



Морфологические изменения нейрональных предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и трансплантированных в стриатум крыс с моделью болезни Паркинсона

Д.Н. Воронков¹, А.В. Ставровская¹, О.С. Лебедева², Вен Ли³, А.С. Ольшанский¹, А.С. Гущина¹, М.Р. Капкаева¹,
А.Н. Богомазова², М.А. Лагарькова², С.Н. Иллариошкин¹

¹ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия;

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина», Москва, Россия;

³Китайский медицинский университет, Шеньян, Китайская Народная Республика

Аннотация

Введение. Разработка клеточной терапии для пациентов с болезнью Паркинсона (БП) предполагает создание протоколов на основе трансплантации нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека, в поражённую область головного мозга.

Цель исследования — охарактеризовать нейроны, трансплантированные в мозг крысы, для оценки эффективности нейротрансплантации на животной модели БП.

Материалы и методы. Нейроны, полученные из ИПСК человека (линия IPSRG4S), трансплантировали в стриатум крыс с интраназальным введением 6-ОНДА в качестве модели БП. Затем проводили иммуноокрашивание для выявления экспрессии глиальных и нейрональных маркеров в трансплантированных клетках в срок 2–24 нед после трансплантации.

Результаты. Через 4 нед в трансплантате зарегистрировано увеличение экспрессии маркеров зрелых нейронов на фоне снижения экспрессии маркеров нейрональных предшественников и первичной провоспалительной реакции глии. Дифференцировка и созревание нейрональных клеток в трансплантате продолжались более 3 мес. На более поздних сроках (3 и 6 мес) в трансплантате выявляли две зоны: содержащую преимущественно трансплантированные нейроны и образованную в основном астроцитами человека. В мозолистом теле и окружающей ткани полосатого тела обнаружены отростки нейронов человека, в трансплантате — крупные нейроны человека, экспрессирующие тирозингидроксилазу.

Заключение. Установленные в работе морфологические особенности трансплантата на разных сроках позволяют глубже понять патофизиологию и временные закономерности интеграции новых дофаминергических нейронов и реиннервации стриатума у крыс с моделью БП в отдалённом послеоперационном периоде.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; модель; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека; нейроны; трансплантация; полосатое тело

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 10-7/20 от 27.11.2020).

Источник финансирования. Авторы из ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина получали финансирование по гранту 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования РФ. Авторы из ФГБНУ НЦН заявляют об отсутствии внешних источников финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Адрес для корреспонденции: 105064, Москва, пер. Обуха, д. 5, стр. 2. ФГБНУ «Научный центр неврологии».
E-mail: alla_stav@mail.ru. Ставровская А.В.

Для цитирования: Воронков Д.Н., Ставровская А.В., Лебедева О.С., Ли Вен, Ольшанский А.С., Гущина А.С., Капкаева М.Р., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н. Морфологические изменения нейрональных предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и трансплантированных в стриатум крыс с моделью болезни Паркинсона. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2023;17(2):43–50.
DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2023.2.6>

Поступила 10.04.2023 / Принята в печать 28.04.2023 / Опубликовано 25.06.2023

Morphological Changes in Neural Progenitors Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells and Transplanted into the Striatum of a Parkinson's Disease Rat Model

Dmitry N. Voronkov¹, Alla V. Stavrovskaya¹, Olga S. Lebedeva², Wen Li³, Artem S. Olshansky¹, Anastasia S. Gushchina¹, Marina R. Kapkaeva¹, Alexandra N. Bogomazova², Maria A. Lagarkova², Sergey N. Illarionov¹

¹Research Center of Neurology, Moscow, Russia;

²Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine, Moscow, Russia;

³Health Sciences Institute, China Medical University, Shenyang, China

Abstract

Introduction. Development of cell therapy for Parkinson's disease (PD) requires protocols based on transplantation of neurons derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) into the damaged area of the brain.

Objective: to characterize neurons transplanted into a rat brain and evaluate neural transplantation efficacy using a PD animal model.

Materials and methods. Neurons derived from hiPSCs (IPSRG4S line) were transplanted into the striatum of rats after intranigral injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Immunostaining was performed to identify expression of glial and neuronal markers in the transplanted cells within 2–24 weeks posttransplant.

Results. 4 weeks posttransplant we observed increased expression of mature neuron markers, decreased expression of neural progenitor markers, and primary pro-inflammatory response of glial cells in the graft. Differentiation and maturation of neuronal cells in the graft lasted over 3 months. At 3 and 6 months we detected 2 graft zones: one mainly contained the transplanted neurons and the other — human astrocytes. We detected human neurites in the corpus callosum and surrounding striatal tissue and large human tyrosine hydroxylase-expressing neurons in the graft.

Conclusion. With graft's morphological characteristics identified at different periods we can better understand pathophysiology and temporal patterns of new dopaminergic neurons integration and striatal reinnervation in a rat PD model in the long-term postoperative period.

Keywords: Parkinson's disease; model; human induced pluripotent stem cells; hiPSC; neurons; transplantation; striatum

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (protocol No. 10-7/20, November 27, 2020).

