

*Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик и Е. Г. Гилерович*

## ПОСТНАТАЛЬНЫЙ НЕЙРОГЕНЕЗ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЕТОК И ТЕРМИНОЛОГИЯ

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии; Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Разработка в конце XX в. концепции нейральных стволовых клеток привела к появлению множества новых терминов, используемых для обозначения клеток, локализованных в пролиферативных зонах головного мозга. При этом возникла проблема соотношения вновь обозначенных клеток с общеизвестными элементами нервной ткани и классическими представлениями об ее формировании. В представленной работе сделана попытка на основании обобщения данных литературы и собственного опыта изучения пролиферативных зон, обозначить участвующие в нейрогенезе клеточные популяции, ориентируясь, в первую очередь, на возможность их морфологической и иммуноцитохимической идентификации *in situ*.

**Ключевые слова:** *головной мозг, нейрогенез, субвентрикулярная пролиферативная зона, иммуноцитохимия*

Вопрос о механизмах развития нервной системы и регенераторных возможностях нервной ткани является ключевым для анализа способности головного мозга к восстановлению функций после тяжелых травм и инсульта, а также при оценке перспективности применения в клинической неврологии новых терапевтических подходов, основанных на использовании молекулярных и клеточных технологий [15, 16, 29].

В конце XX в. было установлено, что обновление клеточных популяций дефинитивной нервной ткани затрагивает не только глиальные элементы, но свойственно и нейронам [17, 20]. Эти и ряд других данных, полученных в исследованиях культуры ткани, привели к формулировке концепции о нейральных стволовых клетках [19]. К сожалению, до настоящего времени многие вопросы, связанные с установлением локализации этих клеток, их морфологических характеристик и цитохимических особенностей, не разрешены и остаются предметом для научной дискуссии. Все это приводит к определенным противоречиям в трактовку и анализ получаемых новых фактов. Поэтому, именно сейчас целесообразно определить, какие клетки ЦНС лежат в основе восстановительных процессов, и какой терминологии следует придерживаться, определяя участвующие в этих процессах клеточные популяции. Тем более, что в современной гистологической номенклатуре [14] эта проблема осталась не затронутой.

Во второй половине XX в. в научной литературе преобладали взгляды на нейрогенез как на процесс, свойственный исключительно эмбриональному и раннему постнатальному периодам онтогенеза. Они были суммированы А. Г. Кнорре в соответствующем разделе его монографии [8]. На основании материалов, изложенных в этой работе, можно составить список форм предшественников, которые, как предполагалось, действительно существуют и участвуют в формировании нервной ткани (*табл. 1*). Часть из этих клеток имеют характерные структурные особенности, в то время как другие клетки на основании только морфологических признаков идентифицировать затруднительно.

В настоящее время определено множество дифференцировочных маркеров (белков, обнаруживаемых на различных стадиях дифференцировки нервных и глиальных клеток), которые позволяют выявить различные популяции дифференцирующихся клеток, имеющих сходные морфологические признаки. Часть из этих маркеров помогают идентифицировать дифференцирующиеся нейроны и нейробласты [10, 12, 13]. В то же время, стадия пронеуробласта (сейчас чаще используется другой термин — «нейропрогениторная клетка» [16]), как выяснилось, не обладает не только отчетливыми морфологическими признаками, но и уникальным спектром цитохимических маркеров, а существование единого полипо-

### Сведения об авторах:

*Коржевский Дмитрий Эдуардович* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), *Кирик Ольга Викторовна*, *Гилерович Елена Георгиевна*, лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

Таблица 1

## Клеточные типы, принимающие участие в нейрогенезе (по А. Г. Кнорре [8])

Медуллобласт	Клетка нервной трубки (нейроэпителлия), имеет равные потенции развития как в нейрональном, так и в нейроглиальном направлении
Спонгибласт	Предшественник нейроглиоцитов (макроглии)
Пронейробласт	Предшественник нервной клетки, лишенный характерных морфологических признаков (отростков, нейрофибрилл), способен к митотическому делению и миграции
Нейробласт	Имеет нейрит и нейрофибриллы, не делится
Молодой нейрон	Дифференцирующийся нейрон, не делится

тентного предшественника макроглиоцитов (спонгиобласта) вызывает сомнения.

