

DOI: 10.31116/tsitol.2018.08.02

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА

© Ю. К. Комлева,* Е. Д. Осипова, А. В. Моргун, Е. А. Тепляшина,
В. В. Салмин, Н. А. Малиновская, Е. А. Пожиленкова, А. Б. Салмина

*Научно-исследовательский институт молекулярной медицины и патобиохимии
Красноярского государственного медицинского университета
им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022;*

** электронный адрес: yuliakomleva@mail.ru*

В обзоре описаны характеристики нейрональных стволовых клеток, особенности формирования нейрогенных ниш во взрослом головном мозге, а также рассмотрены методические подходы к выделению и культивированию стволовых клеток головного мозга. Основным фокусом статьи является описание достижений микрофлюидных технологий для трехмерного культивирования нейрональных стволовых клеток и создания модели нейрогенной ниши. Микрофлюидный подход культивирования стволовых клеток предлагает уникальную возможность для получения 3D-культуры клеток, создавая платформу для разработки сложных и динамичных микроуровней, которые можно контролировать, воспроизводить и оптимизировать, а также имитировать условия *in vivo*.

Ключевые слова: нейрональные стволовые клетки, нейрогенная ниша, культивирование клеток, микрофлюидные модели

Принятые сокращения: НСК — нейрональные стволовые клетки, НПК — нейрональные прогениторные клетки, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки, bFGF — фактор роста фибробластов, EGF — эпидермальный фактор роста.

В настоящее время активно развиваются научные направления, связанные с применением стволовых клеток в медицине, геномной инженерии и в молекулярной биологии. Как известно, в человеческом организме насчитывается более 200 типов специализированных клеток. Однако стволовые клетки не специализированы и являются основным типом клеток эмбриона уже на ранних стадиях развития (Мусина и др., 2004). Стволовые клетки — это уникальные клетки, обладающие способностью к самовоспроизведению и дифференцировке в разные клеточные элементы, т. е. они являются мультипотентными. В настоящее время стволовые клетки обнаружены в разных тканях организма человека. Так, известны гемопоэтические стволовые клетки, печеночные стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки и нейрональные стволовые клетки (НСК).

Понимание перспектив использования стволовых клеток в медицине, возможностей и потенциальных сложностей различных методов их культивирования невозможно без фундаментальных данных о механизмах и особенностях функционирования стволовых клеток.

В последние годы все большую актуальность приобретает культивирование стволовых клеток для их последующей дифференцировки и применения в мультиклеточных ансамблях или аналогах тканей *in vitro* и *in vivo*, что связано с растущими потребностями регенеративной

медицины. В связи с этим дополнительно к так называемым статическим модельным условиям применяют динамические модели, базирующиеся на микропотоковых (микрофлюидных) технологиях (Моргун и др., 2016). Настоящий обзор ориентирован на анализ задач и возможностей применения современных методических подходов к культивированию стволовых клеток головного мозга.

Стволовые клетки головного мозга: общая характеристика

По мнению многих авторов, нейрональные стволовые клетки (НСК) и нейрональные прогениторные клетки (НПК) могут обладать терапевтическим потенциалом для лечения неврологических заболеваний и травм, поскольку они способны дифференцироваться в три типа клеток центральной нервной системы — нейроны, астроциты и олигодендроциты. НСК были обнаружены в нескольких регионах взрослого головного мозга, а нейрогенез продолжается на протяжении всей жизни, по крайней мере в некоторых областях головного мозга (Gage, 2000). Стволовые клетки в головном мозге (самообновляющиеся, мультипотентные прогениторные) и другие типы прогениторных клеток (в том числе прогениторные клетки с сокращенным или с ограниченным пролиферативным по-

тенциалом) непрерывно генерируют новые нейроны (Kruger, Morrison, 2002). Нейрональные стволовые клетки можно определить как клетки, которые могут генерировать все типы клеток в головном мозге, тогда как нейрональные прогениторные клетки имеют более ограниченный потенциал (Homem et al., 2015). Развитие НСК (НПК) является важным компонентом процессов нейрогенеза, необходимых для процессов обучения и запоминания (Deng et al., 2010).

НСК можно классифицировать в зависимости от их потенциала дифференцировки и генерации клеток разных типов следующим образом: 1) эпителиальные клетки нервной трубки, 2) нейробласты и 3) нейрональные прогениторные клетки (Wang et al., 2017). На самых ранних этапах эмбрионального развития млекопитающих нервная трубка состоит из одного слоя нейроэпителиальных клеток, которые могут делиться. В эмбриональном нейрогенезе нейроэпителиальные клетки могут претерпевать симметричное деление, давая начало двум дочерним клеткам. При дальнейшем развитии эпителиальные признаки нейроэпителиальных клеток становятся менее выраженными, клетки постепенно приобретают свойства

глиальных клеток и в конечном итоге превращаются в однородную популяцию клеток радиальной глии. Клетки радиальной глии делятся асимметрично, давая начало новой клетке радиальной глии и базальной прогениторной клетке. В ряде работ (Kriegstein, Götz, 2003; Götz, Huttner, 2005) было обнаружено, что базальная прогениторная клетка дополнительно симметрично делится с образованием двух нейробластов, которые в конечном итоге дифференцируются в нейроны.

По определению, стволовые клетки проявляют два фундаментальных свойства: 1) самообновление, при котором стволовая клетка воспроизводит копию самой себя, и 2) мультипотентность, при которой стволовая клетка приводит к образованию прогениторной клетки, способной дифференцироваться в нейроны, астроциты и олигодендроциты (Morshead et al., 1994).

Во время развития НСК самообновляются путем симметричного деления. Позже они подвергаются асимметричному делению, при котором одна из дочерних клеток остается пролиферирующей прогениторной клеткой, а другая дочерняя клетка подвергается дифференцировке после одного или нескольких раундов транзиторного ам-

Таблица 1

Основные маркеры, экспрессируемые нейрональными стволовыми клетками

Маркер	Характеристика	Литературный источник
Нестин (Nestin)	Нейроэпителиальный белок стволовых клеток, промежуточный филаментный белок, который экспрессируется в НСК взрослого головного мозга, и исчезает при дифференцировке. Необходим для выживания и самообновления НСК	Park et al., 2010
Sox2	Транскрипционный фактор, задействован в жизненно важных механизмах на разных этапах развития млекопитающих. Sox2 характеризуется высоким уровнем экспрессии в эмбриональных стволовых клетках и НСК взрослого мозга, а также в клетках, которые дифференцируются по глиальному пути	Rizzino, 2009
Notch1	Трансмембранный рецептор, который регулирует формирование, миграцию и дифференцировку нейрональных клеток	Sibbe et al., 2009
HES1 и HES3	Транскрипционные факторы, которые поддерживают симметричное деление стволовых клеток	Hirata et al., 2001
Виментин (Vimentin)	Белок промежуточных филаментов, который экспрессируется в глиальных клетках. Виментин в основном обнаруживается в радиальной глии и незрелых астроцитах при раннем развитии мозга	Von Bohlen, Halbach, 2011
PAX6	Многофункциональный фактор транскрипции Pax6 участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки НСК путем модуляции процессов экспрессии. Определяет выживание отдельных подтипов нейронов в зрелом возрасте	Ninkovic et al., 2010
GFAP	Глиальный фибриллярный кислый белок, относящийся к группе белков промежуточных филаментов, который задействован в поддержании механической прочности астроцитов. Описан как маркер астроцитов, кроме того, сообщается, что клетки с астроцитарными свойствами могут служить источником новых нейронов в процессе нейрогенеза во взрослом организме	Kriegstein, Götz, 2003
Mash1	Транскрипционный фактор, необходимый для эмбриональной нейрональной дифференцировки. Экспрессируется не только в промежуточных клетках-предшественниках (клетках типа C), но также в субпопуляции НСК в субгранулярной и субвентрикулярной зонах взрослого головного мозга	Li et al., 2012
GLAST и GLT1	GLAST (также известный как EAAT1) представляет собой специфический для астроцитов глутаматный транспортер, а GLT1 (также известный как EAAT2) является переносчиком глутамата; оба они определены как маркеры глиальной группы. GLAST был обнаружен в большинстве S100β-положительных клеток в субгранулярной зоне. Он изначально экспрессируется на 13—14-е сут эмбрионального развития мыши и сохраняется в головном мозге взрослых животных. GLAST и GLT могут быть обнаружены в НСК	Lee, Pow, 2010