Source of funding. Authors from Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine were supported by grant 075-15-2019-1669 from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. Authors from Research Center of Neurology declare that they received no external funding for the research.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For correspondence: 105064, Russia, Moscow, 5 Obukha per., build. 2. Research Center of Neurology.

E-mail: alla_stav@mail.ru. Stavrovskaya A.V.

For citation: Voronkov D.N., Stavrovskaya A.V., Lebedeva O.S., Li W., Olshansky A.S., Gushchina A.S., Kapkaeva M.R., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Illarionov S.N. Morphological changes in neural progenitors derived from human induced pluripotent stem cells and transplanted into the striatum of a Parkinson's disease rat model. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2023;17(2):43–50. (In Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2023.2.6>

Received 10.04.2023 / Accepted 28.04.2023 / Published 25.06.2023

Введение

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) человека могут быть дифференцированы в клетки-предшественники нейронов, что открывает многообещающие перспективы для заместительной клеточной терапии и моделирования нейродегенеративных заболеваний человека [1–4], в том числе болезни Паркинсона (БП). Поскольку реконструкция повреждённого нигростриатного пути при БП и реиннервация стриатума в зрелом мозге трудно осуществимы [5], основным экспериментальным подходом для разработки клеточной терапии БП, оценки выживаемости и функциональной состоятельности трансплантированных клеток остаётся их введение непосред-

ственно в стриатум. В то же время направленная дифференцировка нейтральных стволовых клеток, полученных из ИПСК человека, в нейроны с заданным фенотипом (например, дофаминергические нейроны среднего мозга) требует разработки комплексных протоколов [6–9]. Этапы дифференцировки и созревания дофаминовых (ДА) нейронов среднего мозга из ИПСК включают ингибирование сигнальных путей, определяющих дифференцировку клеток в сторону передней части нервной трубки, и использование нейротрофических факторов, ответственных за развитие нейронов среднего мозга [7]. Для повышения эффективности дифференцировки используются факторы BDNF, GDNF, TGFβ3 и др. Вариации во времени воздействия, различные сочетания и соотношения факторов зна-

чительно влияют на эффективность дифференцировки и количество получаемых ДА-нейронов [7, 8]. Эффективная трансплантация возможна только для нейрональных предшественников на разных стадиях созревания, поскольку окончательно дифференцированные нейроны легко повреждаются.

В мозге аллотрансплантат окружен активированными клетками глии хозяина, выработка которыми провоспалительных цитокинов и прочих факторов влияет на процесс дифференцировки и созревания нервных клеток [10, 11]. Имеются также свидетельства о наличии в мозге грызунов реактивного нейрогенеза, протекающего в условиях повреждения, и его отличиях от канонического нейрогенеза, ограниченного нейрогенными нишами [12]. Очевидно, что динамика созревания и интеграции трансплантата зависит от стадии дифференцировки трансплантированных клеток и влияния микроокружения [13–15], но эти процессы остаются недостаточно изученными.

Цель настоящего исследования — охарактеризовать созревание нейронов, полученных из ИПСК человека, при их интеграции в стриатум крыс после интранигрального введения 6-гидроксидофамина (6-OHDA).

Материалы и методы

Получение клеточных культур

Нейроны были дифференцированы из ИПСК, полученных из фибробластов кожи здорового донора. Используемая линия ИПСК IPSRG4S охарактеризована согласно общепринятым стандартам [16].

Составы сред для дифференцировки и культивирования

Используемый в настоящем исследовании протокол дифференцировки ИПСК подробно описан ранее [17]. Среда для нейрональной дифференцировки ИПСК: DMEM/F12, 2% заменителя сыворотки, 1% N2 добавка, 1мМ глутамин, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицин, 80 нг/мл Noggin, 10 мкМ SB431542, 2 мкМ дорсоморфин. Среда для культивирования нейрональных предшественников: DMEM/F12, 2% B27 добавка, 1 мМ глутамин, 50 ЕД/мл пенициллин-стрептомицин, 100 нг/мл Shh, 100 нг/мл FGF8 и 2 мкМ пурморфамин. Среда для созревания нейронов: DMEM/F12, 2% B27 добавка, 1 мМ глутамин, 50 ЕД/мл пенициллин-стрептомицин, 20 нг/мл BDNF, 20 нг/мл GDNF, 200 мкМ аскорбиновая кислота и 5 мкМ форсколина.

Животные

Эксперименты проводили с соблюдением биоэтических норм. В работе было использовано 60 самцов крыс Вистар (3,5 мес, масса тела 300–350 г), полученных из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России филиал «Столбовая». В иммуноморфологическом исследовании были использованы образцы мозга 16 животных.

Манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (CETS No. 170), Приказом МЗ РФ № 119Н от 01.04.2016 Об утверждении Правил лабораторной практики», а также руководствуясь «Правилами работы с лабо-

раторными грызунами и кроликами» (ГОСТ 33216-2014). Животные содержались в стандартных условиях вивария с неограниченным доступом к пище и воде при 12-часовом световом режиме. Эксперимент начинали после 10-дневной адаптации животных к условиям вивария.

