

УДК 612.646:612.82:577.95

Экспрессия нейротрофических факторов в эмбриональном мозге человека 5–9 недель гестации

Цимбалюк В.И., Васильева И.Г., Чопик Н.Г., Галанта Е.С.,
Цюбко О.И., Олексенко Н.П., Вашуленко Т.Н.

Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев, Украина

В определении конечного фенотипа дифференцирующихся нейронов, регуляции их пролиферации, а также поддержании выживаемости как дифференцированных, так и недифференцированных нервных клеток основную роль играет химическое окружение. Однако сценарий экспрессии сигнальных молекул на разных стадиях эмбриогенеза нервной ткани изучен далеко не полностью. Целью нашей работы явилось изучение экспрессии BDNF, NGF, GDNF, NT-3, NT-4/5 и CNTF в эмбриональном мозге человека 5–9 нед гестации методом гибридизации ДНК–РНК на нитроцеллюлозном фильтре.

Исследования показали, что на данном этапе эмбриогенеза экспрессируется лишь три из выбранных нами фактора: BDNF, NT-3, NT-4/5 в количестве, детектируемом с помощью данного метода. Экспрессия остальных трех факторов нервной ткани либо отсутствует в данный период, либо ее уровень находится за пределами чувствительности ДНК–РНК гибридизации.

Ключевые слова: фактор роста нервов, нейротрофический фактор мозгового происхождения, нейротрофин-3, нейротрофин-4/5, цилиарный нейротрофический фактор, глиальный нейротрофический фактор, эмбриональный мозг человека.

Вступление. В настоящее время к нейротрофическим факторам относят более 20 ростовых агентов, составляющих различные семейства (нейротрофины, нейростатины, нейрокины, семейства FGF и TGF β и т.д.), в которые входят структурно-родственные белки. Некоторые из них обладают плеiotропной активностью и реализуют свой потенциал не только в нервной системе, но для большинства этих факторов мишенью являются нервные клетки.

Наиболее интенсивно изучаемыми трофическими факторами на сегодняшний день являются фактор роста нервов–nerve growth factor (NGF), нейротрофический фактор мозгового происхождения–brain derived neurotrophic factor (BDNF), нейротрофин-3–neurotrophin three (NT-3), нейротрофин-4/5–neurotrophin four/five (NT-4/5) (семейство нейротрофинов), цилиарный нейротрофический фактор–ciliary neurotrophic factor (CNTF) (семейство нейрокинов) и глиальный нейротрофический фактор–glia derived neurotrophic factor (GDNF) (семейство TGF β). Многочисленными исследованиями на животных была продемонстрирована их роль в эмбриогенезе и постнатальном периоде как факторов дифференцировки, созревания и поддержания выживаемости клеток периферической и центральной нервной системы [3, 7, 8, 10]. Однако, несмотря на то что за пятидесятилетний

период интенсивного изучения вышеназванных гормоноподобных ростовых агентов собран обширный фактический материал, открытыми остаются вопросы об их экспрессии, механизмах действия, объектах приложения и функциональном взаимодействии в эмбриогенезе и филогенезе человека.

Изучение специальной литературы показало, что наибольший массив экспериментальных данных об экспрессии нейротрофических факторов и выполняемых ими функциях отражает события второй половины эмбрионального развития позвоночных, когда устанавливается иннервация тканей-мишеней и, наряду с бластными формами нервных клеток, уже существуют молодые нейроны и клетки глии [1]. Так, синтез мРНК NT-4/5 отмечался в большинстве тканей на 17–21-е сутки развития эмбрионов крыс [19], а мРНК BDNF обнаруживалась в субпопуляции клеток кохлеовестибулярного ганглия в период E11.5 у мышей [6].

Информация об экспрессии изучаемых нами ростовых агентов на ранних этапах нейроонтогенеза достаточно скудна. Известно, что мРНК BDNF и NT-3 в развивающейся первичной полоске детектируется с первого дня эмбриогенеза птиц, а небольшие количества мРНК BDNF, NT-3 и NGF в ганглионарной пластинке, нервной трубке, сомитах и ното хорде – со 2-го дня [18]. Экспрессия GDNF в нейроэкто-

дерме развивающегося мышиноного эмбриона наблюдалась в период 7,5–10,5 сут после оплодотворения [6]. Уникальной является информация об экспрессии рецепторов нейротрофинов в развивающемся кохлеовестибулярном ганглии эмбрионального внутреннего уха человека 5–24 нед гестации, что указывает на зависимость клеток ганглия от этих факторов на данном этапе эмбриогенеза. Trk-B и Trk-C (рецепторы BDNF и NT-3 соответственно) обнаруживали иммунореактивность, начиная с 5-й недели, причем пик экспрессии приходился на 7–12-ю неделю. Trk-A (рецептор NGF) демонстрировал слабую иммунореактивность лишь на 5–7-й неделе [16].