Несмотря на то, что популяция нейропрогениторных клеток не может быть охарактеризована в целом, различные клетки, которые занимают промежуточное положение между нейральными стволовыми клетками и нейробластами, могут быть определены по присутствию отдельных цитохимических маркеров. Однако являются ли определенные таким образом клетки длительно существующими популяциями или переходными формами, остается непонятным. Все это приводит к большому разнообразию в используемой терминологии, характеризующей клетки, принимающие участие в нейрогенезе, как в пренатальный период развития, так и в постнатальный период онтогенеза.

В настоящее время постнатальный нейрогенез наиболее интенсивно изучается в пределах субвентрикулярной пролиферативной зоны, которая располагается в области латеральных стенок боковых желудочков конечного мозга [5]. Структурная организация субвентрикулярной зоны (СВЗ) уникальна для головного мозга, поскольку она сохраняет отдельные черты эмбриональной пролиферативной вентрикулярной зоны и выступает в роли определенной нейрогенной ниши [18, 22, 24] с особым микроокружением, которое способствует длительной персистенции стволовых клеток, пролиферации и направленной миграции созревающих (дифференцирующихся) постмитотических нервных и глиальных элементов. Поэтому клетки СВЗ сохраняют сходство с клетками, участвующими в эмбриональном нейрогенезе.

Несмотря на обилие научной литературы, посвященной организации СВЗ и экспрессии различных маркеров ее клетками, еще нет ясности в отношении клеточного состава СВЗ и роли различных клеточных типов в процессе постнатального нейрогенеза. Отчасти это обусловлено тем, что различные группы исследователей либо вводят новые термины для обозначения известных клеточных типов, либо используют несовместимые характеристики (морфологические,

биохимические, культуральные) для определения присутствующих *in situ* клеточных популяций СВЗ (табл. 2).

В работах, проводимых в лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, а ранее в отделе морфологии Института экспериментальной медицины [1, 2, 9, 12, 13], значительное внимание всегда уделялось вопросам нейрогенеза и дифференцировки нервных клеток. В последние годы был проведен цикл работ [3–6], посвященных изучению структурной и цитохимической организации СВЗ у крысы — традиционного объекта исследования в экспериментальной нейробиологии. В ходе этих исследований были получены новые данные, часть из которых позволяют конкретизировать представления о реальном клеточном составе СВЗ и об информативности применения различных дифференцировочных маркеров с целью определения стадий формирования нервной клетки (см. табл. 2).

Наиболее значимыми из дифференцировочных маркеров оказались белки, ассоциированные с цитоскелетом. Эти белки хорошо сохраняются при использовании различных способов фиксации материала и позволяют выявлять клетки, имеющие сложную форму. К таким маркерам относятся: виментин (маркер эпендимы интактного мозга [6, 11]) и нестин (маркер преимущественно нейральных стволовых клеток [9]). В интактном головном мозгу крысы нестин-иммунопозитивными являются кластеры клеток с темным (за счет гетерохроматина) ядром и небольшим ободком цитоплазмы, расположенные в СВЗ боковых желудочков. После ишемического воздействия на мозг нестин-иммунопозитивными становятся небольшие группы клеток в эпендиме, эндотелиоциты кровеносных сосудов, а также астроциты СВЗ и стриатума [4].

Даблкортин (ДСХ) — белок, ассоциированный с микротрубочками [10] — принимает активное участие в реорганизации цитоскелета и процессе транслокации ядра (одного из ключевых событий, происходящих при миграции нейробласта), обнаруживается не только в постмитотических