Хирургические процедуры

Для проведения стереотаксических операций животных помещали на раму лабораторного стереотаксиса («Stoelting Co.»), скальп надрезали и с помощью портативной бор-машины просверливали в черепе трепанационные отверстия для доступа к определённым структурам мозга в соответствии с координатами атласа мозга крыс [18]. При разведении животных в стереотаксисе между животным и рабочей поверхностью помещали ватно-марлевый матрас, чтобы избежать переохлаждения во время и после операции. Для анестезии применяли золетил-100 в дозе 30 мг/кг и ксиланит в дозе 3 мг/кг внутримышечно, для премедикации использовали атропин в дозе 0,04 мг/кг подкожно за 10-15 мин до введения ксиланита.

Для получения модели паркинсонического синдрома животным ($n = 50$) в компактную часть чёрной субстанции справа вводили селективный для дофаминергических нейронов токсин — 6-OHDA в дозе 12 мкг в 3 мкл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты по следующим координатам: AP = -4,8; L = 2,2; V = 8,0. В чёрную субстанцию слева вводили растворитель в том же объёме. Ложнооперированным (контрольным) животным ($n = 10$) вводили растворитель билатерально в том же объёме.

Через 25 дней после введения 6-OHDA части животных ($n = 34$) была проведена нейротрансплантация нейрональных предшественников или фибробластов (группы «6-OHDA + нейроны» и «6-OHDA + фибробласты» соответственно) в хвостатые ядра мозга, остальным животным с введением 6-OHDA ($n = 16$) вводили физиологический раствор (группа «6-OHDA + NaCl») в ту же структуру. Трансплантацию проводили по следующим координатам: AP = 1,08; L = 2,4; V = 4,5. Животные были анестезированы по схеме, описанной выше.

Трансплантацию клеток осуществляли унилатерально, на стороне повреждения. В хвостатые ядра через микрошприц Гамильтона вводили суспензию, содержащую 3×10^5 клеток в 10 мкл физиологического раствора, с постоянной скоростью в течение 5 мин. После инъекции микрошприц оставляли на месте в течение ещё 1 мин, затем медленно извлекали. В хвостатые ядра слева вводили физиологический раствор в том же объёме. За 1 день до операции по трансплантации клеток и далее ежедневно в течение всего эксперимента животные получали циклоспорин в дозе 12 мг/кг.

Ложнооперированным животным (без введения 6-OHDA, группа «контроль»; $n = 10$) в хвостатые ядра мозга вводили билатерально физиологический раствор в том же объёме.

Поведение животных

Поведенческие эффекты токсического воздействия и введения суспензии клеток оценивали по изменению двигательной активности экспериментальных крыс в тесте «открытое поле» (ОП). Установка ОП представляла собой короб $97 \times 97 \times 40$ см из жёсткого ПВХ («Открытая наука»),

Антитела, использованные для оценки морфологических изменений в трансплантате

Antibodies used to assess morphological changes in the graft

Клеточная популяция Cell population	Выявляемый белок Detected protein	Видоспецифичность антител: Hm — человек, Rt — крыса Species specificity of the antibodies: Hm stands for human, Rt stands for rat
Все клетки трансплантата All graft cells	Ядерный антиген человека (HNA) Human nuclear antigen (HNA)	Hm
	Белок наружной мембраны митохондрий (MTC) Outer mitochondrial membrane protein (MTC)	Hm
Нейрональные предшественники Neural progenitors	Нестин (Nes) Nestin (Nes)	Hm, Rt
	Даблкортин (DCX) Doublecortin (DCX)	Hm, Rt
	Фактор транскрипции Sox9 Transcription factor Sox9	Hm, Rt
Зрелые нейроны Mature neurons	Нейрональная енолаза (NSE) Neuron-specific enolase (NSE)	Hm
	Ядерный белок нейронов (NeuN) Neuronal nuclei protein (NeuN)	Hm, Rt
	Убиквитин С-терминальная гидролаза (PGP9.5) Protein gene product 9.5 (PGP9.5)	Hm, Rt
	Синаптофизин (SYP) Synaptophysin (SYP)	Hm, Rt
	Тирозингидроксилаза (TH) Tyrosine hydroxylase (TH)	Hm, Rt
Астроглия Astroglia	Фактор транскрипции Sox9 Transcription factor Sox9	Hm, Rt
	Глиофибрилярный белок (GFAP) Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Rt
	10-Формилтетрагидрофолат дегидрогеназа (ALDH1L1) 10-Formyltetrahydrofolate dehydrogenase (ALDH1L1)	Hm, Rt
Микроглия Microglia	Воспалительный фактор аллогraftа (IBA1) Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1)	Rt

продолжительность теста — 3 мин. Регистрацию поведения крыс и последующий анализ данных проводили с помощью системы видеонаблюдения «Any-Maze» («Stoelting Inc.») с программным обеспечением.