Целью работы явилось количественное определение экспрессии NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, GDNF и CNTF в целомом эмбриональном мозге человека 5–9 нед гестации.

Материалы и методы. В эксперименте использовали мозг 18 пятинедельных, 16 шестинедельных, 16 семинедельных, 12 восьминедельных и 12 девятинедельных эмбрионов человека (абортный материал).

мРНК была получена методом фенольной экстракции согласно Маниатис Т. [13]

Уровень экспрессии факторов определяли методом гибридизации ДНК–РНК на нитроцеллюлозных фильтрах, согласно Маниатис Т., Франциско Г. [4,13] с некоторыми модификациями.

В качестве зондов использовали следующие синтетические олигонуклеотиды (Amersham Pharmacia Biotech):

1. 5'-cgcttgacaaaggtgtgagtcggtgacaaatgatgctc-3' NGF.
2. 5'-gtttgcttcttcatggggcagccttcatgcaaccaaag-3' BDNF.
3. 5'-gctgtgtggagcagcaccaggcagacacccagacatccc-3' GDNF.
4. 5'-ggaattgagcagctcttctggcaactccttgatccatg-3' NT-3.
5. 5'-tcgccaacacctccacctcgcccccagcaagtcacag-3' NT-4/5.

6. 5'-gagcagtcaggcttgaacgaatcttcttctgtagccagat-3' CNTF.

Мечение зондов [γ - 32 P]АТФ (3000Ci/mM) (Amersham Pharmacia Biotech) осуществляли методом концевой ферментативного мечения согласно Маниатис Т. [13].

Очистку зондов проводили в полиакриламидном геле в присутствии 7М мочевины.

Прегибридизацию фильтров выполняли в присутствии 50% формамида / 5х SSPE (1хSSPE=15мМ цитрат натрия / 0,15М NaCl / 10мМ NaH_2PO_4 / 1мМ ЕКТА) / 5х реактива Денхардта (1х реактив Денхардта= 0,02% BSA / 0,02%Ficoll / 0,02% поливинилпиролон) / 0,1% SKS при 42°C в течение 1ч. Гибридизацию с меченым 32 P-зондом (50 000-100 000 рас/мин) проводили в течение 24 ч при температуре 42°C. Фильтры отмывали однократно в 1хSSC с 0,1%SKS при комнатной температуре и дважды в 0,2хSSC с 0,1%SKS при температуре 42°C. Радиоактивность фильтра определяли на сцинтилляционном счетчике "Бета-1" (Украина).

Результаты и их обсуждение. Полученные данные показали, что в изучаемый период нейроонтогенеза человека в эмбриональном головном мозге экспрессируются лишь три из исследованных факторов: BDNF, NT-3, NT-4/5, причем BDNF демонстрировал более высокий уровень экспрессии, чем NT-3 и NT-4/5 (таблица).

Кроме того, к 7-й неделе эмбриогенеза наблюдали тенденцию к увеличению синтеза мРНК данного нейротрофина. Этот результат коррелирует с описанными в литературе наблюдениями об активации экспрессии рецептора данного нейротрофина [16]. Аналогичную динамику определяли также при изучении экспрессии нейротрофических факторов в нейроонтогенезе птиц. Так, пик синтеза BDNF приходился на период Е4,5 [7], когда у птиц, согласно данным литературы, образуются клетки предшественники нейронов и начинается их дифференцировка [5]. Однако, согласно другим

Таблица. Экспрессия нейротрофических факторов в эмбриональном мозге человека 5–9 нед гестации

Срок гестации	фмоль мРНК BDNF/мг мРНК	фмоль мРНК NGF/мг мРНК	фмоль мРНК NT-3/мг мРНК	фмоль мРНК NT-4/5/мг мРНК	фмоль мРНК GDNF/мг мРНК	фмоль мРНК CNTF/мг мРНК
5 нед n=6	2,974±0,544	-	0,581±0,141	0,884±0,202	-	-
6 нед n=6	2,123±0,649	-	-	0,178±0,094	-	-
7 нед n=8	3,191±0,749	-	-	0,670±0,038	-	-
8 нед n=8	3,237±0,743	-	0,884±0,306	0,170±0,028	-	-
9 нед n=10	3,818±0,212	-	-	0,453±0,082	-	-

данным [10], полученным на крысах, BDNF имеет низкий уровень экспрессии в незрелых регионах ЦНС и повышается он лишь с их созреванием. А в период пролиферации, миграции и дифференцировки клеток предшественников в мозге крыс преимущественно экспрессируется родственный нейротрофин – NT-3 [10]. Согласно результатам данной работы этот белок не демонстрирует стабильную экспрессию в эмбриональном мозге человека в изучаемый период. Подобные расхождения, возможно, связаны с видовыми особенностями формирования ЦНС. В любом случае присутствие мРНК этих родственных белков в развивающемся мозге обусловлено выполняемыми ими функциями. Так, *in vitro* была показана роль BDNF в дифференцировке клеток предшественников, полученных из эмбрионального стриатума, в сторону мультиполярных, а NT-3 – в сторону биполярных нейронов [8]. Кроме того, на культуре нейронов гиппокампа был продемонстрирован их стимулирующий эффект в образовании синапсов [17].