Таблица 2

**Клетки, относимые к структурным элементам субвентрикулярной зоны (СВЗ) головного мозга млекопитающих**

Авторское название клеток	Характеристика	Источник	Предлагаемый эквивалент
А-клетки	Мигрирующие цепочками из СВЗ темные клетки, (PSA-NCAM+, бета-тубулин+, нестин+), могут делиться. Имеют небольшие размеры, веретеновидную форму, вытянуты вдоль вентрикулярной поверхности. Ядро этих клеток круглое или овальное с кластерами гетерохроматина, окружено тонким ободком цитоплазмы	[21, 30, 31]	Нейробласты
В-клетки	Специализированные астроциты (опора для А-клеток), формируют трубчатые структуры, отделяющие цепочки мигрирующих клеток от окружающей ткани, могут делиться (GFAP+, виментин+, нестин+)	[21, 30, 31]	Астроциты СВЗ и астроцитоподобные нейропрогениторные клетки
С-клетки или временно пролиферирующие клетки	Самые крупные клетки в СВЗ, имеют шаровидную форму. Собраны в кластеры и контактируют с цепочками мигрирующих клеток, часто делятся. Предшественники А-клеток (нестин+)	[21, 25, 30, 31]	Нейропрогениторные клетки
Нейральные стволовые клетки	Астроциты СВЗ или субпопуляция астроцитов	[25]	Нейральные стволовые и прогениторные клетки
Е-клетки	Клетки, находящиеся в составе эпендимы (GFAP+, виментин+, нестин+)	[25, 30, 31]	Эпендимоциты
Эпендимные клетки	Большая часть клеток, составляющих эпендиму. Имеют реснички на вентрикулярной поверхности, в цитоплазме содержат множество митохондрий, липидные включения	[24, 29, 30]	Эпендимоциты
Эпендимо подобные клетки	Группы клеток СВЗ, образующие розеткоподобные структуры	[31]	Внеэпендимные эпендимоциты
oRG-клетки	Клетки-предшественники, которые похожи на радиальные глиоциты. Имеют длинный базальный отросток. Содержат маркеры Рах6, фосфовиментин, Ki-67	[32]	Веретеновидные (радиальные) глиоциты, возможно — особый тип нейропрогениторных клеток
Постмитотические нейроны	Генерируются и накапливаются непосредственно в вентрикулярной зоне, имеют отростчатую форму	[32]	Нейробласты, нейроны
Радиальная глия	Радиально ориентированные веретеновидные клетки, сохраняющие контакт с церебро-спинальной жидкостью. Нейральные стволовые клетки (НСК) и предшественник астроцитов	[27, 28, 32]	Веретеновидные (радиальные) глиоциты и глиоподобные НСК, нейральные стволовые и прогениторные клетки
Апикальные дочерние клетки	Образуются в результате асимметричного деления клеток радиальной глии, обладают значительной пролиферативной активностью	[32]	НСК и нейропрогениторные клетки
Мультиполярные клетки СВЗ	Отростчатые клетки; содержат транскрипционный фактор Tbr2	[32]	Астроцитоподобные нейропрогениторные клетки
Субэпендимные микроглиоциты	Веретеновидные микроглиоциты с короткими тонкими отростками, проникающими в пласт эпендимных клеток (содержат Iba-1)	[7]	Микроглиоциты

нейробластах, но и в клетках, которые являются предшественниками нейронов и могут делиться [10], т. е. в нейропрогениторных клетках.

Другой маркер стволовых клеток Msi-1 [3, 23] в интактном мозгу экспрессируется в ядрах клеток эпендимы и большинства клеток СВЗ боковых желудочков и рострального миграцион-

ного потока (пути). Положительная реакция на белок Msi-1 наблюдается в отростчатых клетках стриатума, в клетках, обнаруживаемых среди интерфасцикулярных олигодендроцитов, и в периваскулярных клеточных элементах [3].

В интактном мозгу нет клеток, в которых нестин и Msi-1 выявляются одновременно, однако

после постишемической активации нейрогенеза – такие клетки появляются [4]. Поэтому, с нашей точки зрения, коэкспрессия таких маркеров, как нестин и Msi-1, может помочь выявить смешанную группу нейральных стволовых и прогениторных клеток головного мозга. Ими могут быть и эпендимоциты, и кластеры клеток СВЗ, и отдельные клетки, расположенные вдоль кровеносных сосудов, и часть астроцитов стриатума.

Следует заметить, что собирательный термин «нейральные стволовые и прогениторные клетки» (НСПК), который широко используется при характеристике пролиферативных зон, на самом деле определяет не индивидуальный клеточный тип, а различные клетки. Он необходим для правильного обозначения гетерогенной популяции клеток, которые могут пролиферировать и дифференцироваться в нейроны, независимо от их структурных характеристик и расположения.

