные субпопуляции нейронов, мигрирующие в разные районы паллиума и субпаллиума [2, 8].

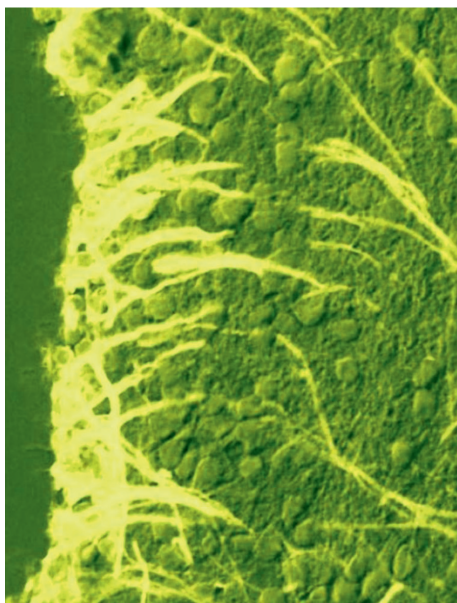
Особенности взрослого нейрогенеза в ЦНС животных и человека

В настоящее время установлено, что в структурах взрослого мозга позвоночных животных и человека в течение длительного времени сохраняются участки нейрогенной активности. У млекопитающих они обнаружены в субвентрикулярной зоне (SVZ) в районе латеральных мозговых желудочков полушарий конечного мозга и в субгранулярной зоне (SGZ) гиппокампа [3, 11]. У низших позвоночных нейрогенные зоны обнаружены в нескольких отделах мозга [4, 12]. Проведенные в этом направлении исследования позволили сделать ряд общих выводов относительно особенностей постнатального нейрогенеза в ЦНС позвоночных животных:

– нейрональные стволовые клетки и их потомки (RG-клетки) находятся в тесном взаимодействии со многими элементами окружающей их структуры мозга, формируя вместе с ними своеобразные – *нейрогенные ниши (neuronal stem niche)* [3, 4, 13];

– клетки нейрогенных ниш выделяют ряд факторов (нейромедиаторы, газообразные субстанции NO, CO, H₂S и др.), которые по принципу ауто- и паракринной секреции влияют на процессы пролиферации, дифференцировки, миграции, рост аксонных и дендритных ветвлений нейрональных предшественников и их потомков [4, 6, 7];

– на основную роль нейрогенных предшественников во взрослом мозге претендуют клетки радиальной глии – RG, популяция которых сохраняется в постнатальном периоде развития длительное время. Специфическим маркером RG является AtoV, однако в ней также выявляется активность ТН-тирозингидроксилазы, NADPH-диафоразы, GABA – гамма-аминомасляной кислоты и NuCD – протеина (традиционно нейрогенных маркеров). Это является уникальным явлением, позволяющим выделить линии глиальной и нейронной дифференцировки при развитии мозга (рисунок);



Имуногистохимическое выявление ароматазы B в клетках радиальной глии в субвентрикулярной области промежуточного мозга взрослого лосося – симы Onchorhynchus masou Br. [4, 13]

– образовавшиеся в нейрогенных нишах нейробласты и глиобласты мигрируют в разные отделы мозга, иногда довольно далеко от мест их образования (в обонятельную луковицу, гиппокамп, стриатум, мозжечок и даже в кору больших полушарий);

– взрослый нейрогенез у млекопитающих со временем ослабевает;

– у низших позвоночных (амфибий, рыб) процесс постнатального нейрогенеза протекает в течение длительного времени и имеет, как много общего с таковым у млекопитающих, так и ряд специфических черт [4, 12].

Нейрогенез во взрослом мозге в условиях травмы мозга

После установления факта взрослого нейрогенеза в ЦНС позвоночных животных

и человека наибольший интерес вызывает вопрос о возможностях пролиферативных ниш мозга в восстановлении структуры мозга после травмы. На модельных объектах (костистых рыбах) нами были проведены исследования реакции мозга на механическую травму (разрез) структур ЦНС (крыша среднего мозга, мозжечок, конечный мозг) с использованием методов иммуногистохимии, конфокальной и электронной микроскопии [4, 7, 13]. В результате этих экспериментов было показано:

– при механическом повреждении разных отделов мозга выявлено усиление пролиферативной активности как в традиционных пролиферативных зонах нейрогенеза (перивентрикулярные области нейрогенных ниш), так и зафиксировано появление новых нейрогенных участков и зон вторичного нейрогенеза;