Иммуногистохимический анализ

Для морфологической оценки состояния трансплантата животных выводили из эксперимента через 2 и 4 нед, 3 и 6 мес после введения клеток. Животных декапитировали гильотиной, мозг извлекали и фиксировали 24 ч в 10% формалине. Фронтальные срезы толщиной 10 мкм готовили с помощью криостата «Tissue Tek Sakura». Перед нанесением антител срезы нагревали в пароварке в течение 15 мин в цитратном буфере при pH 6,0, после остывания промывали фосфатным солевым буфером (0,01 М, pH 7,2) и инкубировали с первичными антителами кролика или мыши (таблица) во влажной камере в течение 18 ч при комнатной температуре. Для выявления связывания первичных антител использовали антитела козы или осла против иммуноглобулинов кролика или мыши, меченные флуорохромами «Atto 488» или «Atto 555» («Invitrogen»). Срезы докрашивали DAPI.

Морфометрия

Для исследования использовали флуоресцентные микроскопы «Nikon Eclipse Ni-u» или «Nikon SMZ-18». Оценивали число клеток в интересующей области или интенсивность флуоресцентного мечения при увеличении объектива $\times 20$ не менее чем на 5 срезах от одного животного, взятых в области трансплантата с шагом не менее 50 мкм. Данные, полученные от каждого животного, усредняли, для сравнения групп применяли дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным тестом Тьюки, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистическую обработку проводили в программе «GraphPad Prism 7.0».

Результаты и обсуждение

В дорсальной области стриатума на стороне трансплантации и введения нейротоксина 6-OHDA у всех животных обнаруживали резкое снижение окрашивания на TH, свидетельствующее о повреждении чёрной субстанции. Введение 6-OHDA приводило к развитию паркинсонического синдрома, проявляющегося, в частности, в статистически

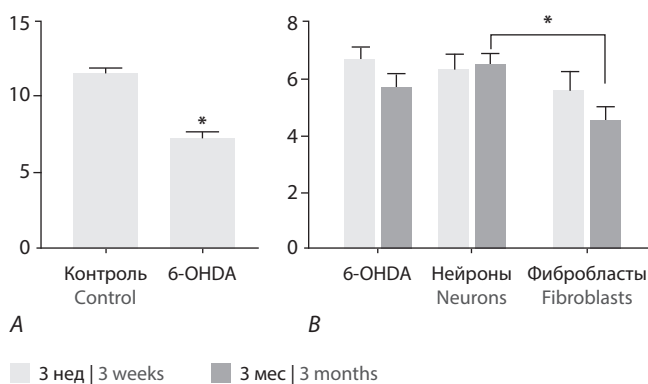


Рис. 1. Оценка двигательной активности крыс в тесте ОП после интранигрального введения 6-OHDA (A) и через 3 нед и 3 мес после трансплантации (B).
* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Fig. 1. Assessment of rats' locomotor activity in an open field test following intranigral injection of 6-OHDA (A) and 3 weeks and 3 months posttransplant (B).
* $p < 0.05$ compared to the control group.

значимом ($p = 0,000001$) снижении двигательной активности животных (рис. 1). Тестирование в ОП проводили перед процедурой нейротрансплантации (рис. 1, A), а также спустя 3 нед и 3 мес (рис. 1, B).

Введение клеточных суспензий существенно не изменило двигательную активность крыс, величина пройденной дистанции сохранялась на исходном уровне (рис. 1). Единственно, тест, проведённый через 3 мес после трансплантации, выявил достоверно меньшую двигательную активность в группе крыс с введением фибробластов ($p = 0,0486$) по сравнению с группой, получавшей нейрональные предшественники.

Важно отметить, что продолжительность настоящей исследовательской работы составляла более 6 мес, в том числе 20 нед проводилось наблюдение за животными с аллотрансплантатом. Все экспериментальные животные данной группы хорошо перенесли хирургические процедуры и в течение всего срока находились в удовлетворительном состоянии. Регулярные ежедневные осмотры ветеринарным врачом не выявили у этих крыс изменений физиологических отправлений, наличия порфириновых выделений из глаз и носа, поредения шерстного покрова. Проведённые после декапитации вскрытия тел животных не выявили новообразований.

Морфологическое исследование проводили в группе животных после трансплантации нейрональных предшественников. Для выявления клеток трансплантата были выбраны видоспецифичные антитела к HNA, МТС и NSE человека. Каждый из этих маркеров имеет свои преимущества. Ядерный белок HNA хорошо сочетается при окрашивании с цитоплазматическими и цитоскелетными белками, служащими для типирования трансплантированных клеток. Выявление митохондрий человека (МТС) подходит для оценки миграции и распределения клеток. Окрашивание на NSE позволяет оценить созревание нейронов и выявлять их отростки.

После трансплантации HNA-позитивные клетки располагались плотным тяжем по ходу иглы (рис. 2). Миграции кле-

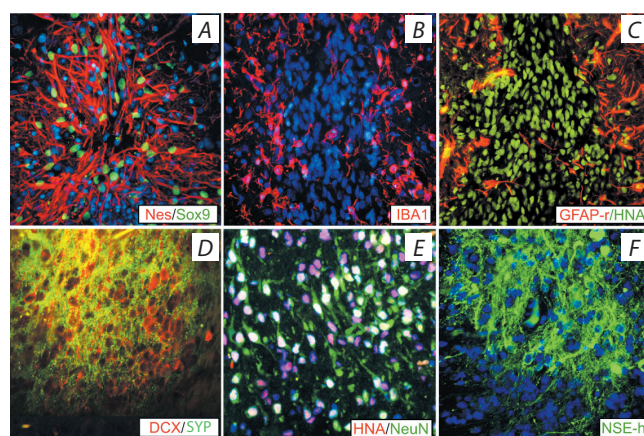


Рис. 2. Выявление ключевых маркерных белков на разных сроках после трансплантации, $\times 20$.