Анализ литературных источников и собственный опыт исследования пролиферативных зон показывают, что часть действительно существующих и гипотетических популяций клеток, относимых разными исследователями к СВЗ, не могут быть четко разграничены даже при использовании современных методов иммуноцитохимии и электронной микроскопии. В то же время, не вызывает сомнений и то, что большинство клеток СВЗ могут быть отнесены к известным, морфологически и цитохимически идентифицируемым клеточным популяциям (см. табл. 2). Это противоречие может быть устранено, если при описании процессов, происходящих в ходе формирования новых клеток нервной ткани, руководствоваться, в первую очередь, их морфологическими характеристиками и цитоспецифическими особенностями клеток, которые позволяют их однозначно идентифицировать. При использовании такого подхода в составе СВЗ можно определить 8 клеточных типов. Непосредственно под эпендимой находятся микроглиоциты (содержат Iba-1) и отдельные внеэпендимные эпендимоциты (содержат виментин). Далее располагаются астроциты СВЗ (содержат GFAP, а часть из них — виментин), веретеновидные (радиальные) глиоциты (содержат глиальный кислый фибриллярный белок — GFAP), НСПК, образующие кластеры (содержат нестин, иногда — Msi-1). Глубже в СВЗ среди астроцитов можно обнаружить нейропрогениторные клетки и нейробласты (содержат DCX), а также единичные нейроны (их ядро содержит белок NeuN). Все многообразие определяемых в настоящее время дефинитивных, прогениторных и дифференцирующихся клеток СВЗ соответствует этим

достаточно четко идентифицируемым клеточным типам.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гилерович Е. Г. Гистогенез тканевых нейротрансплантатов человека: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 2000.
2. Гилерович Е. Г., Федорова Е. А. и Отеллин В. А. Развитие трансплантатов спинного мозга эмбрионов человека в спинном мозге взрослых крыс. Морфология, 1996, т. 110, вып. 5, с. 43–46.
3. Кирик О. В., Алексеева О. С. и Коржевский Д. Э. Экспрессия маркера нейральных стволовых клеток Msi-1 в конечном мозгу крысы. Морфология, 2011, т. 139, вып. 2, с. 77–79.
4. Кирик О. В., Власов Т. Д. и Коржевский Д. Э. Маркеры нейральных стволовых клеток нестин и Musashi-1 в клетках конечного мозга крысы после транзиторной фокальной ишемии. Морфология, 2012, т. 142, вып. 4, с. 19–24.
5. Кирик О. В., Григорьев И. П., Сухорукова Е. Г. и др. Использование методов иммуноцитохимии для определения границы между субвентрикулярной зоной конечного мозга и стриатумом. Морфология, 2012, т. 141, вып. 1, с. 81–84.
6. Кирик О. В. и Коржевский Д. Э. Виментин в клетках эпендимы и субвентрикулярной пролиферативной зоны конечного мозга крысы. Клеточные технологии в биологии и медицине, 2012, № 4, с. 210–214.
7. Кирик О. В., Сухорукова Е. Г. и Коржевский Д. Э. Кальций-связывающий белок Iba-1/AIF-1 в клетках головного мозга крысы. Морфология, 2010, т. 137, вып. 2, с. 5–8.
8. Кнорре А. Г. Эмбриональный гистогенез. Л., Медицина, 1971.
9. Коржевский Д. Э. Нейрогенез и нейральные стволовые клетки. Мед. Акад. Журн., 2010, т. 10, № 4, с. 175–182.
10. Коржевский Д. Э., Карпенко М. Н. и Кирик О. В. Белки, ассоциированные с микротрубочками, как показатели дифференцировки и функционального состояния нервных клеток. Морфология, 2011, т. 139, вып. 1, с. 13–21.
11. Коржевский Д. Э., Ленцман М. В., Кирик О. В. и Отеллин В. А. Виментин-иммунопозитивные клетки конечного мозга крысы после экспериментального ишемического инсульта. Морфология, 2007, т. 132, вып. 5, с. 23–27.
12. Коржевский Д. Э., Петрова Е. С., Кирик О. В. и др. Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2010, т. 5, вып. 3, с. 57–63.
13. Коржевский Д. Э., Петрова Е. С., Кирик О. В. и Отеллин В. А. Оценка дифференцировки нейронов в эмбриогенезе крысы с использованием иммуногистохимического выявления даблкортина. Морфология, 2008, т. 133, вып. 4, с. 7–10.
14. Terminologia Histologica. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов. Под ред. В. В. Банина и В. Л. Быкова. М., ГЭОТАР-Медиа, 2009.
15. Ярыгин В. Н., Банин В. В., Ярыгин К. Н. и Брюховецкий А. С. Регенерация спинного мозга крыс после торакальной сегментэктомии: рост и восстановление нервных проводников. Морфология, 2006, т. 129, вып. 1, с. 30–38.
16. Ярыгин К. Н. и Ярыгин В. Н. Нейрогенез в центральной нервной системе и перспективы регенеративной неврологии. Журн. неврол. и психиатр., 2012, № 1, с. 1–13.