– процесс репарации начинается с апоптоза поврежденных элементов нервной ткани. Апоптотический ответ наблюдается уже через полчаса после нанесения повреждающего воздействия и продолжается до 21 дня после нанесения травмы. Это подтверждается результатами маркирования TUNEL-положительных фрагментов ДНК в зоне повреждения (зрительного нерва), а также данными электронно-микроскопического анализа;

– прижизненный мониторинг клеток в зоне повреждения с помощью мультитонной конфокальной микроскопии показал, что уже через час после повреждающего воздействия наблюдается физиологический ответ со стороны микроглии (макрофагов мозга), которые мигрируют в область нанесения механической травмы и активно участвуют в элиминации поврежденных клеток с помощью фагоцитоза;

– в отличие от млекопитающих, воспалительная реакция в нервной ткани у низших позвоночных животных (рыб) угасает, не формируя характерный глиальный рубец. Было обнаружено, что NO, секретируемая клетками нейрогенных ниш, оказывает проаптогенное и нейропротективное действие в зоне травмы мозга, регулируя уровень кальция, снижая выработку супероксидов и блокируя токсическое действие глутамата;

– дифференцировка клеток в нейронном направлении, обнаруженная при помощи маркирования клеток антителами против белка NuC/D, происходила в пролиферативных зонах теленцефалона, зрительного тектума, мозжечка и продолговатого мозга форели уже через 2 дня после травмы;

– использование низших позвоночных, как модельных объектов представляется весьма перспективным для изучения реге-

неративных потенциалов нервной ткани, как в норме, так и при патологии [4, 11, 14, 15].

Заключение

Полученные данные послужат основой для дальнейших исследований особенностей пре- и постнатального нейрогенеза в ЦНС животных и человека в норме и при патологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МД-4318.2015.4) и Программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» на 2015–2017 гг. (проект № 15-1-6-116, раздел III).

Список литературы

1. Ten Donkelaar H.J., Lammens M., Hori A. Clinical neuroembryology. Development and developmental disorders of the Human central nervous system. Springer, 2006. 518 p.
2. Обухов Д.К. Современные представления о развитии, структуре и эволюции неокортекса конечного мозга млекопитающих животных и человека // Вопросы морфологии XXI века. 2008. Вып. 1. С. 200–223.
3. Kempermann G. Adult neurogenesis. Neuroscience in the 21 century (ed. D.W. Pfaff). Springer, 2013. P. 161–178.
4. Puschina E.V., Varaksin A.A., Shukla S., Obukhov D.K. The neurochemical organization and adult neurogenesis in the masu salmon brain. N.Y.: Nova Science Publishers Inc., 2017. 267 p.
5. Development of the Nervous system (Sanes D.H., Ren T.A., Harris W.A. eds.) Elsevier Acad. Press., 2006. 372 p.
6. Гомазков О.А. Нейрогенез как адаптивная функция мозга М.: И-т биомедицинской химии, 2014. 85 с.
7. Обухов Д.К., Пушина Е.В., Вараксин А.А., Стукаева М.Е. Современные представления о механизмах регуляции процессов пре- и постэмбрионального нейрогенеза в ЦНС позвоночных животных и человека // Вопросы морфологии XXI века. 2018. Вып. 5. С. 68–81.
8. Noctor et. al. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat. Neurosci. 2004. Vol. 7. P. 136–144.
9. Echevarria D., Vieira C., Gimeno L., Martinez S. Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. Br. Res. Rev. 2003. Vol. 43. P. 179–191.
10. Коржевский Д.Э. Петрова Е.С., Кирик О.В., Безлин Г.В., Сухорукова Е.Г. Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т. 5. № 3. С. 57–63.
11. Ярыгин К.Н., Ярыгин В.Н. Нейрогенез в центральной нервной системе и перспективы регенеративной неврологии // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2012. Т. 112. № 1. С. 4–13.
12. Grandel H., Brand M. Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. Dev. Genes Evol. 2013. Vol. 223. P. 131–147.
13. Обухов Д.К., Пушина Е.В., Вараксин А.А. Структура пролиферативных зон в ЦНС взрослых позвоночных животных // Вопросы морфологии XXI века. 2015. Вып. 4. С. 43–51.
14. Zupanc G.K.H., Sîrbulescu R.F. Teleost Fish as a Model System to Study Successful Regeneration of the Central Nervous System. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2013. Vol. 367. P. 193–233.
15. Pushchina E.V., Obukhov D.K. Is the brain of cherru salmon a new model for investigation of postembryonic neurogenesis? Engineering. 2012. Supplement P. 76–79.