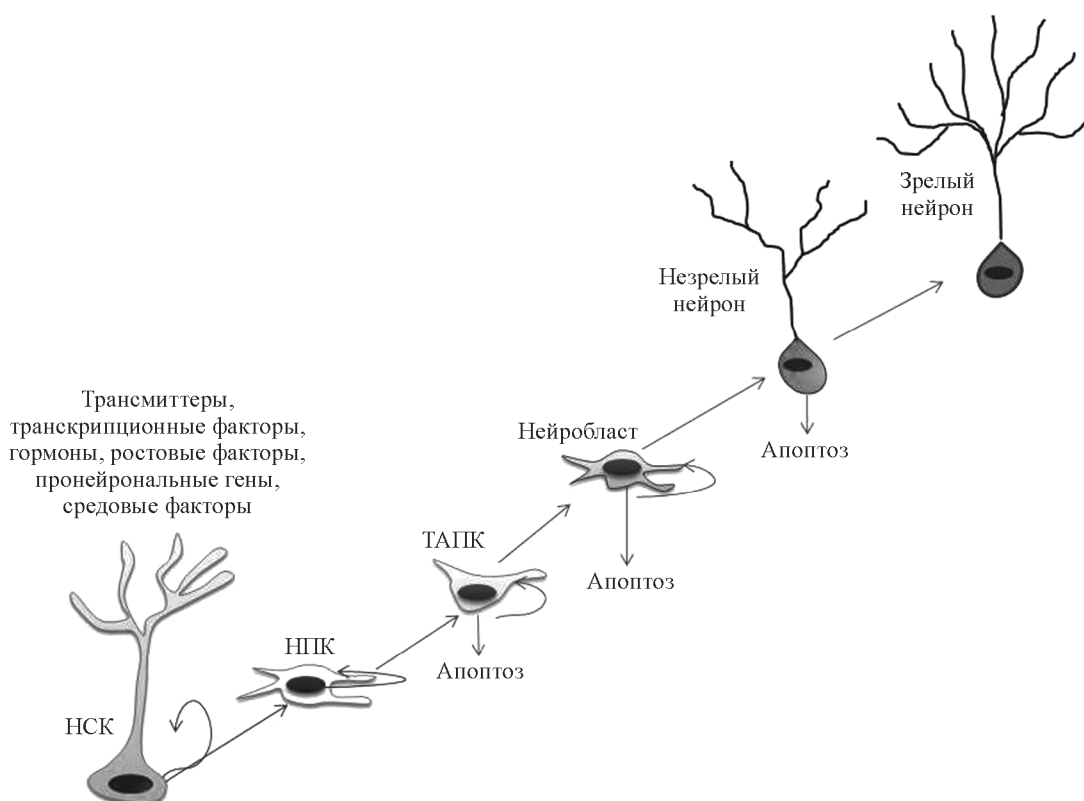


Рис. 1. Основные этапы превращения НСК в зрелый нейрон в нейрогенной нише зубчатой извилины гиппокампа. НСК — нейрональная стволовая клетка, НПК — нейрональная прогениторная клетка, ТАПК — транзитивно-амплифицирующаяся прогениторная клетка.

плифицирующегося деления. Со временем НСК и НПК меняют свою компетенцию (Janssens et al., 2014). Это позволяет им давать начало нейронам различных типов (Wang et al., 2014), которые необходимы для формирования нейрональных цепей, а также способствует своевременному выходу из клеточного цикла. Как только НСК завершают этот раунд делений, они, как правило, подвергаются апоптозу или терминальному делению или стареют и уменьшают пролиферативную активность. По этой причине число НСК у животных после рождения является низким, и лишь несколько стволовых клеток остается во взрослом мозге (Ming, Song, 2011).

Нейрогенез млекопитающих определяется как процесс, который приводит к генерации функциональных нейронов из НСК. Этот процесс происходит в четыре этапа: 1) пролиферация клеток путем асимметричного деления, 2) определение клеточной судьбы, 3) миграция клеток, 4) клеточная дифференцировка, созревание и синаптическая интеграция в нейрональные цепи (Alvarez-Buylla, Lim, 2004; Ming, Song, 2011).

Было показано, что различные факторы и сигналы регулируют образование, деление и миграцию прогениторных клеток, в частности нейротрансмиттеры, нейропептиды, гормоны, цитокины, а также внешние стимулы, инициирующие процессы обучения, запоминания, выражения эмоций и т. д. (Hsieh, 2012; Aimone et al., 2014). Очевидно, что воспроизведение эффектов всех указанных регуляторных стимулов в условиях *in vitro* практически невозможно.

Фенотипирование НСК (НПК) осуществляют путем оценки экспрессии большого спектра молекул (табл. 1).

Необходимо учитывать, что развитие стволовых клеток головного мозга осуществляется в пределах так называемых нейрогенных ниш, которые, будучи представленными широким спектром клеток (эндотелиальные клетки, астроглия и др.), обеспечивают формирование микроокружения, способствующего контролируемому и эффективному развитию стволовых клеток (Pozhilenkova et al., 2017). В частности, во взрослом головном мозге стволовые клетки находятся в двух нейрогенных нишах — в субвентрикулярной зоне боковых стенок латеральных желудочков и субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа (Ruddy, Morshead, 2017).

Именно нейрогенная ниша определяет, делятся НСК или остаются в покое, погибают или пролиферируют, мигрируют или дифференцируются в различные нейрональные клетки (Miller, Gauthier-Fisher, 2009). Во время развития ЦНС боковые желудочки нервной трубки в основном состоят из пролиферативных клеток нейроэпителия. Сегментация и регионализация нервной трубки изменяют и ограничивают нейрогенные области на этапах развития, приводя к появлению ниши, которая варьируется по пространственному признаку, химическому и клеточному составу (Franze, 2013). Стволовые и прогениторные клетки в нейрогенных нишах находятся в контакте со специфическими внеклеточными компонентами, такими как факторы роста, компоненты внеклеточного матрикса, и клетками, которые модулируют их деление и дифференцировку. Ключевые компоненты нейрогенной ниши взрослого головного мозга представлены на рис. 1.

Физиологические и патологические свойства НСК были хорошо изучены в течение последних 30 лет, глав-