A — выявление ранних маркеров нейрональных предшественников Nes и Sox9 в трансплантате (2 нед);
B — активация микроглии (IBA1⁺), окружающей клетки трансплантата (2 нед);
C — астроциты (GFAP⁺), формирующие глиальный вал вокруг трансплантата (2 нед);
D — выявление в трансплантате наряду с SYP маркера нейрональных предшественников DCX (4 нед);
E — выявление зрелых нейронов (NeuN⁺) в трансплантате (12 нед);
F — прорастание отростков трансплантированных клеток (NSE⁺) в стриатум крысы (12 нед).

Fig. 2. Detection of key protein markers at different posttransplant periods, $\times 20$.

A — detection of Nes and Sox9, early neural progenitor markers, in the graft (at 2 weeks);
B — activation of microglia (IBA1⁺) surrounding the graft cells (at 2 weeks);
C — astrocytes (GFAP⁺) forming a glial scar around the graft (at 2 weeks);
D — detection of SYP and DCX, a neural progenitor marker (at 4 weeks);
E — detection of mature neurons (NeuN⁺) in the graft (at 12 weeks);
F — growth of transplanted cells' projections (NSE⁺) into a rat's striatum (at 12 weeks).

ток за пределы трансплантата на сроках до 3 мес не выявляли, за исключением единичных эктопических нейронов, а к 6-му месяцу обнаруживали HNA-позитивные астроциты за пределами области трансплантации в стриатуме и мозолистом теле. Средняя плотность HNA-позитивных клеток в поле зрения в области введения значимо снижалась (ANOVA $F(2,9) = 10,35$; $p = 0,0046$) в трансплантате к 3-му месяцу (рис. 3). Снижение плотности клеток в трансплантате было связано как с частичной гибелью транспланти-

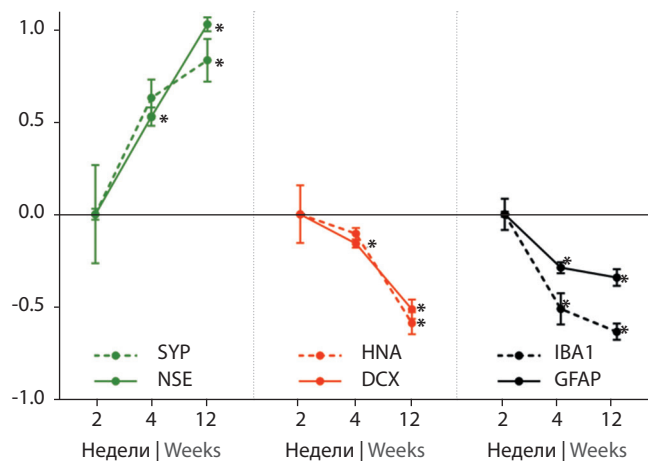


Рис. 3. Количественная оценка морфологических изменений в трансплантате через 2–12 нед после введения клеток (изменения интенсивности окрашивания на основные маркерные белки). Данные представлены в виде \log_2 от кратности изменений (1 по оси ординат — увеличение вдвое). * $p < 0,05$ по сравнению с 2 нед после трансплантации.

Fig. 3. Quantitative analysis of morphological changes in the graft 2–12 weeks posttransplant (changes in staining intensity of key protein markers). Results are expressed as \log_2 of the fold change (y-axis '1 equals a 2-fold increase). * $p < 0.05$ compared to 2 weeks posttransplant.

рованных нейронов, так и с наблюдавшимся увеличением их размеров и разрежением внутренней зоны трансплантата. Через 6 мес после трансплантации плотность HNA-позитивных клеток относительно 3-го месяца не снижалась (составила в среднем $16,72 \pm 5,25$ на $0,01 \text{ мм}^2$).

Через 2 нед в области трансплантата отмечалась выраженная активация микроглии и астроцитов. На ранних сроках после трансплантации область введения клеток была окружена глиальным валом, сформированным IBA1-позитивными клетками активированной микроглии и реактивными астроцитами крысы (рис. 2). Однако реакция микроглии (по интенсивности окрашивания на IBA1) значимо снижалась уже к 4-й неделе (ANOVA $F(2,9) = 36,81$; $p < 0,0001$), а к 3-му месяцу в области трансплантата отмечали значимое (ANOVA $F(2,9) = 10,4$; $p = 0,0051$) снижение интенсивности окрашивания на GFAP (рис. 3). К 3 мес астроциты формировали отчётливую границу между трансплантатом и структурами стриатума, причём глиальный вал к этому сроку содержал смешанную популяцию астроцитов человека и крысы (рис. 4). Массивного прорастания отростков окружающей астроглии в область трансплантата не отмечали, а инфильтрация трансплантата макрофагами снизилась. В контрольной группе при введении физиологического раствора, как и в стриатуме противоположного полушария оперированных крыс (на стороне введения 0,9% NaCl), наблюдали сходную с наблюдавшейся в области трансплантата динамику изменения микроглии, что говорит о ведущей роли в активации микроглии механической травмы при операции. Что касается экспрессии GFAP и реактивных изменений астроглии, то она была более выражена на поздних сроках в большей степени на стороне трансплантации, по сравнению с контролем, в том числе за счёт включения человеческих астроцитов в сформированный вокруг трансплантата глиальный вал. Более подробно глиальные изменения описаны нами ранее [17].

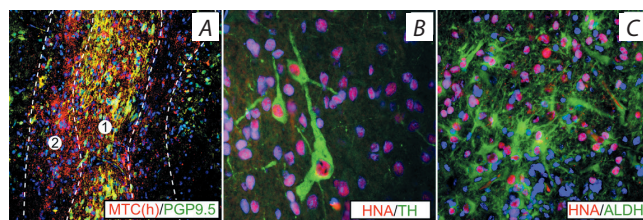


Рис. 4. Трансплантат через 6 мес после введения клеток.

A — локализация зрелых нейронов ($\text{PGP}^+/\text{MTC}^+$) в центральной зоне трансплантата (1) и выявление глиальных клеток человека ($\text{PGP}^-/\text{MTC}^+$) в периферической зоне (2), $\times 10$; *B* — нейроны человека, содержащие тирозингидроксилазу, в трансплантате (TH^+/HNA^+), $\times 40$; *C* — зрелая астроглия человека в трансплантате ($\text{ALDH}^+/\text{HNA}^+$), $\times 20$.

Fig. 4. Graft 6 months posttransplant.

A — mature neurons ($\text{PGP}^+/\text{MTC}^+$) in the graft's center (1) and human glial cells ($\text{PGP}^-/\text{MTC}^+$) in the peripheral area (2), $\times 10$; *B* — human tyrosine hydroxylase-containing neurons in the graft (TH^+/HNA^+), $\times 40$; *C* — mature human astroglia in the graft ($\text{ALDH}^+/\text{HNA}^+$), $\times 20$.

На ранних сроках (2, 4 нед) в трансплантате выявляли клетки, содержащие DCX и Nes. Отмечали высокую плотность Sox9-позитивных клеток (рис. 2). К 3-му месяцу интенсивность окрашивания на DCX в трансплантате значимо (ANOVA $F(2,9) = 57,68$; $p < 0,0001$) снижалась (рис. 3). Следует принимать во внимание, что Nes, а по некоторым данным и DCX, традиционно используемые как маркеры клеток нейрогенной ниши, могут экспрессироваться активированными астроцитами в патологических условиях — при воспалении или ишемии [19, 20]. Транскрипционный фактор Sox9 экспрессировался и за пределами трансплантата, что согласуется с данными литературы о его экспрессии не только в клетках нейрогенной ниши, но и в зрелых астроцитах [21]. В свою очередь клетки, имеющие нейрогенный потенциал, могут экспрессировать традиционные астроцитарные маркеры GFAP и ALDH1L1 . Таким образом, для оценки судьбы трансплантированных клеток необходимо долгосрочное исследование трансплантата, поскольку изменения экспрессии белков нейрональных предшественников на ранних сроках могут отражать провоспалительные изменения.

По мере созревания нейронов возрастала (ANOVA $F(2,9) = 164,3$; $p < 0,0001$) экспрессия NSE (рис. 2, 3). Начиная с 4-й недели после трансплантации отростки нейронов трансплантата были, как правило, ориентированы вдоль трека иглы. Отмечали увеличение размеров трансплантированных нейронов, и к 3-му и 6-му месяцам в мозолистом теле обнаруживали длинные NSE-позитивные отростки, направленные латерально, по ходу волокон мозолистого тела. Хотя NSE служит маркером развития нейронов трансплантата, следует учесть, что в отдельных работах показана её экспрессия [22] в олигодендроглии и глиальных новообразованиях, что требует сочетания с другими маркерами. Созревание нейронов сопровождалось увеличением экспрессии SYP, белка синаптического везикул, связанного с формированием синапсов и синаптической активностью нейронов [23]. На 2-й неделе после трансплантации окрашивание на SYP в трансплантате практически отсутствовало, но уже к 4 нед значимо возросло и продолжало увеличиваться (ANOVA $F(2,9) = 6,03$; $p < 0,022$) до 3-го месяца после трансплантации (рис. 2, 3), что может отражать как созревание нейронов трансплантата, так и вероятное формирование их контактов с нейронами стриатума крысы.

На материале, полученном через 3 и 6 мес после трансплантации, оценивали локализацию некоторых белков зрелых нейронов — PGP 9.5, NeuN и маркера дофаминовых нейронов — TH (рис. 2, 4). Как NeuN, так и PGP 9.5 выявляли в большинстве клеток трансплантата, причём окрашивание на PGP 9.5 было более интенсивным, чем в нейронах стриатума крысы. Часть клеток не экспрессировала нейрональных маркеров даже на поздних сроках после трансплантации. На поздних сроках (3 и 6 мес) глиальный вал вокруг трансплантата становился более разреженным, и к 3 мес HNA-позитивные, содержащие ALDH1L1 астроциты человека формировали периферическую область трансплантата (рис. 4), а к 6 мес обнаруживались и за его пределами.

Уже к 3-му месяцу в трансплантате обнаруживали TH-позитивные (ДА) нейроны с развитыми отростками, имевшие крупное ядро и сому, часто расположенные группами. Доля TH-позитивных нейронов в трансплантате в среднем составила $3,0 \pm 1,5\%$ к 6-му месяцу. Стоит отметить, что уровень экспрессии TH может сильно варьировать в зависимости от функционального состояния нейронов [24], и, вероятно, по мере формирования связей между трансплантатом и нейронами стриатума крысы может наблюдаться рост числа выявляемых ДА-нейронов, содержащих тирозингидроксилазу.

Заключение

Проведённая работа показала, что, хотя после трансплантации плотность нейронов в трансплантате снижалась, на-

ряду с этим происходило их созревание и развитие нейритов. Острая глиальная реакция в ответ на трансплантацию снижалась уже к четвертой неделе. Трансплантированные нейроны до 6 мес оставались в области введения и направляли свои отростки преимущественно по ходу трека иглы. Помимо этого, трансплантированные клетки дали начало популяции астроцитов, которые участвовали в формировании окружения нейронов. Снижение окрашивания на DCX и Nes, увеличение экспрессии маркерных белков зрелых нейронов (NSE, NeuN, PGP9.5) отражало функциональное созревание нейронов трансплантата, выявленное в нашем эксперименте к 3-му месяцу. Через 3 и 6 мес отмечали зональную структуру трансплантата, центральная часть которого содержала нейроны, а периферическая — преимущественно астроциты человека. Рост отростков трансплантированных нейронов в основном происходил по ходу мозолистого тела, однако на небольшие расстояния они проникали и в окружающую ткань стриатума.

Следует отметить, что выявленные в настоящей работе степени функционального развития нейронов трансплантата оказались недостаточными для появления отчётливого улучшения поведенческих показателей у крыс-биомоделей.

Установленные в работе морфологические особенности трансплантата на разных сроках позволяют глубже понять патофизиологию и временные закономерности интеграции новых дофаминергических нейронов и реиннервации стриатума у крыс с моделью БП в отдалённом послеоперационном периоде.

Список источников / References

- Lebedeva O.S., Lagarkova M.A. Pluripotent stem cells for modelling and cell therapy of Parkinson's disease. *Biochemistry (Moscow)*. 2018;83(9):1046–1056. doi: 10.1134/S0006297918090067
- Penney J., Ralvenius W.T., Tsai L.-H. Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Mol. Psychiatry*. 2020;25(1):148–167. doi: 10.1038/s41380-019-0468-3
- Schweitzer J.S., Song B., Herrington T.M. et al. Personalized iPSC-derived dopamine progenitor cells for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(20):1926–1932. doi: 10.1056/NEJMoa1915872
- Wu R., Luo S., Yang H., Transplantation of neural progenitor cells generated from human urine epithelial cell-derived induced pluripotent stem cells improves neurological functions in rats with stroke. *Dis. Med.* 2020;29(156):53–64.
- Ghosh B., Zhang C., Ziemba K.S. et al. Partial reconstruction of the nigrostriatal circuit along a preformed molecular guidance pathway. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019; 14:217–227. doi: 10.1016/j.omtm.2019.06.008
- Kriks S., Shim J.-W., Piao J. et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*. 2011;480(7378):547–551. doi: 10.1038/nature10648
- Arenas E., Denham M., Villaescusa J.C. How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development*. 2015;142(11):1918–1936. doi: 10.1242/dev.097394
- Engel M., Do-Ha D., Muñoz S.S., Ooi L. Common pitfalls of stem cell differentiation: a guide to improving protocols for neurodegenerative disease models and research. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016;73(19):3693–3709. doi: 10.1007/s00018-016-2265-3
- Antonov S.A., Novosadova E.V., Kobylyansky A.G. et al. Expression and functional properties of NMDA and GABA receptors during differentiation of human induced pluripotent stem cells into ventral mesencephalic neurons. *Biochemistry (Moscow)*. 2019;84(3):310–320. doi: 10.1134/S0006297919030131
- Sefiani A., Geoffroy C.G. The potential role of inflammation in modulating endogenous hippocampal neurogenesis after spinal cord injury. *Front. Neurosci.* 2021;15:682259. doi: 10.3389/fnins.2021.682259
- Tomov N., Surchev L., Wiedenmann C. et al. Astroglial dynamics after cell transplantation and mechanical impact in the rodent model of Parkinson's disease. *Balkan Med. J.* 2018;35(2):141–147. doi: 10.4274/balkanmedj.2016.1911
- Llorens-Bobadilla E., Zhao S., Baser A. et al. Single-cell transcriptomics reveals a population of dormant neural stem cells that become activated upon brain injury. *Cell Stem Cell*. 2015;17(3):329–340. doi: 10.1016/j.stem.2015.07.002
- Johann V., Schiefer J., Sass C. et al. Time of transplantation and cell preparation determine neural stem cell survival in a mouse model of Huntington's disease. *Exp. Brain Res.* 2007;177(4):458–470. doi: 10.1007/s00221-006-0689-y
- Tom C.M., Younesi S., Meer E. et al. Survival of iPSC-derived grafts within the striatum of immunodeficient mice: Importance of developmental stage of both transplant and host recipient. *Exp. Neurol.* 2017;297:118–128. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.07.018
- Kopach O. Monitoring maturation of neural stem cell grafts within a host microenvironment. *World J. Stem Cells*. 2019;11(11):982–989. doi: 10.4252/wjsc.v11.i11.982
- Holmqvist S., Lehtonen S., Chumarina M. et al. Creation of a library of induced pluripotent stem cells from Parkinsonian patients. *NPJ Parkinson Dis.* 2016;2(1):16009. doi: 10.1038/npparkd.2016.9
- Voronkov D.N., Stavrovskaya A.V., Guschina A.S. et al. Morphological characterization of astrocytes in a xenograft of human iPSC-derived neural precursor cells. *Acta Naturae*. 2022;14(3):100–108. doi: 10.32607/actanaturae.11710
- Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. San Diego; 2007.
- Krishnasamy S., Weng Y.C., Thamisetty S.S. et al. Molecular imaging of nestin in neuroinflammatory conditions reveals marked signal induction in activated microglia. *J. Neuroinflammation*. 2017;14(1):45. doi: 10.1186/s12974-017-0816-7
- Verwer R.W., Sluiter A.A., Balesar R.A. et al. Mature astrocytes in the adult human neocortex express the early neuronal marker doublecortin. *Brain*. 2007;130(12):3321–3335. doi: 10.1093/brain/awm264
- Sun W., Cornwell A., Li J. et al. SOX9 is an astrocyte-specific nuclear marker in the adult brain outside the neurogenic regions. *J. Neurosci.* 2017;37(17):4493–4507. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3199-16.2017
- Sensenbrenner M., Lucas M., Deloume J.-C. Expression of two neuronal markers, growth-associated protein 43 and neuron-specific enolase, in rat glial cells. *J. Mol. Med.* 1997;75(9):653–663. doi: 10.1007/s001090050149
- Harrill J.A., Chen H., Streifel K.M. et al. Ontogeny of biochemical, morphological and functional parameters of synaptogenesis in primary cultures of rat hippocampal and cortical neurons. *Mol. Brain*. 2015;8(1):10. doi: 10.1186/s13041-015-0099-9
- White R.B., Thomas M.G. Moving beyond tyrosine hydroxylase to define dopaminergic neurons for use in cell replacement therapies for Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 2012;11(4):340–349. doi: 10.2174/187152712800792758

Информация об авторах

Воронков Дмитрий Николаевич — к.б.н., с.н.с. лаб. нейроморфологии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Ставровская Алла Вадимовна — к.б.н., в.н.с. лаб. экспериментальной патологии нервной системы ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8689-0934>

Лебедева Ольга Сергеевна — с.н.с. лаб. клеточной биологии ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0767-5265>

Ли Вен — PhD, профессор, Институт наук о здоровье, Китайский медицинский университет, Шеньян, КНР, <https://orcid.org/0000-0002-0383-0240>

Ольшанский Артем Сергеевич — с.н.с. лаб. экспериментальной патологии нервной системы ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5696-8032>

Гущина Анастасия Сергеевна — н.с. лаб. экспериментальной патологии нервной системы ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3026-0279>

Капкаева Марина Рафаиловна — м.н.с. лаб. нейробиологии и тканевой инженерии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2833-2897>

Богомазова Александра Никитична — зав. лаб. клеточной биологии ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1549-1984>

Лагарькова Мария Андреевна — д.б.н., чл.-корр. РАН, ген. директор ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9594-1134>

Иллариошкин Сергей Николаевич — д.м.н., академик РАН, зам. директора по научной работе ФГБНУ НЦН, директор Института мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2704-6282>

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Information about the authors

Dmitry N. Voronkov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of neuromorphology, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Alla V. Stavrovskaya — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of experimental pathology of the nervous system, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8689-0934>

Olga S. Lebedeva — senior researcher, Laboratory of cell biology, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical & Chemical Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0767-5265>

Wen Li — PhD, Professor, Institute of Health Sciences, Chinese Medical University, Shenyang, China, <https://orcid.org/0000-0002-0383-0240>

Artem S. Olshansky — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of experimental pathology of the nervous system, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5696-8032>

Anastasia S. Gushchina — researcher, Laboratory of experimental pathology of the nervous system, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3026-0279>

Marina R. Kapkaeva — junior researcher, Laboratory of neurobiology and tissue engineering, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2833-2897>

Alexandra N. Bogomazova — Head, Laboratory of cell biology, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1549-1984>

Maria A. Lagarkova — D. Sci. (Biol.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9594-1134>

Sergey N. Illarioshkin — D. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director, Head, Brain Research Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2704-6282>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.