Ожидаемым результатом для нас явилось обнаружение экспрессии мРНК NT-4/5 в изучаемый период. Данный фактор обеспечивает выживание и формирование нейронального фенотипа дифференцирующихся клеток предшественников, полученных из эмбрионального мозга человека и культивируемых *in vitro* [3], а также имеет значение в формировании маргинальной зоны неокортекса грызунов [2].

Отсутствие экспрессии тканью эмбрионального головного мозга 5–9 нед GDNF, NGF, CNTF может свидетельствовать либо о неостребованности данных факторов на этапе пролиферации, дифференцировки и миграции клеток предшественников нейронов, либо о преимущественном значении в этот период данных ростовых агентов экзогенного происхождения (источником могут быть окружающие ткани), так как их рецепторы детектируются в ЦНС довольно рано [9,12], а делетирование гена приводит к аномалии развития центральной и периферической нервной системы [14].

Таким образом, полученные нами данные подтверждают существование эндогенного синтеза BDNF, NT-3, NT-4/5 развивающимся головным мозгом человека 5–9 нед гестации, что еще раз подчеркивает участие этих факторов в процессе дифференцировки нервной ткани. Данный факт может объяснять тот трофический эффект, который дает эмбриональная нервная ткань при ее трансплантации, что лишь раз подтверждает возможность использования эмбрионального донорского материала в терапевтических целях.

Список литературы

1. *Нейроонтогенез*. – М: Наука, 1985. – 267 с.
2. Brunstrom J.E., Gray-Swain M.R., Osborne P.A., Pearlman A.L. Neuronal heterotopias in the developing cerebral cortex produced by neurotrophin-4 // *Neuron*. –1997.– V.18, №3. – P.505–517.
3. Caldwell M.A., He X., Wilkie N., Pollak S., Marshall G., Wafford K.A., Svendsen C.N. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres // *Nat. Biotechnol.* – 2001.– V.19, №5. – P.475–479.
4. Francisco G. Nobrega, Carol L. Kieckmann, Alexander Tzagoloff. A rapid Method for detecting specific RNA transcripts by hybridization to KNA probes in solution // *Biochem.* –1983. – №131, – P.141–145.
5. Gilardino A., Perroteau I., Lovisolio K., Kistasi C. In vitro identification of dividing neuronal precursors from chick embryonic ciliary ganglion // *Neuroreport*. – 2000. – V.11, №6. – P.1209–1212.
6. Hellmich H.L., Kos L., Cho E.S., Mahon K.A., Zimmer A. Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial mesenchymal interactions // *Mech. Rev.* –1996. – V.54, №1. – P. 95–105.
7. Howard L., Weiner M.K. The pole of growth factors receptors in central nervous system development and neoplasia // *Neurosurgery*. –1995. – V.37, №2. – P.179–193.
8. Lachyankar M.B., Condon P.J., Quesenberry P.J., Litofsky N.S., Recht L.K., Ross A.H. Embryonic precursor cells that express Trk receptors: induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3 and CNTF // *Exp. Neurol.* – 1997. – V. 144, №2. – P. 350–360.
9. MacLennan A.J., Vinson E.N., Marks L., McLaurin K.L., Pfeifer M., Lee N. Immunohistochemical localization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha expression in the rat nervous system // *J. Neurosci.* –1996. – V.16, №2 – P. 621–630.
10. Maisonnier P.C., Bellusio L., Friedman B., Alderson R.F., Wiegand S.J., Furth M.E., Lindsay R.M., Yancopoulos G.K. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system; parallel as well as reciprocal patterns of expression // *Neuron*. – 1990. – V.5, №4. – P.501–509.
11. Mariano B. Neurotrophic factors and their receptors // *Curr. Opin. in Cell Biol.* – 1995. – №7.–P. 148–155.
12. Mikaelis A., Livet J., Westphal H., Le Lapeyriere K., Errfors P. A dynamic regulation of GDNF-family receptors correlates with a specific trophic dependency of cranial motor neuron subpopulations during development // *Europ. J. Neurosci.* –2000.– V.12 , №2. – P.446–456.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual // Cold Spring Harbor Laboratory Press-2nd ed. – 1989. – 485 p.
14. Sanchez M.P., Silos-Santiago I., Frisen J., He B., Lira S.A., Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF // *Nature*. – 1996. – V. 382, № 6586. – P.70–73.
15. Schecterson L.C., Bothwell M. Neurotrophin and neurotrophin receptor mRNA expression in developing inner ear // *Hear. Res.* – 1994.– V.73, №1. – P. 92–100.