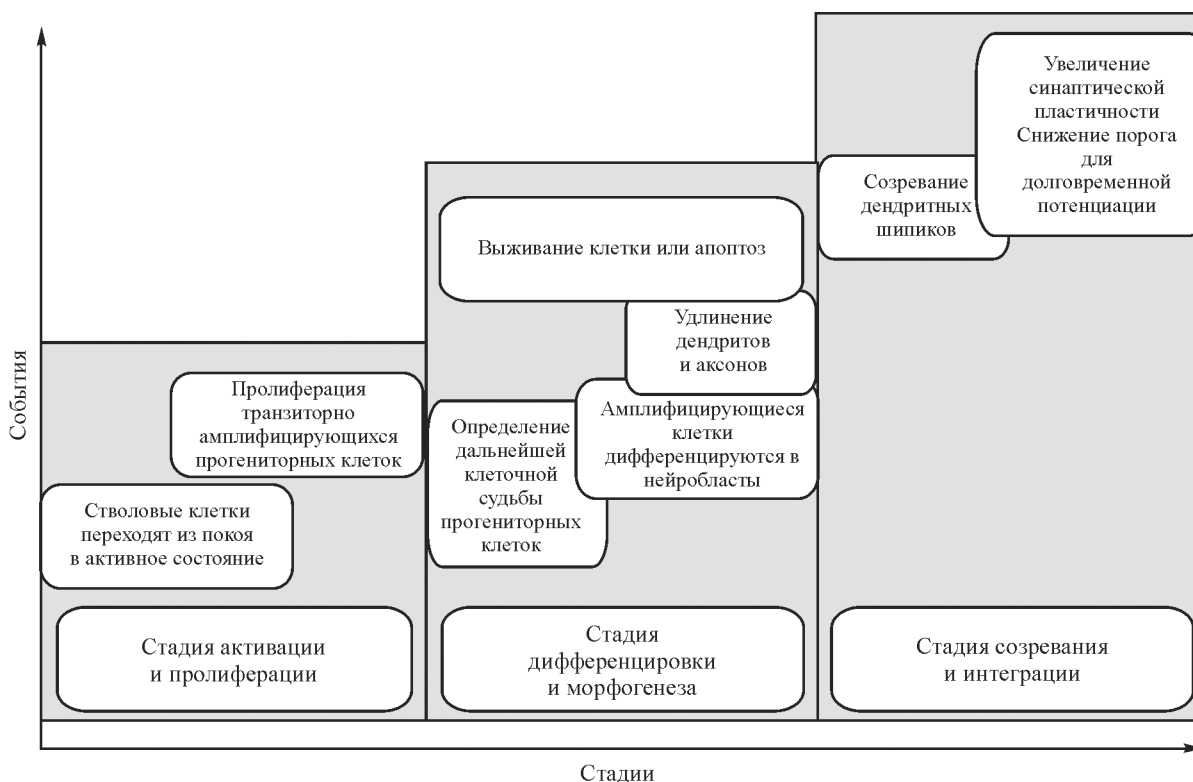


Рис. 2. Основные стадии и события нейрогенеза в гиппокампе.

ным образом у животных и в некоторой степени у людей. На сегодняшний день полученные данные позволили определить структуру, клеточные компоненты, время развития и энергетическое обеспечение ниши, а также начать изучение терапевтического потенциала нейрогенной ниши. В настоящее время становится доступным количественная оценка активности нейрональных стволовых клеток для моделирования нейрогенных ниш *in vitro* или прогнозирования взаимодействия компонентов таких ниш *in silico*. Исследования в этом направлении были уже проведены для многих других органов, но по-прежнему ограничены для головного мозга из-за сложности структуры и ограниченной доступности (Ottoboni et al., 2017).

В целом основные события, сопровождающие поддержание пула, развитие и дифференцировку НСК (НПК) в головном мозге в постнатальном периоде, представлены на рис. 2.

Основные методические подходы к выделению и культивированию стволовых клеток головного мозга

Для выделения нейрональных стволовых и прогениторных клеток (нейросфер) используют фрагменты ткани нейрогенных областей головного мозга эмбрионов экспериментальных животных — субэпендимной зоны желудочков, гиппокампа и обонятельной луковицы. Полученные ткани измельчают и суспендируют в среде, после чего засевают в культуральные флаконы. Клетки культивируют в условиях CO_2 -инкубатора в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °C в культуральной среде без сыворотки, с добавлением гепарина, основного фактора роста фибробластов (bFGF), эпидермального фактора роста (EGF) и других

факторов, поддерживающих стволовые клетки в недифференцированном состоянии. Через 24—48 ч наблюдается образование нейросфер. Жизнеспособные нейросферы при фазово-контрастной микроскопии представляют собой полупрозрачные сфероиды, свободно плавающие в толще среды и состоящие из множества клеток, несущих на своей поверхности микрошипы. На 7-е сут диаметр нейросфер составляет около 100—120 мкм. На рис. 3 представлены нейросферы, полученные из эмбрионального мозга крысы (Хилажева и др., 2015).

После получения необходимого количества нейросфер возможно простимулировать их направленную дифференцировку в клетки нейрональной и астроглиальной природы. Для этого используют культуральные среды без гепарина с добавлением сыворотки крови, а также ростовых факторов и факторов дифференцировки, таких как bFGF, EGF, макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) и ретиноевая кислота (Моргун и др., 2013). Также широко используются коммерческие наборы и добавки для направленной дифференцировки клеток, например NeuroCult™ NS-A Differentiation Kit (StemCell, США), AGS (astrocyte growth supplement, ScienCell, США) и NGS (neuronal growth supplement, ScienCell, США).

Нейросферы, выделенные с использованием таких протоколов, являются хорошей моделью для изучения особенностей ранних этапов нейрогенеза, в том числе при патологических состояниях, например при хронической нейродегенерации. Сочетание этого методического подхода с современными методами оценки пролиферативной активности клеток позволяет четко дифференцировать особенности нарушения нейрогенеза, например при физиологическом старении и хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа, а также оценить тера-

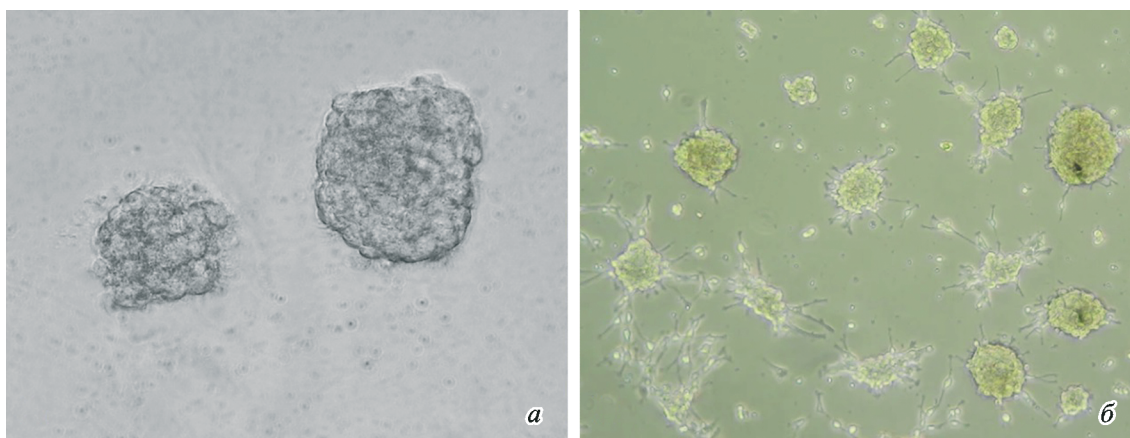


Рис. 3. Нейросферы, полученные из эмбрионального мозга крысы, в процессе пролиферации (а) и в начале дифференцировки (б). Фазово-контрастная микроскопия. Увел.: а — 40× (Хилажева и др., 2015, публикуется с разрешения редакции журнала «Цитология»), б — 20×.

Таблица 2

Факторы роста, применяемые при культивировании нейрональных стволовых клеток в пролиферирующем и дифференцирующемся состояниях

Фактор (комбинация факторов)	Эффект
TGF — трансформирующий фактор роста	Стимулирует пролиферацию, цитотоксичность глии, хемотаксис, эффлюкс кальция. Вторичный регулятор цитокинов (Kandasamy et al., 2014)
FGF (FGF-b/FGF-2/FGF-II) — основной фактор роста фибробластов	Влияет на пролиферацию, дифференцировку, мобильность и выживаемость клеток. Триггер нейрогенеза, ангиогенеза и неоваскуляризации. Поддерживает пролиферацию эмбриональных стволовых клеток в недифференцированном состоянии (Yoshimura et al., 2014)
EGF — эпидермальный фактор роста	Поддерживает пролиферацию недифференцированных стволовых клеток (Puehlinger et al., 2014)
Сыворотка	Обеспечивает клетки гормональными факторами, стимулирует рост и созревание, источник низкомолекулярных и незаменимых соединений, источник неидентифицированных факторов (Landreth et al., 1999)
Альбумин	Переносчик гормонов с небольшой молекулярной массой, стимулирует рост клеток (Landreth et al., 1999)
IGF-1 — инсулиноподобный фактор роста	Участвует в пролиферации, дифференцировке, выживании, росте, апоптозе и регенерации клеток (Pasold et al., 2015)
GDF-5 — фактор роста (дифференциации) 5	Регулирует клеточную пролиферацию и дифференцировку (Sullivan, O'Keefe, 2005)
PDGF — тромбоцитарный фактор роста	Стимулирует пролиферацию, цитотоксичность глии, хемотаксис, эффлюкс кальция. Вторичный регулятор цитокинов (Landreth et al., 1999)
Гепарин + EGF + FGF	Пролиферация недифференцированных нейросфер (Ciccolini, 2001)
bFGF + SCF + EGF + LIF + ILGF-1	Пролиферация недифференцированных нейрональных стволовых клеток (Kallos, Behie, 1999)
LIF — фактор ингибирования лейкемии	Пролиферация недифференцированных стволовых клеток (Лобанок и др., 2008)
DAPT (ингибитор γ -секретазы)	Ингибирует пролиферацию прогениторных клеток, усиливает дифференцировку в нейрональные клетки (Theocharatos et al., 2013)
Сыворотка + ретиноевая кислота	Стимуляция дифференцировки в клетки нейрональной природы (Lee, Trojanowski, 1998)
FGF-1 + стимулятор внутриклеточного уровня цАМФ (форсколин) + активатор протеинкиназы С (форбол-12-миристоил-13-ацетат)	Созревание ДОПА-нейронов (Iacovitti et al., 2001)
Brn-4 + IGF-1 + BDNF	Терминальная дифференцировка постмитотических нейробластов (Schimazaki et al., 1999)
BMP-9	Дифференцировка холинергических нейронов (Lopez-Coviela et al., 2000)
PDGF + EGF + линолевая кислота	Стимуляция дифференцировки в олигодендроциты и нейроны (Minguell et al., 2001)
CNTF + FGF2	Стимуляция дифференцировки клеток глиальной природы (Vergara, Ramirez, 2004)
Диметилсульфоксид + дексаметазон	Стимуляция дифференцировки в астроциты (Minguell et al., 2001)

Краткая характеристика основных биополимерных матриц

Биополимерные матрицы	Краткая характеристика	Литературный источник
Фибрин	Использование фибринового скаффолда связано с подавлением астроглиальной и микроглиальной активации. Не ухудшает выживаемость клеток	Moloney et al., 2015
Коллаген	Обладает хорошей биосовместимостью, гибкостью и биомиметическими свойствами естественного внеклеточного матрикса, в доклинических исследованиях трансплантация клеток на коллагеновой основе продемонстрировала терапевтический потенциал для восстановления поврежденных головного мозга	Wong, Lo, 2015
Гиалуроновая кислота	Матрикс на основе гиалуроновой кислоты значительно уменьшает образование глиальных рубцов после имплантации на участки поражения, способствует росту аксонов	Wang et al., 2012
Матригель	Матригель стимулирует прикрепление клеток к субстрату, их выживание, рост, дифференцировку и миграцию, а также тканевую васкуляризацию	Jin et al., 2010
Фибронектин	Фибронектин участвует в развитии нервной системы и может обеспечивать адгезионную поддержку донорских клеток и опосредовать процессы межклеточной сигнализации	Tate et al., 2009
Агароза	Матрикс на основе агарозы хорошо интегрируется с тканями хозяина, каналы засеваются клетками, характерен линейный рост аксонов	Stokols, Tuszynski, 2006
Желатин	Желатиновый матрикс обеспечивает хорошие показатели роста и дифференцировки нейрональных стволовых клеток, их резистентность к развитию окислительного стресса	Han et al., 2017

пептический потенциал факторов многостимульной (обогащенной) среды (Salmin et al., 2017a).

Подбор режима культивирования стволовых клеток (температурный режим, ингибиторы и активаторы, влияющие на продукцию клеток, моделирующие посттрансляционные модификации, повышающие стабильность системы) выступает важным моментом при разработке технологии получения стволовых клеток (Хилажева и др., 2015). В табл. 2 представлены основные параметры, характеризующие питательные среды, применяемые при культивировании нейрональных стволовых и прогениторных клеток в пролиферирующем и дифференцирующемся состояниях.

Для стабилизации ряда свойств стволовых клеток, в частности нейральных, используют различные субстраты из синтетического или природного материала, на которых культивируют клетки. В таких условиях стволовые клетки находятся в среде, приближенной к естественной. В ряде работ были продемонстрированы возможности использования таких матриц для культивирования клеток и тканей в заданных условиях, что позволило изучать физиологию изолированных клеток и тем самым решать задачи практического использования стволовых клеток в регенеративной медицине (Бармашева и др., 2013; Каршиева и др., 2013).

Биоматериалы с заданными свойствами могут способствовать регенерации тканей как в естественных условиях, так и при использовании биоинженерных методов, как вне организма, так и внутри него. Для достижения этой цели необходимо правильно подобрать естественные носители — внеклеточные матрицы. Они выступают субстратом для прикрепления клеток, обеспечивая их равномерное распределение по твердому субстрату. Клетки, которые отделены от внеклеточного матрикса, быстро теряют жизнеспособность и подвергаются апоптозу (Мусина и др., 2004).

В современных лабораториях для культивирования стволовых клеток используют биосовместимые материалы. В качестве альтернативы «родного» внеклеточного

матрикса для технологии культивирования, дифференцировки клеток и развития тканей применяют 3D-платформы. Матрикс в живой клетке стимулирует рост и дифференцировку стволовых клеток, выступая при этом основой для формирования новой ткани, так же как и 3D-матрицы для роста и развития клеток. Особенности взаимодействия клеток определяет выбор материала, из которого будет изготовлен матрикс. Структура матрикса должна копировать структуру ткани организма (Домнина др., 2013). Например, для культивирования нервных клеток используют мягкую и чувствительную матрицу, которая повторяет структуру мозговой ткани. Для изготовления матриц с волокнистой структурой применяют полимолочную кислоту и природные полимеры — коллаген и альгинат. Данные полимеры характеризуются структурой, в которой чередуются регулярные участки, а также присутствует беспорядочная ориентация волокон. Такая структура устойчива к растяжению (Borghesi et al., 2013). Исследования последних лет показывают, что биоматериалы выступают как основные регуляторные сигналы, которые взаимодействуют с определенными факторами при создании искусственной микросреды, и таким образом осуществляется контроль роста стволовых клеток (Жаркова и др., 2012).

Интересные возможности для культивирования стволовых клеток головного мозга открываются за счет использования желатина. Его применение в качестве биоскаффолда обеспечивает хорошие показатели роста и дифференцировки НСК, их резистентность к развитию окислительного стресса, достижение их функциональности (Lim et al., 2012; Du et al., 2017; Han et al., 2017). Другой не менее интересный подход заключается в применении полилактоидов, выступающих в качестве основы для роста и развития клеток нейрогенных ниш, в частности церебральных эндотелиоцитов (Salmin et al., 2017b) и собственно стволовых клеток нейрональной природы, в том числе при отсутствии факторов роста в питательной среде (Xia et al., 2013; Haddad et al., 2016; Hadjizadeh et al., 2016). Примечательно, что оба типа биоскаффолдов

могут эффективно использоваться не только для решения задач культивирования *in vitro*, но и при трансплантации стволовых клеток в биологическую ткань. Аналогичным образом весьма перспективным является применение полигидроксиалканоев (ПГА) — поли-3-гидроксибутирата (ПГБ) и его сополимеров, получаемых биотехнологическим путем (Shishatskaya, Volova, 2004). Так, росту культуры нейрональных клеток способствует применение подложки из ПГБ и поли(3-гидроксибутират)-со-3-гидроксивалерата (ПГБ-ГВ) (Жаркова и др., 2012). В этой же работе показано, что на матриксах из ПГБ отмечался рост шванновских клеток для восстановления аксонов после травмы шейного отдела спинного мозга у взрослых крыс.

Важно отметить, что качественный внеклеточный матрикс способствует механической стабильности и является матрицей для роста клеток в объеме. Успешное восстановление тканей возможно за счет тонкого взаимодействия клеток и полимера, соотношения между скоростью разрушения полимера и ростом клеток (Haddad et al., 2016). Таким образом, применение биоскаффолдов обеспечивает новые возможности в разработке 3D-моделей тканей с использованием клеток нейрональной и глияльной природы, а также клеток-компонентов нейрогенных ниш (церебральных эндотелиоцитов). В табл. 3 представлены основные характеристики биополимерных матриц, которые используются в настоящее время для культивирования стволовых клеток головного мозга.

Статические и динамические модели нейрогенных ниш *in vitro*

Использование культуры клеток является неотъемлемой частью исследований в области клеточной биологии, биохимии, тканевой инженерии, фармакокинетических исследований, а также процесса разработки лекарств. В связи с этим в настоящее время активно продолжают разрабатываться статические и динамические модели культивирования стволовых клеток (Marimuthu, Kim, 2011). Как уже было отмечено, трехмерная (3D) матрица клеточной культуры имитирует многие биологические функции, не наблюдаемые в двухмерной монослойной клеточной культуре (Chen et al., 2011). Это объясняется двумя причинами. Во-первых, рост клеток *in vivo* зависит от диффузионно-ограниченного распределения кислорода, питательных веществ и других молекул. Такие динамические распределения не могут быть воссозданы в обычной двухмерной клеточной культуре. Во-вторых, рост клеток и реализация их функций происходят в очень сложной трехмерной среде и под влиянием множества регуляторных воздействий других клеток ткани (например, посредством передачи сигнала), внеклеточного матрикса и иных системных факторов, которые не воссоздаются двумерной клеточной культурой. Таким образом, в настоящее время интенсивно осуществляется переход от 2D-клеточной культуры к 3D-культуре, поскольку все большее число данных подтверждает значительные различия в морфологии, экспрессии белков, дифференцировке, миграции, функциональности и жизнеспособности клеток между трехмерными и двухмерными клеточными культурами (Li et al., 2012).

Микрофлюидные устройства и подходы помогают биологам культивировать, поддерживать и анализировать поведение клеток в контролируемом микроокружении. Например, была изготовлена серия микроканалов, чтобы

получить стандартную культуральную среду для поддержания нейрональной дифференцировки НСК, следовательно, избежать неблагоприятных изменений фенотипа клетки (Karimi et al., 2016).

Микрофлюидные модели могут обеспечить точный контроль за количеством стволовых и прогениторных клеток и условиями роста и представляют исследователям возможность располагать клетки в пространственно контролируемых положениях и отслеживать клеточные реакции на различные внутренние или внешние механические, химические и оптические стимулы. Кроме того, микрофлюидные подходы позволяют изучать одиночные клетки при различных градиентах химических агентов (Gupta et al., 2010).

Способность моделировать нейрогенную нишу может быть полезна для культивирования НСК. Как уже было описано выше, микроокружение стволовых клеток в нейрогенной нише формируется из различных физиологических, физико-химических и физико-механических сигналов, таких как взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом, стимуляция факторами роста, жесткость и топография микросреды. Эффекты этих факторов могут проявляться во взаимодействиях между клетками и микроокружением, а также клеточной передаче сигналов. Процессы пролиферации и дифференцировки стволовых клеток в нейрогенной нише регулируются этими факторами и взаимодействиями. Например, жесткость внеклеточного матрикса влияет на направление дифференцировки: мягкий матрикс увеличивает нейрональную дифференцировку, в то время как жесткий увеличивает миогенную и остеогенную дифференцировку (Harink et al., 2013).

Трехмерная конструкция нейрогенной ниши может быть имитирована в гидрогеле с использованием натуральных или синтетических полимеров, включая материалы внеклеточного матрикса, такие как гидрогелевые компоненты (Aizawa et al., 2012). Гидрогели являются популярными материалами, способными поддерживать рост суспендированных адгезивных клеток для формирования трехмерной нейронной сети. Например, гидрогели успешно способствовали формированию трехмерной нейронной сети из сфероидов, полученных из эмбриональных стволовых клеток (Bae et al., 2016). При инкапсулировании сфероида гидрогелями клетки поддерживаются в трехмерном пространстве и способны расти в разных направлениях. Так, было показано, что гидрогели на основе коллагена могут имитировать структуру среды, в которой происходит процесс развития мозга (Lancaster et al., 2013). Аналогично с использованием синтетических полимерных гидрогелей из эмбриональных стволовых клеток были получены нейросферы в виде трехмерной нейронной сети (Bae et al., 2016). После нейродифференцировки эмбриональные стволовые клетки дифференцировались в нейроны и образовывали нейросферу внутри полушария гидрогеля. Когда аксоны дифференцированных нейронов достигали границы полушария гидрогеля, они начинали произвольно расти наружу. Следует отметить, что нейронные сети, генерируемые встроенными системами сфероида, все же не полностью имитируют ткань головного мозга, поскольку разрастание нейритов происходит случайным образом во всех направлениях. Кроме того, эти системы ограничивают контроль над изучаемыми клетками (Chwalek et al., 2015). Чтобы устранить этот недостаток, исследователи разработали многослойную гидрогелевую систему, в которую поме-

щаются нейрональные клетки, что имитирует специфическую структуру тканей головного мозга (Kim et al., 2017).

Хотя гидрогели часто используют в качестве каркасов для трехмерных клеточных культур, такие системы культивирования имеют свои ограничения, включая ограничение транспорта питательных веществ и снижение жизнеспособности клеток (Li et al., 2012). Кроме того, с течением времени гидрогелевые культуры могут уменьшаться в размере или терять целостность, что ограничивает время жизни культуры и снижает функциональную активность клеток (Chwalek et al., 2015). Для преодоления этих недостатков были разработаны методы получения сфероидов без использования геля (DingleYu-Ting et al., 2015), которые позволяют не только визуализировать пространственно-временные морфологические изменения одиночных нейронов в процессе распространения аксонов и формирования синапсов, но и имитировать взаимодействие нейронов на границе раздела. Одним из альтернативных способов преодоления ограничений, связанных с применением гелей, является использование губчатых биоскаффолдов для формирования трехмерной нейронной сети (Choi et al., 2017).

Биоскаффолды изготавливают из различных биосовместимых материалов, таких как синтетические полимеры (поли-L-молочная кислота (PLLA), полигликолевая кислота (PGA) и полимолочно-ко-гликолевая кислота (PLGA)) и натуральные полимеры (коллаген, различные протеогликаны, субстраты на основе альгината и хитозана) (Lozano et al., 2015).

В недавнем исследовании сообщается о микрофлюидном устройстве на основе полидиметилсилоксана (PDMS), которое воссоздает нейрогенную нишу, содержащую 3D-сосудистую сеть (bVas) и внеклеточный матрикс, что позволяет НСК дифференцироваться в клетки физиологически соответствующих фенотипов. Благодаря комбинированному эффекту компонентов внеклеточного матрикса, химических градиентов и сигнальных молекул нейрональная дифференцировка была подавлена, а НСК начинали дифференцироваться в астроциты и олигодендроциты (Shin et al., 2014). Для изготовления микроустройства использовали процесс мягкой литографии, центральный канал с коллагеном I типа был засеян НСК, а два соседних окружающих канала содержали bVas (Karimi, 2016).

Биологические паракринные сигналы, поступающие от окружающих клеток, могут влиять на дифференцировку стволовых клеток. Были проведены исследования по совместному культивированию нейрональных стволовых клеток и мезенхимных стволовых клеток в трехмерной микрофлюидной матрице для изучения действия биологических паракринных сигналов на дифференцировку нейрональных стволовых клеток (Yang et al., 2015).

В эксперименте с применением гидрогеля для культивирования НСК использовали мезенхимные стволовые клетки человека для усиления экспрессии глиального нейротрофического фактора (GDNF). Микрофлюидное устройство с центральным каналом на основе мягкой литографии для культивирования НСК и боковыми каналами для нейротрофического фактора глиальных клеток, экспрессируемого мезенхимными стволовыми клетками, делало возможным паракринную сигнализацию между мезенхимными и стволовыми клетками. Направленная дифференцировка НСК в нейроны была достигнута путем подавления глиальной дифференцировки. Нейрональные клетки, полученные из НСК и дифферен-

цированные в присутствии GDNF-экспрессирующих мезенхимных клеток, проявляли функциональные электрофизиологические особенности, свойственные нейронам. Эффективность этого метода *in vivo* была подтверждена в экспериментах по трансплантации полученных нейронов в головной мозг мышей с неонатальной гипоксически-ишемической травмой головного мозга. Гидрогель на основе гиалуроновой кислоты использовали для трансплантации клеток в стриатум. Мыши, которым были трансплантированы искомые клетки, демонстрировали улучшение неврологических показателей (Yang et al., 2015; Karimi, 2016).

Таким образом, микрофлюидные системы позволяют воссоздать нейрогенную нишу *in vitro* с соответствующим микроокружением, тем не менее требуются дальнейшие исследования для поиска оптимальных условий совместного культивирования, миграции и дифференцировки НСК для воссоздания нейрогенной ниши человека.

Заключение

Сложная структура и функции нейрогенной ниши, с одной стороны, позволяют использовать ее в качестве потенциальной мишени для таргетного воздействия и изменения когнитивного резерва при различных патологиях центральной нервной системы, а с другой стороны, все еще сохраняются трудности ее моделирования. Проблемы культивирования и дифференцировки стволовых клеток в контролируемой среде *in vitro* обусловлены широким спектром стимулов, которые могут играть критическую роль в определении судьбы стволовых клеток. Обеспечение адекватного диапазона различных стимулов, включая специфические белки внеклеточного матрикса, достаточную жесткость подложки, соответствующее напряжение кислорода и микро рельеф, важно для более точного имитирования микроокружения *in vivo*.

Микрофлюидные технологии позволяют преодолеть ограничения традиционных методов 2D и 3D-методов культивирования стволовых клеток и получать результаты, которые более близки к результатам, полученным при экспериментах *in vivo*. Микрофлюидные устройства обладают рядом преимуществ, которые важны для тканевой инженерии на основе стволовых клеток, особенно в области нейрогенной регенерации. Хороший контроль над пространственно-временными факторами, которые определяют микроокружение стволовых клеток, а именно над их взаимодействием с другими клетками и внеклеточным матриксом, над биохимическими градиентами, а также обеспечение наиболее подходящего физического микроокружения являются наиболее важными свойствами микроприборов, которые используются для создания нейрогенной ниши.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения РФ по государственному заданию (2018—2020 гг.).

Список литературы

Бармашева А. А., Николаенко Н. С., Самусенко И. А., Орехова Л. Ю., Пинаев Г. П. 2013. Сравнительное исследование влияния дермальных фибробластов и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, заключенных в коллагеновый гель, на регенерацию десны. Клеточная трансплантология и

- тканевая инженерия. 8 (3) : 35—43. (Barmasheva A. A., Nikolaenko N. S., Samusenko I. A., Orekhova L. Yu., Pinaev G. P. 2013. A comparative study of the influence of skin fibroblasts and bone marrow stromal cells included in collagen gel on gingiva regeneration. *Genes&Cells*. 8 (3): 35—43.)
- Домнина А. П., Фридлянская И. И., Земелько В. И., Пуговкина Н. А., Ковалева З. В., Зенин В. В., Гринчук Т. М., Никольский Н. Н. 2013. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации. *Цитология*. 5 (1) : 69—74. (Domnina A. P., Fridlianskaia I. I., Zemelko V. I., Pugovkina N. A., Kovaleva Z. V., Zenin V. V., Grinchuk T. M., Nikolsky N. N. 2013. Mesenchymal stem cells of human endometrium do not undergo spontaneous transformation during long-term cultivation. *Tsitologiya*. 55 (1) : 69—74.)
- Жаркова И. И., Ефремов Ю. М., Багров Д. В., Зернов А. Л., Андреева Н. В., Шайтан К. В., Бонарцев А. П., Босхонджиев А. П., Махина Т. К., Мышкина В. Л., Воинова В. В., Яковлев С. Г., Филатова Е. В., Иванов Е. А., Бонарцева Г. А. 2012. Влияние модификации поли-3-оксибутирата полиэтиленгликолем на жизнеспособность клеток, культивируемых на полимерных пленках. *Биомед. химия*. 58 (5) : 579—591. (Zharkova I. I., Efremov Yu. M., Bagrov D. V., Zernov A. L., Andreeva N. V., Shaitan K. V., Bonartsev A. P., Boschomjiev A. P., Makhina T. K., Myshkina V. L., Voinova V. V., Yakovlev S. G., Filatova E. V., Ivanov E. A., Bonartseva G. A. 2012. The effect of poly(3-hydroxybutyrate) modification by poly(ethylene glycol) on the viability of cells grown on the polymer films. *Biomed. Chem*. 58 (5) : 579—591.)
- Каршиева С. Ш., Красикова Л. С., Белявский А. В. 2013. Мезенхимные стволовые клетки как средство противоопухолевой терапии. *Молекуляр. биол.* 1 (47) : 45—54. (Karshieva S. S., Krasikova L. S., Belyavsky A. V. 2013. Mesenchymal stem cells as tool for antitumor therapy. *Mol. Biol.* 1 (47) : 45—54.)
- Лобанок Е. С., Межзевикова Л. М., Белянович Л. М., Петрова Р. Р., Василевич И. Б., Волотовский И. Д., Фесенко Е. Е. 2008. Влияние цитокина LIF (Leukemia Inhibitory Factor) на функциональное состояние эмбриональных стволовых клеток мыши линии R1. *Биомед. химия*. 54 (5) : 570—576. (Lobanok E. S., Belyanovich L. M., Vasilevich I. B., Volotovskiy I. D., Mezhevnikova L. M., Petrova R. R., Fesenko E. E. 2009. The influence of LIF (Leukemia Inhibitory Factor) on the functional status of R1 mouse embryonic stem cells. *Biochemistry (Moscow)*. Supp. Ser. B: *Biomed. Chem.* 3 (1) : 54—57.)
- Моргун А. В., Кувачева Н. В., Комлева Ю. К., Кутищева И. А., Окунева О. С., Дробушевская А. И., Хилажева Е. Д., Черепанов С. М., Салмина А. Б. 2013. Дифференцировка эмбриональных прогениторных клеток мозга крыс в астроциты и нейроны. *Сиб. мед. обозрение*. 6 : 9—12. (Morgun A. V., Kuvacheva N. V., Komleva Y. K., Kutischeva I. A., Okuneva O. S., Drobusheskaya A. I., Hilazheva E. D., Cherepanov S. M., Salmina A. B. 2013. Differentiation of embryonic progenitor cells of rat brain in astrocytes and neurons. *Sib. Med. Rev.* 6 : 9—12.)
- Моргун А. В., Салмин В. В., Успенская Ю. А., Тепляшина Е. А., Салмина А. В. 2016. Микрофлюидные технологии в изучении и моделировании гематоэнцефалического барьера. *Биомедицина*. 4 : 22—33. (Morgun A. V., Salmin V. V., Uspenskaya Y. A., Teplyashina E. A., Salmina A. B. 2016. Microfluidic technologies in studying and modelling the blood-brain barrier. *Biomedicine*. 4 : 22—33.)
- Мусина Р. А., Егоров Е. Е., Белявский А. В. 2004. Стволовые клетки: свойства и перспективы использования в медицине. *Молекуляр. биол.* 38 (4) : 563—577. (Musina R. A., Yegorov Ye. Ye., Belyavsky A. V. 2004. Stem cells: Properties and prospective medical applications. *Mol. Biol.* 38 (4) : 563—577.)
- Хилажева Е. Д., Бойцова Е. Б., Пожиленкова Е. А., Солончук Ю. Р., Салмина А. Б. 2015. Получение трехклеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro*. *Цитология*. 57 (10) : 710—713. (Khilazheva E. D., Boytsova E. B., Pozhilenkova E. A., Solonchuk Yu. R., Salmina A. B. 2015. The model of neurovascular unit *in vitro* consisting of three cells types. *Tsitologiya*. 57 (10) : 710—713.)
- Aimone J. B., Li Y., Lee S. W., Clemenson G. D., Deng W., Gage F. H. 2014. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol. Rev.* 94 (4) : 991—1026.
- Aizawa Y., Owen S. C., Shoichet M. S. 2012. Polymers used to influence cell fate in 3d geometry: new trends. *Prog. Polym. Sci.* 37 : 645—658.
- Alvarez-Buylla A., Lim D. A. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*. 41 (5) : 683—686.
- Bae J. H., Lee J. M., Chung B. G. 2016. Hydrogel-encapsulated 3d microwell array for neuronal differentiation. *Biomed. Mater.* 11 (1) : 015019.
- Borghesi A., Avanzini M. A., Novara F., Mantelli M., Lenta L., Achille V., Cerbo R. M., Tzialla C., Londo S., Silvestri A. D., Zimmermann L. J. I., Manzoni P., Zecca M., Spinillo A., Maccario R., Zuffardi M., Stronati M. 2013. Genomic alterations in human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells call for stringent quality control before any possible therapeutic approach. *Cytotherapy*. 15 : 1362—1373.
- Chen S. Y., Hung P. J., Lee P. J. 2011. Microfluidic array for three-dimensional perfusion culture of human mammary epithelial cells. *Biomed. Microdevices*. 13 : 753—758.
- Choi J.-H., Cho H.-Y., Choi J.-W. 2017. Microdevice platform for *in vitro* nervous system and its disease model. *Bioengineering (Basel)*. 4 : 77.
- Chwalek K., Tang-Schomer M. D., Omenetto F. G., Kaplan D. L. 2015. *In vitro* bioengineered model of cortical brain tissue. *Nat. Protoc.* 10 : 1362—1373.
- Ciccolini F. 2001. Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development. *Mol. Cell Neurosci.* 17 : 895—907.
- Deng W., Aimone J. B., Gage F. H. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11 : 339—350.
- Dingle Y. T., Boutin M. E., Chirila A. M., Livi L. L., Labriola N. R., Jakubek L. M., Morgan J. R., Darling E. M., Kauer J. A., Hoffman-Kim D. 2015. Three-dimensional neural spheroid culture: an *in vitro* model for cortical studies. *Tissue Eng. Pt C. Methods*. 21 : 1274—1283.
- Du B. L., Zeng X., Ma Y., Lai B. Q., Wang J. M., Ling E. A., Wu J. L., Zeng Y. S. 2015. Graft of the gelatin sponge scaffold containing genetically-modified neural stem cells promotes cell differentiation, axon regeneration, and functional recovery in rat with spinal cord transection. *J. Biomed. Mater. Res. Pt A*. 103 : 1533—1545.
- Franze K. 2013. The mechanical control of nervous system development. *Development*. 140 : 3069—3077.
- Gage F. H. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science*. 287 : 1433—1438.
- Götz M., Huttner W. B. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 : 777—788.
- Gupta K., Kim D. H., Ellison D., Smith C., Kundu A., Tuan J., Suh K. Y., Levchenko A. 2010. Lab-on-a-chip devices as an emerging platform for stem cell biology. *Lab. Chip*. 10 : 2019—2031.
- Haddad T., Noel S., Liberelle B., Ayoubi R. E., Ajji A., Crescenzo G. D. 2016. Fabrication and surface modification of poly lactic acid (PLA) scaffolds with epidermal growth factor for neural tissue engineering. *Biomatter*. 6 : e1231276.
- Hadjizadeh A., Savojo H., Ajji A. 2016. A facile approach for the mass production of submicro/micro poly (lactic acid) fibrous mats and their cytotoxicity test towards neural stem cells. *Biomed. Res. Int.* 2016 : Article ID 8921316.
- Han X., Yu L., Ren J., Wang M., Liu Z., Hu X., Hu D., Chen Y., Chen L., Zhang Y., Liu Y., Zhang X., He H., Gao Z. 2017. Efficient and fast differentiation of human neural stem cells from human embryonic stem cells for cell therapy. *Stem Cells Int.* 2017 : Article ID 9405204.
- Harink B., Le Gac S., Truckenmüller R., van Blitterswijk C., Habibovic P. 2013. Regeneration-on-a-chip? The perspectives on use of microfluidics in regenerative medicine. *Lab. Chip*. 13 : 3512—3528.

- Hirata H., Tomita K., Bessho Y., Kageyama R. 2001. *Hes1* and *Hes3* regulate maintenance of the isthmic organizer and development of the mid/hindbrain. *EMBO J.* 20 : 4454—4466.
- Homem C. F., Repic M., Knoblich J. A. 2015. Proliferation control in neural stem and progenitor cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 16 : 647—659.
- Hsieh J. 2012. Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Develop.* 26 : 1010—1021.
- Iacovitti L., Stull N. D., Jin H. 2001. Differentiation of human dopamine neurons from embryocarcinoma stem cell line. *Brain Res.* 912 : 99—104.
- Janssens D. H., Komori H., Grbac D., Chen K., Koe C. T., Wang H., Lee C.-Y. 2014. Earmuff restricts progenitor cell potential by attenuating the competence to respond to self-renewal factors. *Development.* 141 : 1036—1046.
- Jin K., Mao X., Xie L., Galvan V., Lai B., Wang Y., Gorostiza O., Wang X., Greenberg D. A. 2010. Transplantation of human neural precursor cells in Matrigel scaffolding improves outcome from focal cerebral ischemia after delayed postischemic treatment in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30 : 534—544.
- Kairimi M., Bahrami S., Mirshekari H., Basri S. M. M., Nik A. B., Aref A. R., Akbari M., Hamblin M. R. 2016. Microfluidic systems for stem cell-based neural tissue engineering. *Lab. Chip.* 16 : 2551—2571.
- Kallos M. S., Behie L. A. 1999. Inoculation and growth conditions for high-cell-density expansion of mammalian NSC in suspension bioreactors. *Biotechnol. Bioengineering.* 63 : 473—483.
- Kandasamy M., Lehner B., Kraus S., Ramm P., Marschallinger S. J., Rivera F. J., Trumbach D., Ueberham U., Reitsamer A., Strauss H. O., Bogdahn U., Couillard-Despres S., Aigner L. 2014. TGF- β signalling in the adult neurogenic niche promotes stem cell quiescence as well as generation of new neurons. *J. Cell. Mol. Med.* 18 (7) : 1444—1459.
- Kim S. H., Im S. K., Oh S. J., Jeong S., Yoon E. S., Lee C. J., Choi N., Hur E. M. 2017. Anisotropically organized three-dimensional culture platform for reconstruction of a hippocampal neural network. *Nat. Commun.* 8 : 14346.
- Kriegstein A. R., Götz M. 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43 : 37—43.
- Kruger G. M., Morrison S. J. 2002. Brain repair by endogenous progenitors. *Cell.* 110 : 399—402.
- Lancaster M. A., Renner M., Martin C. A., Wenzel D., Bicknell L. S., Hurles M. E., Homfray T., Penninger J. M., Jackson A. P., Knoblich J. A. 2013. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 501 : 373—379.
- Landreth G. E., Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W., Perry B. 1999. *Classes of growth factors acting in the nervous system. Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.* 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1183 p.
- Lee A., Pow D. V. 2010. Astrocytes: glutamate transport and alternate splicing of transporters. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 : 1901—1906.
- Lee V. M.-Y., Trojanowski J. Q. 1998. Compositions and methods for producing and using homogenous neuronal cell transplants. United States Patent. Number 5792900.
- Li S., Sun G., Murai K., Ye P., Shi Y. 2012. Characterization of TLX expression in neural stem cells and progenitor cells in adult brains. *PLoS ONE.* 7 : e43324.
- Li X. J., Valadez A. V., Zuo P., Nie Z. 2012. Microfluidic 3d cell culture: potential application for tissue-based bioassays. *Bioanalysis.* 4 : 1509—1525.
- Lim T. C., Toh W. S., Wang L.-S., Kurisawa M., Spector M. 2012. The effect of injectable gelatin-hydroxyphenylpropionic acid hydrogel matrices on the proliferation, migration, differentiation and oxidative stress resistance of adult neural stem cells. *Biomaterials.* 33 : 3446—3455.
- Lopez-Coviella I., Bersa B., Krauss R., Blusztajn J. K. 2000. Induction and maintenance of cholinergic phenotype in the CNS by BMP-9. *Science.* 289 : 313—316.
- Lozano R., Stevens L., Thompson B. C., Gilmore K. J., Gorkin R., Stewart E. M., Panhuis M., Romero-Ortega M., Wallace G. G. 2015. 3d printing of layered brain-like structures using peptide modified gellan gum substrates. *Biomaterials.* 67 : 264—273.
- Marimuthu M., Kim S. 2011. Microfluidic cell coculture methods for understanding cell biology, analyzing bio/pharmaceuticals, and developing tissue constructs. *Anal. Biochem.* 413 : 81—89.
- Miller F. D., Gauthier-Fisher A. 2009. Home at last: neural stem cell niches defined. *Cell Stem Cell.* 4 : 507—510.
- Ming G.-L., Song H. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron.* 70 : 687—702.
- Minguell J. J., Erices A., Conget P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* 226 : 507—520.
- Moloney T. C., Fhlathartaigh Ni M., Kulkarni M., Pandit A., Dowd E. 2015. Fibrin as a scaffold for delivery of GDNF overexpressing stem cells to the adult rat brain. *Biomaterials.* 1 : 559—566.
- Morshead C. M., Reynolds B. A., Craig C. G., McBurney M. W., Staines W. A., Morassutti D., Weiss S., van der Kooy D. 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron.* 13 : 1071—1082.
- Ninkovic J., Pinto L., Petricca S., Lepier A., Sun J., Rieger M. A., Schroeder T., Cvekl A., Favor J., Götz M. 2010. The transcription factor Pax6 regulates survival of dopaminergic olfactory bulb neurons via crystallin α A. *Neuron.* 68 : 682—694.
- Ottoboni L., Merlini A., Martino G. 2017. Neural stem cell plasticity: advantages in therapy for the injured central nervous system. *Front. Cell Develop. Biol.* 5 : 52.
- Park D., Xiang A. P., Mao F. F., Zhang L., Di C. G., Liu X. M., Shao Y., Ma B. F., Lee J. H., Ha K. S., Walton N., Lahn B. T. 2010. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells.* 28 : 2162—2171.
- Passold J., Zander K., Heskamp B., Gruttner C., Luthen F., Tischer T., Jonitz-Heincke A., Bader R. 2015. Positive impact of IGF-1-coupled nanoparticles on the differentiation potential of human chondrocytes cultured on collagen scaffolds. *Int. J. Nanomed.* 10 : 1131—1143.
- Pozhilenkova E. A., Lopatina O. L., Komleva Y. K., Salmin V. V., Salmina A. B. 2017. Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain. *Rev. Neurosci.* 28 : 397—415.
- Puehringer D., Orel N., Lüningschrör P., Subramanian N., Herrmann T., Chao M. V., Sendtner M. 2013. EGF transactivation of Trk receptors regulates the migration of newborn cortical neurons. *Nature Neurosci.* 16 (4) : 407—415.
- Rizzino A. 2009. Sox2 and Oct-3/4 : a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine.* 1 (2) : 228—236.
- Ruddy R. M., Morshead C. M. 2017. Home sweet home: the neural stem cell niche throughout development and after injury. *Cell Tissue Res.* 371 : 125—141.
- Salmin V. V., Komleva Y. K., Kuvacheva N. V., Morgun A. V., Khilazheva E. D., Lopatina O. L., Pozhilenkova E. A., Shapovalov K. A., Uspenskaya Y. A., Salmina A. B. 2017a. Differential roles of environmental enrichment in alzheimer's type of neurodegeneration and physiological aging. *Front. Aging Neurosci.* 9 : 245.
- Salmin V., Morgun A., Khilazheva E., Pisareva N., Boitsova E., Lavrentiev P., Sadovsky M., Salmina A. 2017b. Secret life of tiny blood vessels: lactate, scaffold and beyond. *Lecture Notes in Computer Science.* 10208. 591—601.
- Schimazaki T., Arsenjevic Y., Ryan A. K., Rosenfeld M. G., Weiss S. 1999. Role of Brn-4 in the regulation of striatal neuron precursor differentiation. *EMBO J.* 18 : 444—456.
- Shin Y., Yang K., Han S., Park H.-J., Heo Y. S., Cho S.-W., Chung S. 2014. Reconstituting vascular microenvironment of neural stem cell niche in three-dimensional extracellular matrix. *Adv. Healthc. Mater.* 3 : 1457—1464.
- Shishatskaya E. I., Volova T. G. 2004. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for *in vitro* cell cultures. *J. Mater. Sci.: Materials in Medicine.* 15 : 915—923.

