

Распределение рецепторов к лектинам на клетках головного мозга эмбрионов человека различных сроков гестации

И.А. ГНЕДКОВА

НИИ нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова, г. Киев

В настоящее время актуальным вопросом является трансплантация стволовых и специализированных нейральных клеток в целях лечения тяжелых травматических и дегенеративных заболеваний головного мозга. Однако существуют проблемы в этом перспективном методе лечения. Так, морфологические исследования показали, что при трансплантации ЭНТ выживают только 5-10% пересаженных дофаминергических нейронов, а для тех нейронов, что выжили, характерны незрелость дендритов, подавленный рост аксонов, угнетение гликолитической активности, характерной для функционально полноценной нервной ткани; реакции иммунного ответа (В.А. Шабалов и соавт., 2002). Пересаженные нервные клетки могут создавать очаги повышенной клеточной возбудимости, формируя эпилептоидный очаг. В связи с этим актуальным остаётся вопрос получения и “очистки” клеток из эмбриональной нервной ткани, сохранение их пролиферативной активности, дифференцировки по нейрональному типу и снижение их иммуногенности. Поэтому нами были изучены возможности получения и очистки нейральных клеток с помощью лектинов от антигенпрезентирующих клеток – фибробластных, дендритных, моноцитоподобных и мононуклеаров.

В процессе эмбрионального развития на мембранах клеток экспрессируются дифференцировочные рецепторы с терминальными молекулами сахаров. В связи с этим лектины, связывающие определённые углеводные детерминанты, могут быть использованы для изучения закономерностей индивидуального развития. В период раннего эмбриогенеза основная пластинка нервной трубки экспрессирует терминальную молекулу D-галактозы – рецептор к лектину арахиса (PNA). Рецепторы к конкавалину А (ConA) (α -манноза) определяли практически на всех клетках, относящихся к закладке нервной системы на стадии 8, 9, 10-х суток гестации. Закладка эктодермы экспрессировала рецепторы к ConA, WGA, PNA, SBA на стадии 9-10-х суток гестации, а на стадии 11-х суток гестации – рецепторы к лектину сои (SBA) уже не выявлялись (D.B. Wilson, D.P. Wyatt, 1995).

Адрес для корреспонденции: Гнедкова И.А., Институт нейрохирургии имени акад. А.П.Ромоданова АМН Украины, г.Киев; e-mail: alla@neuro.kiev.ua

В связи с этим мы предположили, что с помощью адгезии суспензии клеток головного мозга эмбрионов человека различных сроков гестации (полученных при плановом прерывании беременности) на пластиковых чашках с сорбированными лектинами можно получить популяции однотипных ЭК головного мозга. Предшествующими исследованиями было установлено, что на клетках головного мозга новорожденных животных (крысы, мыши) в большей степени, а взрослых – в меньшей степени экспрессированы рецепторы к лектинам (Н.И. Лисяный, И.А. Гнедкова, 1994).

Мы предположили, что последовательное использование лектинов, связывающих на первом этапе нейраминную кислоту (SNA, WGA), а на втором этапе D-галактозу (PNA), даст возможность выделить популяцию, обогащённую однотипными НСК. Для решения этих задач, прежде всего, необходимо было изучить распределение рецепторов к лектинам на клетках эмбрионального мозга человека и экспериментальных животных различных сроков гестации.

Известно, что каждая стадия эмбриогенеза и дифференцировки клеток сопровождается сборкой на мембранах олигосахаридных цепей (Р. Хьюз, 1985). С помощью лектинов – белков, связывающих определённые углеводные рецепторы, можно изучить закономерности эмбриогенеза и, возможно, использовать лектины для выделения НСК.

Необходимо отметить, что были выявлены общие углеводные детерминанты, характерные для гликопротеидов и гликолипидов, определяющие идентичность функции клеток различного происхождения. Установлено, что для ганглиозидов головного мозга и гликопротеидов, имеющих O-гликозидные связи в составе своих молекул, характерны повторяющиеся последовательности Gal1-3GalNAc (Н.Ф. Аврова, 1982).

Углеводные последовательности гликолипидов и гликопротеидов на клетках эмбрионального мозга можно изучить с помощью лектинов, связывающих эти детерминанты. Сокращения наименований лектинов представлены в соответствии с международной номенклатурой лектинов (Т.С. Vog-Nangen и соавт., 1982) (табл. 1).

Настоящими исследованиями было изучено распределение рецепторов к лектинам на клетках эмбрионального мозга человека различных сроков гестации.

Для этого клетки головного мозга эмбрионов человека, полученные в результате планового прерывания беременности, разбивали шприцем с толстой иглой. Суспензию клеток проводили через нейлоновый фильтр, затем клетки дважды отмывали в среде Игла в течение 5 мин, 1500 об/мин и затем ресуспендировали в среде DMEM в концентрации 2×10^6 в 1 мл. Углеводные рецепторы на мембранах клеток эмбрионального головного мозга изучали с помощью прямого иммунопероксидазного метода с помощью лектинов, меченных пероксидазой хрена производства НПО "ЛектиноТест", г. Львов.

Нами было изучено распределение углеводных рецепторов к лектинам на клетках эмбрионального головного мозга человека 5-, 9-, 10-й недели гестации. Установлено, что на 5-й неделе гестации увеличивается содержание клеток головного мозга, экспрессирующих рецептор к лектину SBA ($32,0 \pm 0,1\%$) и D-галактозосодержащих – с рецептором к лектину PNA и лектину MiL, примерно 25% и 47% соответственно (см. табл.).

Известно, что клетки, содержащие рецепторы с терминальной молекулой D-галактозы, отражают обычно незрелый тип клеток разного гистогенеза, в том числе нейробласты (K. Schwachheimer, 1983). Присоединение молекулы N-ацетилнейраминавой кислоты связывают с дифференцировкой и созреванием клеток. Однако имеются и противоположные факты, свидетельствующие о том, что полисиалированные молекулы (в частности, polyNCAM) чаще встречаются в эмбриональном головном мозге. Полисиалированная нейраминавая кислота (PSA) представляет собой 2–8 остатков сиаловой кислоты и включена в состав эмбриональной формы молекулы NCAM (Rossenber, 1995). PSA NCAM регулирует адгезивные свойства и рост отростков, а также определяет миграцию нейрональных клеток. Рецепторы к лектинам MAL и SNA, содержащих нейраминавую кислоту, были выявлены на пирамидных клетках и синапсах полосатого тела. Экспериментальные исследования показали, что с возрастом у крыс в головном мозге снижается содержание рецепторов MAL⁺ и SNA⁺ (Y.Sato и соавт., 2001).

Полагают, что сиалирование остатков D-галактозы сопряжено с повышением миграционных характеристик клеток. В частности, соотношение D-галактоза – сиаловая кислота на поверхности клеток может служить регулятором

Таблица 1. Наименования лектинов и их сокращения (по Т.С. Bog-Hangen et al., 1982)

Углеводная последовательность	Лектин, связывающий соответствующую углеводную последовательность
Galβ1 – 3GalNAc	лектин арахиса – peanut agglutinin (PNA)
Galβ1 – 3GalNAc	лектин омелы белой – mistletoe lectin (MiL)
NeuAcα2 – 6 Gal	лектин бузины чёрной – sambucus nigra agglutinin (SNA)
NeuAcα2 – 3Gal – β1 – 3GalNAc – R	лектин маакии амурской – maackia amurensis lectin (MAL)
Fucα1 – 2Galβ1 – 3GalNAc	лектин бобовника – laburnum anagyroides agglutinin (LCA)
NeuAc – NAcGlc – R	лектин из проростков пшеницы – wheatgerm agglutinin (WGA)
α – манноза	лектин чечевицы – lentil lectin (LCL)
α – манноза – R	конкавалин А – concavalin A (ConA)
GalNAcα1 – 3GalR	лектин сои – soybean lectin (SBA)
α – GalNAc – αGlcNAc – R	лектин улитки виноградной – helix pomatio agglutinin (HPA)

равновесной системы адгезия–миграция в процессе эмбрионального развития: чем меньше этот коэффициент, тем выше миграционные способности бластомеров (L.J.Regan и соавт., 1986).

Нашими исследованиями было установлено, что на клетках головного мозга эмбрионов человека 5-й недели гестации ацетилнейраминавая кислота – рецептор к лектину SNA – определялся примерно на 18% клеток, а дисахарид N-ацетилнейраминавая кислота- N-ацетилглюкозамин (WGA⁺) – только на 11%.

На 9-й неделе гестации мы отмечали тенденцию к снижению экспрессии D- галактозосодержащих рецепторов (PNA⁺) примерно в 3-4 раза, MiL⁺ – в 1,5–2 раза. При этом незначительно увеличилось содержание нейрональных клеток, экспрессирующих D- маннозные рецепторы – к лектинам LCL и ConA, 16 и 11% соответственно (см. табл.).

На 9-й неделе гестации в эмбриональном головном мозге резко снижалась экспрессия SBA⁺ клеток (с 32% на 5-й неделе гестации до 15%), что в определённой мере может быть связано с интернализацией терминальных остатков сахаров или последовательной активацией специфических гликозилтрансфераз, не только участвующих в биосинтезе олигосахаридных цепей, но и модифицирующих активность определённых сигнальных путей, участвующих в эмбриогенезе (D.G.Moloney и соавт., 2000).

Мы установили, что незначительное количество клеток эмбрионального головного мозга 5-й недели гестации экспрессировали α-фукозу – рецептор к лектину LCA (см. табл. 2). Известно, что фермент фукозилтрансфераза определяет присоединение фукозы к олигосахаридному кору и в то же время фукозилтрансфераза Fringe модифицирует Notch-лиганд Notch-сигнального пути, что отражает участие различных гликозилтрансфераз в сигнальных путях эмбриогенеза (D.G.Moloney и соавт., 2000).

На 5-й неделе гестации нами было выявлено незначительное количество клеток, содержащих маннозу – рецептор к лектинам ConA и LCL

(см. табл. 2). Клетки, выделенные из мозга эмбрионов человека 5-й недели гестации, на своей поверхности экспрессировали рецепторы практически ко всем лектинам (табл. 2). Причём, если на 5-й неделе эмбрионального развития содержание SBA⁺ клеток увеличивалось, то на 9-й неделе оно уменьшилось примерно в 2 раза и составляло (15,0±1,2)%. Эти данные в определённой степени отражают тенденцию к изменению экспрессии рецепторов к лектинам на этапах нейрогенеза, отмеченную и другими авторами (D.B.Wilson, D.P. Wyatt, 1995). Возможно, наблюдаемое распределение рецепторов к лектинам на клетках эмбрионального мозга отражает этапы биосинтеза олигосахаридных цепей мембранных гликоконъюгатов при нейроэмбриогенезе.

На 10-й неделе гестации среди клеток эмбрионального головного мозга нами было выявлено (43,0±3,4)% SNA⁺ клеток, содержащих рецепторы с терминальными молекулами нейраминавой кислоты (табл. 2).

Учитывая высокий уровень сиалирования нервных клеток этого срока гестации нами было проведено разделение клеток эмбрионального мозга 10-й недели гестации на лектине SNA, сорбированном на пластиковой чашке в стерильных условиях в течение 24 ч. После удаления неприлипающей фракции клеток к адгезированной фракции клеток к лектину SNA добавляли полную среду DMEM с 5% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) и 1 мл нейротрофического фактора. Нейротрофический фактор представлял собой супернатант суточной культуры свежесыведенных клеток мозга новорожденной или однодневной крысы, культивированных в концентрации 4×10⁶ клеток в 1 мл в течение 1 сут. Через 2 нед культивирования в стерильных условиях, в атмосфере CO₂ в чашках с сорбированным лектином SNA определяли фибробластоподобные скопления клеток.

Рецепторы к лектинам изучали прямым иммунопероксидазным методом на клетках неприлипающей фракции, обозначенной как SNA⁻ (табл. 2). В результате исследований установили, что после сорбции ЭК головного мозга человека на лектине SNA в популяции неприлипших клеток определялось достоверно больше клеток с галактозосодержащими рецепторами к лектинам PNA и MiL (см. табл. 2). В неприлипающей к

Таблица 2. Распределение рецепторов к лектинам на клетках головного мозга эмбрионов человека различных сроков гестации и на клетках неприлипающей фракции к лектину SNA

Наименование лектина	Количество клеток головного мозга, содержащих рецепторы к лектинам, %			
	Срок гестации			
	5 – я неделя (n = 3)	9 – я неделя (n = 4)	10 – я неделя (n = 2)	10 – я неделя клетки не – прилипающие к лектину SNA
SBA	32,1±2,1**	15,0±1,2**	21,0±2,4	23,0±3,1
LCA	18,0±1,9**	8,0±1,1**	12,0±1,1	19,0±2,4
PNA	25,1±1,2**	6,0±3,4 **	3,0±1,1*	36,0±1,8*
SNA	18,0±1,1**	8,0±4,5**	43,0±3,4*	11,0±3,1*
WGA	11,0±1,5 **	12,0±1,1**	2,0±4,5**	4,0±2,9
LCL	9,0±1,1 **	16,0±2,4**	12,0±4,1	11,0±1,1
ConA	8,0±1,1	11,2±1,1	14,0±3,4	12,0±2,1
HPA	14,0±1,1	11,0±1,1	13,0±1,2	12,0±1,5
MiL	47±1,2**	25,0±8,2**	5,0±1,2**	67,1±3,1*

Примечания: * – достоверность отличий между содержанием ЭК с рецептором к определённому лектину 10-й недели гестации и на клетках 10-й недели гестации, не прилипших к лектину SNA; P<0,01. ** – достоверность отличий между содержанием ЭК с определённым лектином в зависимости от срока гестации; P<0,01.

лектину SNA фракции клеток эмбрионального головного мозга отмечали достоверное снижение количества клеток к лектину SNA до 11%. Это в определённой степени свидетельствует о том, что в течение суток не удаётся на 100% очистить и стандартизовать популяцию нейральных клеток.

Клетки неприлипающей фракции повторно вносили в чашки с сорбированным лектином PNA. Через 2 нед. культивирования в вышеуказанных условиях в чашках определяли однотипные округлые клетки – обозначенные как SNA⁻, PNA⁺.

Необходимо подчеркнуть, что клетки головного мозга взрослого человека практически не экспрессировали рецепторы к лектинам PNA и SBA. В связи с этим было предположено, что лектины PNA и SBA можно использовать для получения и обогащения популяции стволовыми или прогениторными нервными клетками.

С этой целью ЭК мозга человека мы вначале культивировали 24 ч на чашках с лектином SBA. Не прилипшие к пластику клетки определяли как SBA⁻ и повторно сорбировали на чашки с лектином WGA. К адгезированной к лектину SBA фракции клеток добавляли свежую полную среду DMEM с 5% ЭТС. После 2 нед культивирования на чашках с лектином SBA образовывался монослой одно-

типных моноцитоподобных клеток. Супернатант не прилипших к лектину SBA клеток, внесенный через 1 сут повторно в чашку с лектином WGA, через 2 нед. культивирования содержал популяцию однотипных округлых клеток с рецепторами к лектину MiL, экспрессирующих терминальную молекулу D- галактозы и обозначенных как WGA⁻, MiL⁺ клетки.

Таким образом, проведенные исследования дают основания сделать следующие предварительные выводы.

В процессе эмбриогенеза на клетках головного мозга человека экспрессированы углеводные рецепторы к лектинам, которые, с одной стороны, отражают этап эмбриогенеза – сборку олигосахаридного кора мембранных гликоконъюгатов, а с другой – имеют общие углеводные рецепторы с иммунокомпетентными клетками. Полученные данные служат основанием для очистки эмбриональных нервных клеток от антигенпрезентирующих рецепторов к различным лектинам (SBA, LCA, SNA) и др.

С помощью сорбции и истощения клеток эмбрионального головного мозга на лектинах, связывающих терминальные углеводные рецепторы в последовательности, обратной их нормальному синтезу на мембранах клеток можно получить популяции однотипных нейрональных клеток, более пригодных к нейротрансплантации.