16. Vega J.A., San Jose I., Cabo R., Rodriguez S., Represa J. Trks and p75 genes are differentially expressed in the inner ear of human embryos. What may Trks and p75 null mutant mice suggest on human development // *Neurosci. Lett.* – 1999. – V. 272, №2. – P. 103–106.
17. Vicario-Abejon C., Collin C., McKay R.K., Segal M. Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons // *J. Neurosci.* – 1998. – V.18, №18. – P. 7256–7271.
18. Yao L., Zhang K., Bernd P. The onset of neurotrophin and trk mRNA expression in early embryonic tissues of the quail // *Dev. Biol.* – 1994. – V. 165, №2. – P. 727–730.
19. Zhang S.H., Zhou X.F., Keng Y.S., Rush R.A. Measurement of neurotrophin 4/5 in rat tissues by a sensitive immunoassay. // *J. Neurosci. Methods.* – 1999. – V.89, №1. – P. 69–74.

Експресія нейротрофічних факторів
у ембріональному мозку людини
5–9 тижнів гестації

Цимбалюк В.И., Васильева И.Г., Чопик Н.Г., Галанта Е.С.,
Цюбко О.И., Олексенко Н.П., Вашуленко Т.Н.

У визначенні кінцевого фенотипу нейронів, що диференціюються, регуляції їх проліферації, а також підтримці виживання як диференційованих, так і недиференційованих нервових клітин головну роль відіграє хімічне оточення. Проте сценарій експресії сигнальних молекул на різних стадіях ембріогенезу нервової ткани-

ни вивчений ще далеко не повністю. Метою нашої роботи стало вивчення експресії BDNF, NGF, GDNF, NT-3, NT-4/5 та CNTF у ембріональному мозку людини 5–9 тиж гестації методом гібридизації ДНК–РНК на нітроцелюлозному фільтрі.

Дослідження показали, що на цьому етапі ембріогенезу експресуються лише три з обраних нами факторів: BDNF, NT-3 та NT-4/5 у кількості, що може бути визначена цим методом. Експресія інших факторів нервової тканиною або відсутня у цей період або її рівень знаходиться за межами чутливості ДНК–РНК гібридизації.

Neurotrophins expression in human brain from
embryonic weeks 5–9

Tsybaliuk V.I., Vasilyeva I.G., Galanta E.S., Chopik N.G.,
Tsyubko O.I., Alexenko N.P., Vaschulenko T.N.

The chemical surrounding play a crucial role in determination of phenotyping differentiation during neurogenesis and promotion of survival as differentiated so as undifferentiated neural cells. But the scenario of signal molecules expression in early embryonic stage is poorly understood. Therefore we examined expression of neurotrophic factors BDNF, NGF, GDNF, NT-3, NT-4/5 and CNTF in human brain from embryonic weeks 5–9 by KNA-RNA hybridization on nitrocellulose filter.

These study revealed that only BDNF, NT-3 and NT4/5 were expressed in detectable rate in these period. Other factors demonstrated no expression or its mRNK rate was out of sensitiveness of these method.

Комментарий

к статье Цимбалюка В.И., Васильевой И.Г., Чопик Н.Г., Галанты Е.С., Цюбко О.И., Олексенко Н.П., Вашуленко Т.Н. « Экспрессия нейротрофических факторов в эмбриональном мозге человека 5–9 нед гестации »

Трансплантация эмбриональной нервной ткани остается широко дискутируемым, альтернативным медикаментозному направлением в терапии многих заболеваний ЦНС. Положительное действие, оказываемое имплантируемыми эмбриональными клетками, изучается многими лабораториями мира, однако остается большое количество открытых вопросов относительно механизмов их биологического действия. Одним из объяснений наблюдаемого трофического эффекта может служить синтез имплантатом определенных сигнальных молекул. Представленная группой авторов работа определяет три нейротрофина (BDNF, NT-3, NT-4/5), экспрессируемых эмбриональным мозгом человека в приоритетный для забора донорского материала период. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что девятинедельный эмбриональный мозг имеет преимущество по сравнению с другими сроками гестации. Поэтому данная работа представляет не только научную, но и практическую ценность.

Обращает на себя внимание большое количество экспериментального материала, а также тщательно подобранный обзор литературных данных, так как информация об эндогенном синтезе трофических факторов в эмбриональных тканях человека и животных скудна и носит разрозненный спорадический характер.

А.Т.Носов
доктор мед. наук, профессор,
заведующий лабораторией электронной микроскопии
Института нейрохирургии
им. акад. А.П.Ромоданова АМН Украины