- Sibbe M., Förster E., Basak O., Taylor V., Frotscher M. 2009. Reelin and Notch1 cooperate in the development of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 29 : 8578—8585.
- Stokols S., Tuszynski M. H. 2006. Freeze-dried agarose scaffolds with uniaxial channels stimulate and guide linear axonal growth following spinal cord injury. *Biomaterials.* 27 : 443—451.
- Sullivan A. M., O'Keeffe G. W. 2005. The role of growth/differentiation factor 5 (GDF5) in the induction and survival of mid-brain dopaminergic neurones: relevance to Parkinson's disease treatment. *J. Anat.* 207 : 219—226.
- Tate C. C., Shear D. A., Tate M. C., Archer D. R., Stein D. G., La Placa M. C. 2009. Laminin and fibronectin scaffolds enhance neural stem cell transplantation into the injured brain. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3 : 208—217.
- Theocharatos S., Wilkinson D. J., Darling S., Wilm B., Kenny S., Edgar D. 2013. Regulation of progenitor cell proliferation and neuronal differentiation in enteric nervous system neurospheres. *PLoS ONE.* 8 : e54809.
- Vergara C., Ramirez B. 2004. CNTF, a pleiotropic cytokine: emphasis on its myotrophic role. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 47 : 161—173.
- Von Bohlen O., Halbach A. 2011. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 345 (1) 1 : 1—19.
- Wang C., Lu C., Peng J., Hu C., Wang Y. 2017. Roles of neural stem cells in the repair of peripheral nerve injury. *Neural Regen. Res.* 12 : 2106—2112.
- Wang X., He J., Wang Y., Cui Fu-Z. 2012. Hyaluronic acid-based scaffold for central neural tissue engineering. *Interface Focus.* 2 : 278—291.
- Wang Y. C., Yang J. S., Johnston R., Ren Q., Lee Y. J., Luan H., Brody T., Odenwald W. F., Lee T. 2014. *Drosophila* intermediate neural progenitors produce lineage-dependent related series of diverse neurons. *Development.* 141 : 253—258.
- Wong F. S., Lo A. C. 2015. Collagen-based scaffolds for cell therapies in the injured brain. *J. Stem Cell Res. Ther.* 5 : 267.
- Xia L., Wan H., Hao S. Y., Li D. Z., Chen G., Gao C. C., Li J. H., Yang F., Wang S. G., Liu S. 2013. Co-transplantation of neural stem cells and Schwann cells within poly (L-lactic-co-glycolic acid) scaffolds facilitates axonal regeneration in hemisectioned rat spinal cord. *Chin. Med. J.* 126 : 909—917.
- Yang K., Park H. J., Han S., Lee J., Ko E., Kim J., Lee J. S., Yu J. H., Song K. Y., Cheong E., Cho S. R., Chung S., Cho S. W. 2015. Recapitulation of *in vivo*-like paracrine signals of human mesenchymal stem cells for functional neuronal differentiation of human neural stem cells in a 3D microfluidic system. *Biomaterials.* 63 : 177—188.
- Yoshimura S., Teramoto T., Whalen M. J., Irizarry M. C., Takagi Y., Qiu J., Harada J., Waerber C., Breakefield X. O., Moskowitz M. A. 2003. FGF-2 regulates neurogenesis and degeneration in the dentate gyrus after traumatic brain injury in mice. *J. Clin. Invest.* 112 : 1202—1210.

Поступила 7 III 2018

MODERN TECHNOLOGIES OF BRAIN STEM CELLS CULTURE

Yu. K. Komleva,* E. D. Osipova, A. V. Morgun, E. A. Teplyashina,
V. V. Salmin, N. A. Malinovskaya, E. A. Pozhilenkova, A. B. Salmina

V. P. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022;

*e-mail: yuliakomleva@mail.ru

The article describes the characteristics of neuronal stem cells, features of the neurogenic niches formation in the adult brain, and also provides methodological approaches to the isolation and culturing of brain stem cells. The main focus of the article is a description of the achievements of microfluidic technologies for the three-dimensional culture of neuronal stem cells and the establishment of the neurogenic niche model. The microfluidic approach offers a unique opportunity to get a 3D cell culture by creating a platform for developing complex and dynamic microlevels that can be monitored, reproduced, optimized and used to simulate *in vivo* conditions.

Key words: neuronal stem cells, neurogenic niche, cell culture, microfluidic models