

ВВЕДЕНИЕ Регенерация поддерживается механизмами, которые определяются в процессах развития организма. Для выявления ранних этапов формирования мозга человека предложена модель церебральных органоидов. Церебральные органоиды - это трехмерные культуры, состоящие из специфичных для мозга типов клеток, полученных из эмбриональных или плюрипотентных стволовых клеток. Органоиды дают возможность изучения ранних этапов развития мозга и заболеваний центральной нервной системы. Однако моделирование органоидов связано с рядом пока не решенных методических и тканеспецифических задач. Среди них, сложный и дорогостоящий процесс культивирования клеток, и отсутствие в органоидах васкуляризации и некоторых типов клеток, специфичных для мозга. В связи с чем, целью исследования было получение и изучение самоорганизации органоидов, развивающихся в ликворе желудочков мозга взрослой мыши из трансплантированных клеток фетального неокортекса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ Неокортекс эмбрионов мыши Э14.5 линии C57BL/6-Tg(ACSB-EGFP)1Osb/J, охарактеризовали методами ОТ-ПЦР и иммуногистохимии. Затем приготовили суспензию клеток и 1.5 мкл стереотаксически трансплантировали в боковой желудочек мозга взрослых мышей (n = 9) в концентрации 200 тыс. клеток в 1 мкл в растворе Хенкса. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование органоидов проводили через 5, 30 и 90 дней после операции (Рис. 1).

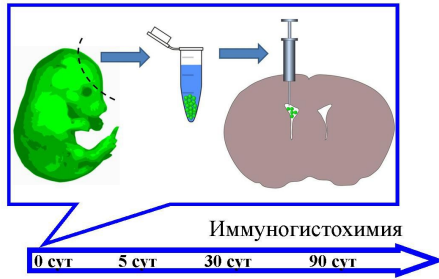


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

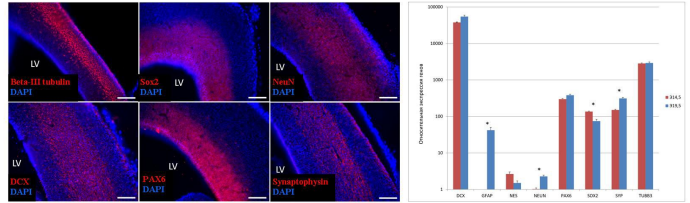


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование неокортекса эмбриона мыши Э14,5 и ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов.

РЕЗУЛЬТАТЫ Неокортекс эмбрионов мышей на стадии Э14,5 представлен нейральными стволовыми/прогениторными клетками, а также незрелыми нейронами. Его клетки экспрессируют нейрональные маркеры TUBB3, DCX, маркеры нейральных предшественников Sox2, Pax6, Nestin, экспрессия маркера зрелых нейронов NeuN крайне низка, а маркер астроцитов GFAP не выявляется (Рис. 2). Морфологическое исследование через 5 сут после операции показало присутствие объемного клеточного агрегата в желудочке мозга, в котором клетки имели положительную реакцию к DCX, что указывает на процессы их миграции. На 30 сутки в центре органоида были выявлены зрелые нейроны положительные к NeuN. По периферии была определена маргинальная зона без NeuN⁺ нейронов по краю которой выявлялся слой астроцитов (GFAP⁺), напоминающий пограничную глиальную мембрану (glia limitans) (Рис. 2). Помимо плотного пограничного слоя астроциты были равномерно распределены по органоиду. На 90 сутки органоид был хорошо структурирован и развит, его центральную область занимали NeuN⁺ нейроны, которые располагались менее плотно в центре и более плотно на периферии центральной области. DCX⁺ нейронов в органоиде не было выявлено. Крайне важным наблюдением является наличие положительной иммуногистохимической реакции к синаптофизину во всем органоиде, причем без выраженной границы между реципиентом и трансплантатом. Распределение астроцитов (GFAP⁺) имело характерный паттерн: равномерное по органоиду и скопление в зоне glia limitans между органоидом и желудочком мозга реципиента. Глиальный рубец между трансплантатом и реципиентом не выявлялся. Особый интерес представляет васкуляризация органоида со стороны ткани мозга реципиента, детектированная с помощью лектина, конъюгированного с флуорохромом (Рис. 3, 4).

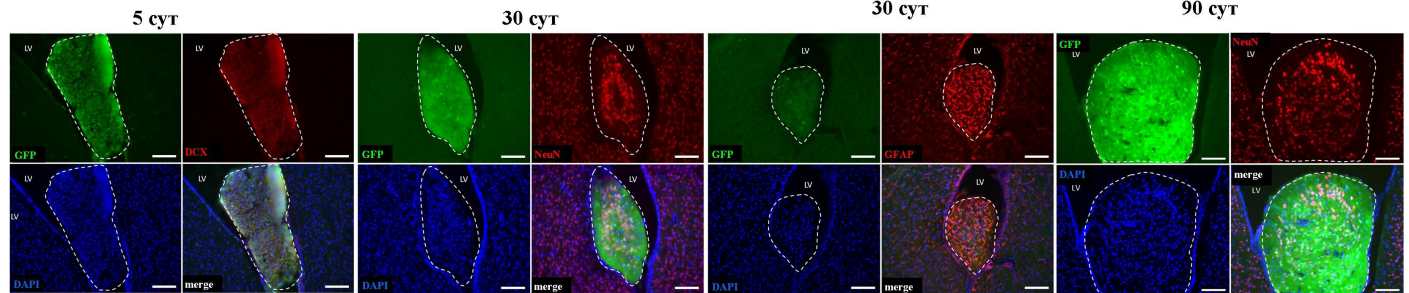


Рис. 3. Трансплантат клеток неокортекса эмбриона мыши (Э14.5) в желудочке реципиента через 5, 30 и 90 суток после операции. Трансплантат отмечен пунктирной линией. LV – боковой желудочек. Масштабный отрезок: 100 мкм

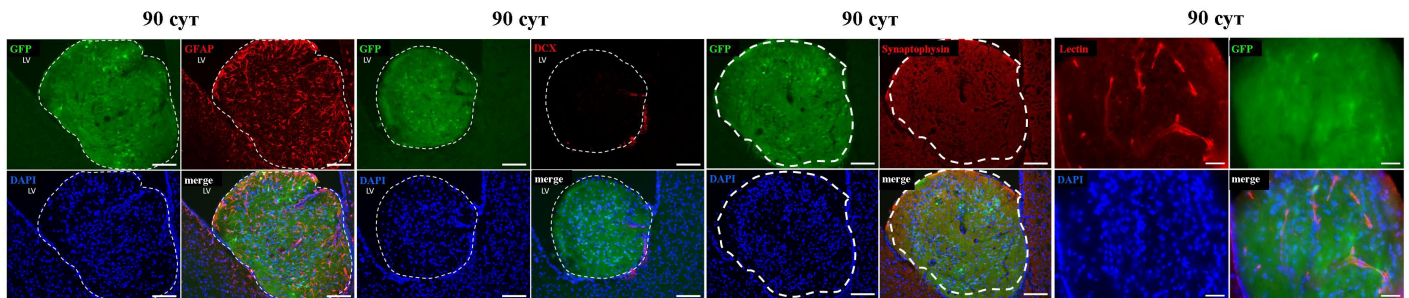


Рис. 4. Трансплантат клеток неокортекса эмбриона мыши (Э14.5) в желудочке реципиента через 90 суток после операции. Трансплантат отмечен пунктирной линией. LV – боковой желудочек. Масштабный отрезок: 100 мкм и 40 мкм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ Исследование церебральных органоидов имеет большое значение для фундаментальной науки и медицины. В настоящей работе представлен альтернативный подход по созданию церебральных органоидов: культивирование органоидов в полостях желудочка мозга экспериментальных животных *in vivo*. В этом случае можно использовать уже коммитированные типы клеток без специальных питательных сред, которые заменяются спинномозговой жидкостью. Формирование органоида с выраженной citoархитектоникой происходит в течение 90 дней. Таким образом, желудочки мозга мыши могут служить инкубатором для развития васкуляризованных трехмерных органоидов. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 19-74-00117.