17. Altman J. and Bayer S. A. Migration and distribution of two population of hippocampal granule cell precursor during the prenatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.*, 1990, v. 301, № 3, p. 365–381.
18. Decimo I., Bifari F., Krampera M. and Fumagalli G. Neural stem cell niches in health and diseases. *Curr. Pharm. Des.*, 2012, v. 18, p. 1755–1783.
19. Gage F. H. Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, v. 287, № 5057, p. 1433–1438.
20. Gage F. H., Ray J. and Fisher L. J. Isolation, characterization, and use of stem cells from CNS. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1995, v. 18, p. 159–192.
21. Garcia-Verdugo J. M., Doetsch F., Wichterle H. et al. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *Inc. J. Neurobiol.*, 1998, v. 36, p. 234–248.
22. Garzon-Muvdi T. and Quinones-Hinojosa A. Neural stem cell niches and homing: recruitment and integration into functional tissue. *ILAR J.*, 2009, v. 51, № 1, p. 3–23.
23. Kaneko Y., Sakakibara S., Imai T. et al. Musashi 1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev. Neurosci.*, 2000, v. 22, № 1–2, p. 139–153.
24. Lim D. A., Huang Y. C. and Alvarez-Buylla A. The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, 2007, v. 18, № 1, p. 81–92.
25. Luo J., Daniels S. B., Lenington J. B. et al. The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell*, 2006, v. 5, p. 139–152.
26. Malatesta P., Hartfuss E. and Gotz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development*, 2000, v. 127, № 24, p. 5253–5263.
27. Nadarajah B. Radial glia and somal translocation of radial neurons in the developing cerebral cortex. *Glia*, 2003, v. 43, № 1, p. 33–36.
28. Noctor S. C., Flint A. C., Weissman T. A. et al. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, v. 409, № 6821, p. 714–720.
29. Pavlichenko N., Sokolova I., Vijde S. et al. Mesenchymal stem cells transplantation could be beneficial for treatment of experimental ischemic stroke in rats. *Brain Res.*, 2008, v. 1233, p. 203–213.
30. Rodriguez-Perez L. M., Perez-Martin M., Jimenez A. J. and Fernandez-Llebrez P. Immunocytochemical characterization of the wall of the bovine lateral ventricle. *Cell Tiss. Res.*, 2003, v. 314, p. 325–335.
31. Sawamoto K., Hiroto Y., Alfaro-Cervello C. et al. Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain. *J. Comp. Neurol.*, 2011, v. 519, p. 690–713.
32. Tabata H., Yoshinaga S. and Nakajima K. Cytoarchitecture of mouse and human subventricular zone in developing cerebral neocortex. *Exp Brain Res.*, 2012, v. 216, p. 161–168.

Поступила в редакцию 24.05.2013

### POSTNATAL NEUROGENESIS: CELLS IDENTIFICATION AND NOMENCLATURE

*D. E. Korzhevskiy, O. V. Kirik and Ye. G. Gilerovich*

Elaboration of the concept of neural stem cells at the end of the twentieth century resulted in the appearance of the multitude of new terms used for the designation of cells localized in the proliferative zones of the brain. Concurrently, a problem arose concerning the correlation of newly named cells, generally known elements of the nervous tissue, and classic views on its development. In the present study, an attempt is made on the basis of the literature data review and authors' own experience in the exploration of proliferative zones, to classify cell populations involved in the neurogenesis considering, primarily, the possibilities of their morphological and immunocytochemical in situ identification.

**Key words:** *brain, neurogenesis, subventricular proliferative zone*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg