

УДК 616.8-091.8:602.9

# Морфологическая характеристика астроцитов в ксенотрансплантате нейрональных предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

Д. Н. Воронков<sup>1\*</sup>, А. В. Ставровская<sup>1</sup>, А. С. Гущина<sup>1</sup>, А. С. Ольшанский<sup>1</sup>, О. С. Лебедева<sup>2</sup>,  
А. В. Еремеев<sup>2</sup>, М. А. Лагарькова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Научный центр неврологии, Москва, 125367 Россия

<sup>2</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА РФ, Москва, 119435 Россия

\*E-mail: voronkov@neurology.ru

Поступила в редакцию 28.03.2022

Принята к печати 22.08.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11710

**РЕФЕРАТ** Трансплантация смешанной астроцитарной и нейрональной культуры представляет интерес для разработки методов клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний. Вместе с тем, для оценки развития трансплантата необходима подробная морфологическая характеристика, включающая анализ нейрональных и глиальных популяций. В проведенном эксперименте трансплантированные нейрональные предшественники, полученные из ИПСК человека, к шестому месяцу после трансплантации в стриатум крысы давали *in vivo* смешанную популяцию нейронов и астроцитов. Ксенотрансплантированные астроциты по морфологическим характеристикам и нейрохимическому профилю были сходны с зрелой астроглией человека. В отличие от нейронов, астроциты мигрировали в окружающие структуры, причем плотность и характер их распределения в стриатуме и коре головного мозга различались, что свидетельствует о влиянии микроокружения на интеграцию глии человека. В трансплантате выявляли зональные особенности морфологии глиальных клеток, отражающие их созревание в центральной зоне, формирование глиального вала вокруг трансплантированных нейронов и миграцию в окружающие структуры.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ИПСК, нейрональные предшественники, трансплантация, стриатум, астроциты.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; PBS – фосфатно-солевой буфер; 6-OHDA – 6-гидроксидофамин.

## ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация экспериментальным животным нейронов и астроцитов, полученных из ИПСК человека, помимо разработки методов клеточной терапии, активно используется для изучения патогенеза нейродегенеративных заболеваний и разных аспектов межклеточных взаимодействий [1, 2].

Для направленной дифференцировки нейральных стволовых клеток, полученных из ИПСК человека, в нейроны с заданным фенотипом, в том числе в дофаминергические нейроны среднего мозга, разработано большое количество протоколов с разной степенью эффективности [3–8]. Вариации во вре-

мени воздействия, различные сочетания и соотношение факторов значительно влияют на эффективность дифференцировки и процент получаемых дофаминовых нейронов [8, 9]. Причем эффективно трансплантировать в мозг лабораторных животных можно только клетки на стадии нейрональных предшественников, поскольку зрелые нейроны легко повреждаются. Вместе с тем, ранние нейральные предшественники еще не коммитированы в необходимый тип нейронов, их дифференцировка плохо предсказуема, возможна также неконтролируемая пролиферация трансплантата. Кроме того, дифференцировка даже гомогенных клонов в области

трансплантации зависит от микроокружения хозяина [10]. Все это обуславливает необходимость контроля дифференцировки нейронов, полученных из ИПСК, и морфологического анализа пролиферации и миграции клеток трансплантата.

Трансплантация смешанной астроцитарной и нейрональной культуры (co-grafting) представляет значительный интерес, так как в ряде работ показана лучшая приживаемость трансплантата и увеличение терапевтического эффекта при таком подходе [11, 12]. Астроциты необходимы для формирования окружения (scaffold) трансплантированных клеток, они способствуют росту их нейритов, участвуют в синаптогенезе и энергетическом обеспечении трансплантата [13]. Помимо этого, опубликованы данные о положительном эффекте трансплантации монокультуры астроцитов на моделях нейродегенеративных заболеваний, что обусловлено, по-видимому, действием ростовых факторов, продуцируемых астроглией [13–16].

В настоящем исследовании использованы культуры нейрональных предшественников, полученные в лаборатории клеточной биологии ФКНЦ физико-химической медицины ФМБА. Трансплантация животным была проведена в рамках серии экспериментов по трансплантации коммитированных в дофаминергические нейроны нейрональных предшественников при моделировании болезни Паркинсона.

Целью настоящей работы была морфологическая характеристика и оценка миграции глиальных клеток, присутствовавших в культуре нейрональных предшественников, полученных из ИПСК человека на длительном сроке (6 месяцев), после их трансплантации в мозг крыс.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Получение клеточных культур

Нейрональная культура для трансплантации была дифференцирована из ИПСК здорового донора (без неврологических патологий), полученных из фибробластов кожи донора мужского пола (возраст 60 лет), после подписания донором информированного согласия. Используемая линия ИПСК IPSRG4S имела нормальный кариотип и была ранее охарактеризована согласно общепринятым стандартам [17].

### Дифференцировка ИПСК

ИПСК снимали с подложки раствором трипсина и высевали в плотности 40000 клеток/см<sup>2</sup> в среде mTeSR1 в присутствии 5 мкМ ингибитора ROCK. По достижении плотности около 80–90% среду

mTeSR1 заменяли средой для нейрональной дифференцировки (14 дней, смена среды через день). Образовавшиеся нейрональные предшественники снимали с подложки раствором Версена, инкубируя клетки 10 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C. Центрифугировали в течение 5 мин при 240 g. Клетки рассеивали (из расчета 4 × 10<sup>5</sup> клеток/см<sup>2</sup>) на чашки Петри, покрытые матригелем, и культивировали в течение 10 дней в среде для культивирования нейрональных предшественников (смена среды через день). Через 10 дней клетки пересевали (4 × 10<sup>5</sup> клеток/см<sup>2</sup>) и продолжали культивировать в той же среде. На втором пассаже клетки снимали с подложки 0.01% раствором трипсина, который инактивировали средой DMEM с 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Клетки в суспензии подсчитывали, промывали физиологическим раствором (центрифугировали 5 мин при 240 g), ресуспендировали в физиологическом растворе до концентрации 0.35 × 10<sup>6</sup> клеток в 10 мкл и использовали для трансплантации. Выбранная для трансплантации в стриатум крыс доза клеток согласуется с опубликованной ранее [3]. Среда для нейрональной дифференцировки ИПСК: DMEM/F12, 2% заменителя сыворотки, 1% добавки N2, 21-мМ глутамин, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина, 10-мкМ SB431542, 2-мкМ дорсоморфин, 0.5-мкМ LDN-193189. Среда для культивирования нейрональных предшественников: DMEM/F12 1 : 1 Neurobasal, 2% B27-добавка, 2-мМ глутамин, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина, 100 нг/мл Shh, 100 нг/мл FGF8 и 2 мкМ пурморфамин.

### Животные и стереотаксические операции

Для анестезии применяли золетил-100 в дозе 30 мг/кг массы тела 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. В работе использованы 6 самцов крыс Вистар (3.5 месяца, массой тела 300–350 г), полученных из питомника «Столбовая». До введения суспензии клеток крысы получали односторонние стереотаксические интранигральные инъекции 12 мкг 6-OHDA в 3 мкл 0.05% раствора аскорбиновой кислоты в соответствии с координатами атласа мозга крысы Paxinos (AP = -4.8; L = 2.2; V = 8.0) для моделирования паркинсонического синдрома. Через 21 день после введения 6-OHDA в стриатум (AP = -0.9; L = 2.5; V = 5.5) на стороне повреждения дофаминергических окончаний вводили суспензию 0.35 × 10<sup>6</sup> клеток в 10 мкл физиологического раствора. Суспензию набирали в 10-мкл микрошприц Гамильтона с иглой ga26S/51mm и вводили с постоянной скоростью в течение 7 мин (около

Таблица 1. Использованные антитела

Аббревиатура	Белок, название, синонимы	Специфичность*	Локализация
GFAP	Кислый глиофибрилярный белок	Hm, Rt	Астроциты
AQP4	Аквапорин-4	Hm, Rt	Концевые ножки астроцитов
ALDH1L1	10-формилтетрагидрофолатдегидрогеназа	Hm, Rt	Астроциты
Vim	Виментин	Hm, Rt	Незрелые астроциты, активированная астроглия
PGP 9.5	Убиквитингидролаза-1 карбокси-терминальная	Hm, Rt	Нейроны
IBA1	Воспалительный фактор аллогraftа (AIF1)	Hm, Rt	Микроглия
C3	Компонент C3 комплемента	Hm, Rt	Глия, нейроны
Ki67	Маркер пролиферации (MKI-67)	Hm, Rt	Делящиеся клетки
GS-r	Глутаминсинтетаза	Rt	Астроциты, олигодендроглия
MHC-I	Главный комплекс гистосовместимости, класс I	Hm	Клетки человека
MTC-h	Маркер наружной мембраны митохондрий 80 кДа, MTC02	Hm	Клетки человека
HNA	Ядерный антиген человека	Hm	Клетки человека

\*Hm – человек, Rt – крыса.

1.5 мкл/мин). После инъекции иглу оставляли в месте введения на 1 мин, затем медленно извлекали. В противоположное хвостатое ядро вводили тот же объем физиологического раствора. За один день до операции по трансплантации клеток и далее ежедневно в течение всего эксперимента животные получали циклоспорин в дозе 15 мг/кг.

### Иммуногистохимия

Для иммуноморфологической оценки трансплантата животных выводили из эксперимента через 6 месяцев после введения клеток. Мозг извлекали и фиксировали в течение 24 ч в 10% формалине. Образцы пропитывали сахарозой и замораживали в среде О.С.Т. Фронтальные срезы толщиной 10 мкм готовили с помощью криостата Tissue Tek Sakura. Перед нанесением антител срезы нагревали в пароварке (15 мин, цитратный буфер, pH 6.0). Остывшие срезы промывали буфером (PBS, 0.01 M, pH 7.2) и инкубировали с первичными антителами во влажной камере в течение 18 ч при комнатной температуре (табл. 1).

Для подтверждения дифференцировки нейронов в трансплантате также использовали антитела к нейрональной енолазе человека (NSE, Leica) и тирозингидроксилазе (TH, Sigma, США, T8700). Культуру клеток окрашивали на бета-3-тубулин (антитела к TUJ1, Nordic Biosite, Швеция) для выявления нейрональных предшественников.

Проверку специфичности антител и оценку морфологии астроцитов среднего мозга проводили на аутопсийных образцах среднего мозга ( $n = 4$ , возраст от 52 до 82 лет) без неврологической патологии в анамнезе, полученных из архива лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Связывание антител на срезах выявляли флуоресцентным и пероксидазным методом. Для иммунофлуоресцентного метода использовали антитела козы или осла против иммуноглобулинов кролика или мыши, меченные флуорохромами Atto 488 или Atto 555 (Invitrogen, США). Срезы заключали в среду Fluoroshield с DAPI. Для иммунопероксидазного метода использовали набор AntiMouse-HRP-Detection System (Nordic Biosite).

### Морфометрия

Для исследования использовали флуоресцентные микроскопы Nikon Eclipse Ni-u или Nikon SMZ-18 с соответствующим набором фильтров. Морфометрию проводили в программе ImageJ. Использовали 6–12 серийных срезов в области трансплантата от каждого животного, взятых с интервалом 70–100 мкм. Для подсчета клеток брали не менее 5 полей зрения на срез в области интереса. Размеры астроцитов оценивали не менее чем на 50 клетках от каждого образца. Для подсчета плотности астроцитов клетки выделяли на изображении вручную, их число подсчитывали в поле зрения микроскопа (48000 мкм<sup>2</sup>). Для анализа распределения отмечали все глиальные клетки на изображениях срезов, после чего определяли средние значения по шести животным. Диаграмму пространственного распределения выводили, используя набор библиотек Plotly для языка программирования Python. Площадь, занимаемую отростками астроцитов, определяли как выпуклый многоугольник (convex hull area), построенный по точкам дистальных концов отростков. Распределение астроглии в пространстве оценивали, используя индекс агрегации

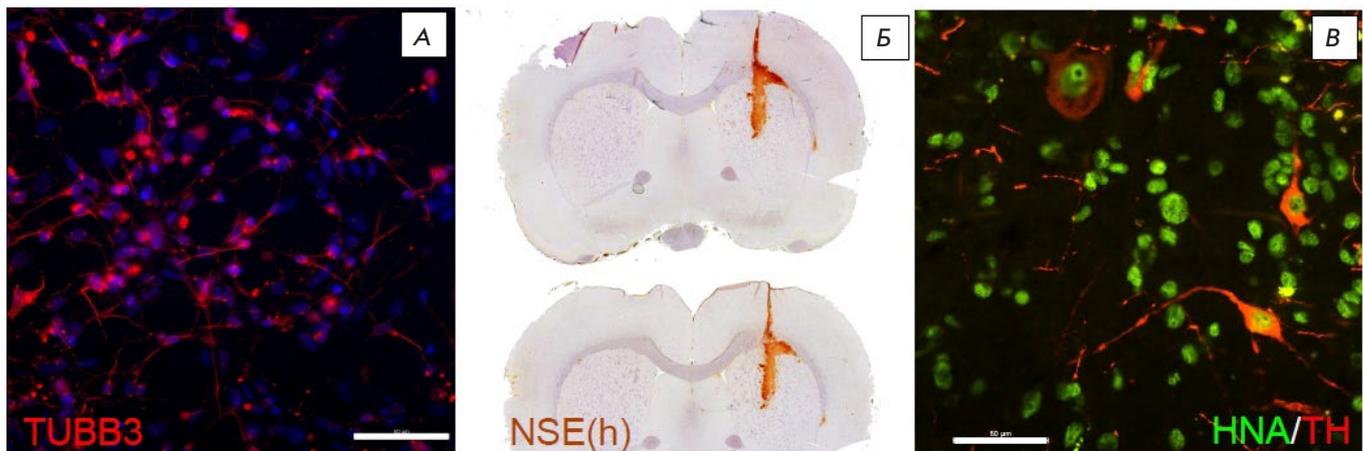


Рис. 1. Выявление нейрональных маркеров в культуре клеток и трансплантате. А – выявление бета-3-тубулина (TUBB3 красным) в культуре; Б – выявление нейрон-специфической енолазы (NSE) человека в области трансплантации (иммунопероксидазное окрашивание); В – выявление нейронов человека, содержащих тирозингидроксилазу, в трансплантате (HNA – зеленый, TH – красный). Линейка на микрофотографиях А, В – 50 мкм

Кларка–Эванса (СЕ) [18], основанный на оценке расстояния до ближайших соседних клеток таким образом, что при случайном распределении  $CE = 1$ , при кластеризации объектов  $CE < 1$  и при равномерном распределении  $CE > 1$ . Расчет индекса агрегации выполняли с использованием языка программирования R и библиотеки spatstat.

### Статистический анализ

Данные, полученные от каждого животного, усредняли. Для сравнения групп использовали дисперсионный анализ ANOVA с повторными измерениями и апостериорным тестом Тьюки, различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Статистическую обработку проводили в программе Statistica 7.0 и GraphPad Prism. Данные представлены как среднее  $\pm$  SD (среднеквадратичное отклонение).

### Биоэтика

Эксперименты проводили в соответствии с международными правилами по работе с лабораторными животными с соблюдением биоэтических норм и возможным сокращением числа использованных животных. Разрешение этического комитета на проведение эксперимента – Протокол № 10-7/20 от 27.11.2020.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

В культуре обнаруживали как клетки, позитивные на бета-3-тубулин, так и клетки, не содержащие этот белок (рис. 1А). Во всех случаях подтверждено

присутствие в трансплантате зрелых нейронов, содержащих NSE человека, и нейронов, содержащих тирозингидроксилазу (рис. 1Б,В), что свидетельствует о дифференцировке трансплантированных нейрональных предшественников в нейроны среднего мозга.

Двойное окрашивание с использованием видоспецифичных антител к митохондриальному белку MTC02(hm) позволило выявлять на срезах как тела, так и отростки не нейрональных клеток в трансплантате. Кроме того, чтобы различить клетки человека и крысы, использовали антитела к ядерному антигену человека (HNA) и видоспецифичные антитела к глутаминсинтетазе (GS-r), которые связывались с белком крысы.

Трансплантированные нейроны человека (экспрессирующие маркеры зрелых нейронов PGP 9.5, NSE, TH и имеющие HNA-позитивные ядра) выявляли на протяжении всего трека иглы в коре головного мозга, стриатуме и в области мозолистого тела. При этом в области мозолистого тела и на границе структур обнаруживали объемные скопления нейронов (рис. 1Б), что, вероятно, связано с «растеканием» при введении суспензии клеток по границам серого и белого вещества, ввиду их разной плотности. В области трансплантации выделяли три зоны (рис. 2А,Б): 1) центральная часть, содержащая плотно расположенные нейроны человека, направляющие свои отростки преимущественно по ходу иглы или по ходу нервных волокон в мозолистом теле; 2) область глиального вала, сформированная редкими нейронами и плот-

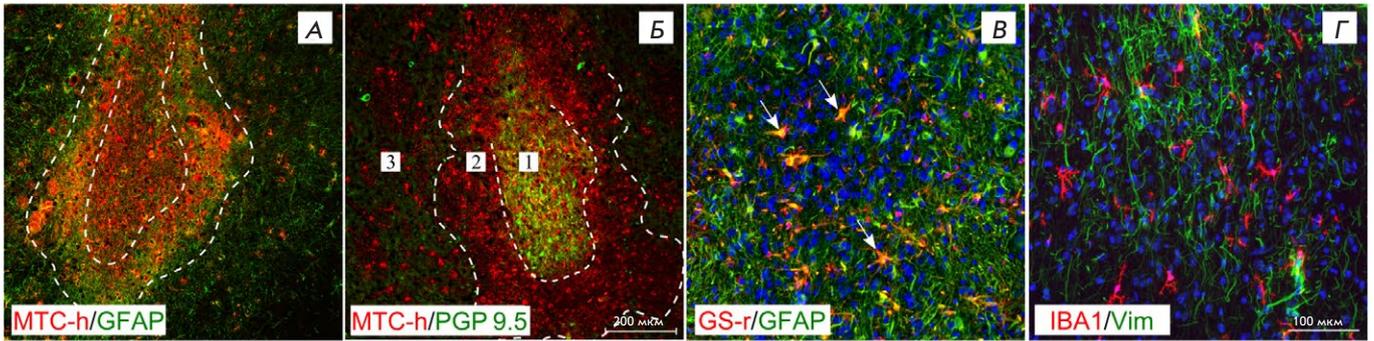


Рис. 2. Глио-нейронная организация трансплантата через 6 месяцев после операции. А – область введения клеток человека в стриатуме, выявление GFAP (зеленый) и МТС-н (красный); Б – область введения клеток человека в стриатуме, выявление PGP 9.5 (зеленый) и МТС-н (красный); В – астроциты человека (зеленый, GFAP) и крысы (оранжевый, GFAP/GS-позитивные клетки, показаны стрелками) в области трансплантации в стриатуме; Г – виментин-позитивная астроглия (зеленый) и микроглия (красный) в области трансплантации. Пунктиром на А, Б показаны границы выделенных областей: 1 – центральная зона, 2 – зона глиального рубца, 3 – периферическая зона. Линейка на микрофотографиях, общая на А, Б – 200 мкм, на В, Г – 100 мкм

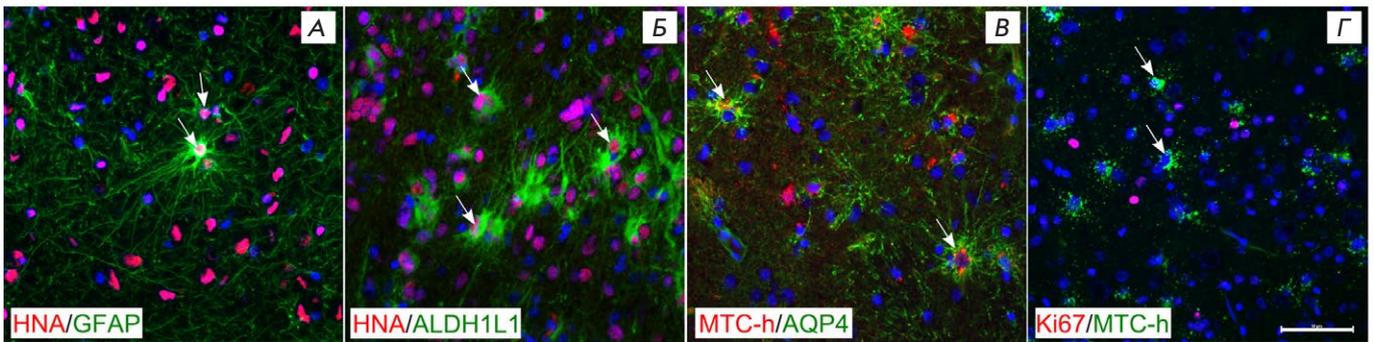


Рис. 3. Экспрессия глиальных маркеров в трансплантированных клетках. А – GFAP-содержащий астроцит в центральной зоне трансплантата; Б – ALDH1L1-содержащая астроглия в центральной зоне трансплантата; В – локализация AQP4 на отростках астроцитов человека в периферической зоне; Г – отсутствие Ki67-позитивных клеток человека в периферической зоне трансплантата. Стрелки указывают на астроциты человека. Линейка на микрофотографиях общая – 100 мкм

но расположенными астроцитами и переплетением их многочисленных отростков; 3) периферическая зона, где нейроны человека не выявляли.

В центральной зоне трансплантата и в окружающем ее астроцитарном валу обнаруживали астроциты как человека, так и крысы (рис. 2В), причем доля астроцитов человека (GFAP-позитивные, GS-r-негативные) составила  $58.7 \pm 9.9\%$  от общего их числа в поле зрения. Кроме того, в центральной зоне выявляли виментин-позитивные астроциты, причем их отростки были направлены преимущественно по ходу трека иглы (рис. 2Г). Поскольку эти клетки не обнаруживались по периферии трансплантата, мы предполагаем, что их наличие свидетельствует о продолжающейся дифференцировке пересаженных клеток даже к шестому месяцу после трансплантации. В центральной зоне выявлено и умеренное ко-

личество активированной микроглии с утолщенными отростками, и единичные макрофаги (рис. 2Г).

За пределами центральной области трансплантата выявленные клетки человека (HNA- и МТС-н-позитивные) экспрессировали маркеры зрелых астроцитов – GFAP, ALDH1L1, AQP4 (рис. 3А,Б,В).

При оценке пролиферативной активности мы не обнаружили Ki67-позитивных, GFAP-содержащих клеток (рис. 3Г). В центральной и краевой области трансплантата найдены единичные (на срез) Ki67-позитивные клетки человека (содержащие МТС-н). В целом, как нейрохимический профиль, так и морфология выявляемых астроцитов человека соответствовали функциональным зрелым астроцитам.

Астроциты человека морфологически отличались от астроцитов крысы – они имели большее количе-

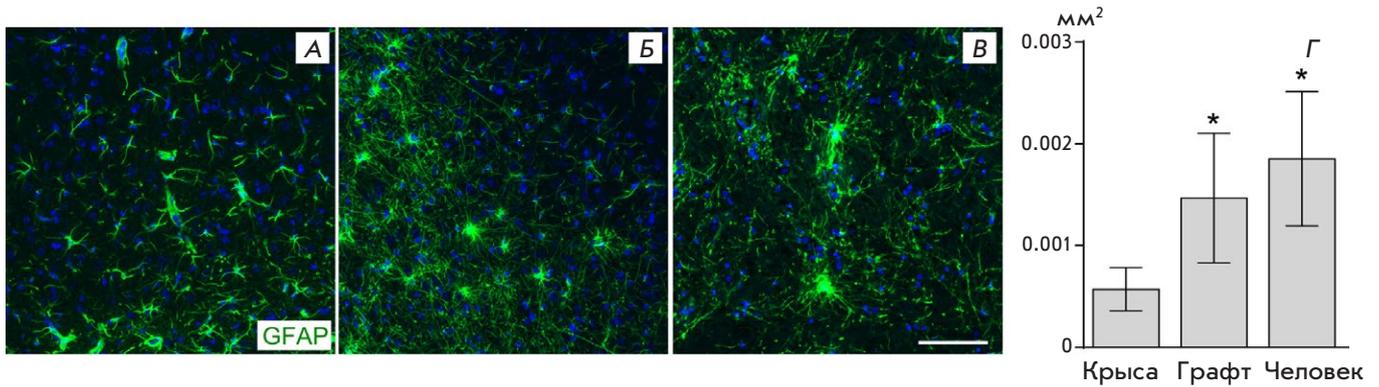


Рис. 4. Сравнение размеров и морфологии GFAP-содержащих астроцитов крысы (А), трансплантированных астроцитов (Б) и астроглии среднего мозга человека (Б) и оценка площади, занимаемой их отростками (Г). Линейка общая — 100 мкм. \*ANOVA, апостериорный тест Тьюки,  $p < 0.05$  по сравнению с астроцитами крысы

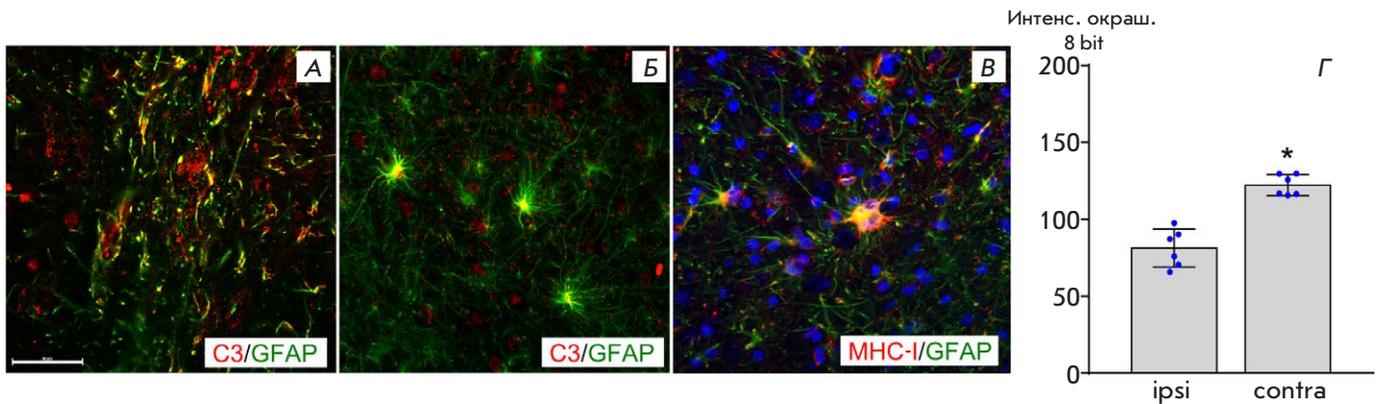
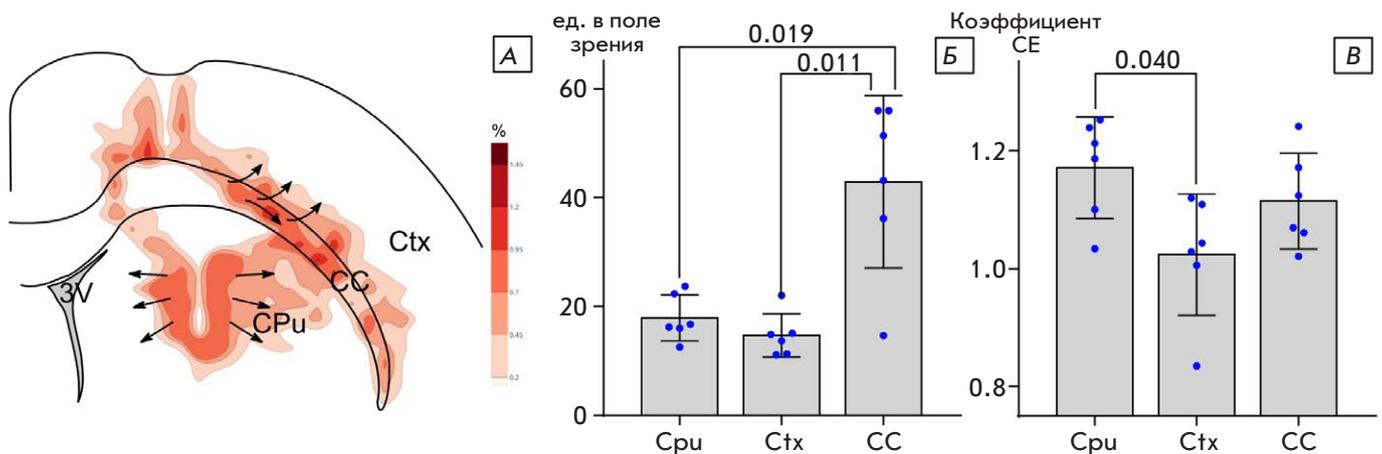


Рис. 5. Экспрессия маркеров нейровоспаления астроцитами. А – локализация С3-компонента комплемента в отростках реактивных астроцитов крысы в области введения физраствора (противоположное полушарие), GFAP – зеленый, С3 – красный; Б – локализация С3-компонента комплемента в телах трансплантированных астроцитов человека; В – окрашивание на МНС-I человека в трансплантированных астроцитах; Г – интенсивность окрашивания на С3-компонент комплемента значительно ниже в области глиального вала, окружающего трансплантат (ipsi-), по сравнению с реактивными астроцитами крысы в области введения физраствора на противоположной стороне (contra-). \* $p < 0.05$ , Т-тест Стьюдента. Линейка общая – 100 мкм

ство тонких отростков (рис. 4А,Б,В) без выраженной поляризации. Их концевые ножки часто оплетали сосуды. Морфология трансплантированных астроцитов была сходной с астроцитами человека в среднем мозге (рис. 4Г). Площадь, занимаемая отростками трансплантированных астроцитов человека (конвекс), была значительно выше, чем у астроцитов крысы, и близка по значению к астроцитам среднего мозга (в области черной субстанции) в аутопсийном мозге человека (рис. 4А,Б,В).

Для оценки выраженности реактивных изменений мы провели окрашивание на компонент С3 комплемента, которое показало, что астроциты крысы в области рубца (на стороне контралатеральной области трансплантации) имели высокую экспрессию

С3, который локализовался в утолщенных деформированных отростках. Кроме того, в области глиального вала тела астроцитов человека часто были гипертрофированы, а отростки утолщены, что свидетельствует о реактивных изменениях. Однако на расстоянии от глиального вала большинство астроцитов имело меньший размер тел и тонкие отростки. Интенсивное окрашивание на МНС-I человека наблюдали у части астроцитов (рис. 5В) в области глиального вала, что свидетельствует об их реактивных изменениях. Трансплантированные астроциты в области глиального вала часто содержали С3, однако он локализовался преимущественно в их телах (рис. 5А,Б). Оценка интенсивности флуоресценции показала, что в области реактивного



**Рис. 6.** Распределение ксенотрансплантированной астроглии человека в структурах мозга крысы. А – карта распределения плотности астроглии (темнее – выше); Б – средняя плотность (число клеток в поле зрения) распределения астроцитов человека в стриатуме (Cpu), коре головного мозга (Ctx), мозолистом теле (CC); В – изменения индекса агрегации Кларка–Эванса (CE). На графиках указано значение  $p$  в тесте RM ANOVA, апостериорный тест Тьюки

глиоза интенсивность окрашивания на СЗ в астроцитах крысы (на стороне введения физраствора в стриатуме) была значимо выше ( $p < 0.05$ , тест Стьюдента) по сравнению с окрашиванием на СЗ в зоне глиального вала, окружавшего трансплантат. Помимо экспрессии маркеров нейровоспаления астроцитами в области глиального вала, следует отметить распределение AQP4 по всей поверхности отростков, а не только в области контактов концевых ножек с сосудами.

Оценка распределения МТС-h-позитивных астроцитов человека за пределами глиального вала показала, что наибольшая плотность астроцитов обнаруживалась в латеральных отделах мозолистого тела (рис. 6Б).

В коре астроциты человека обнаруживались до слоя V, а в стриатуме – преимущественно в дорсолатеральной его части. Картирование распределения астроцитов человека выявило разные направления их миграции в зависимости от микроокружения. Так, наблюдаются два основных пути распространения трансплантированной астроглии – один фронт движется в латеральном направлении по мозолистому телу и радиально в нижние слои коры, а второй распространяется от области трансплантации в стриатум (рис. 6А). Для оценки характера распределения трансплантированной астроглии в мозге крысы применяли индекс Кларка–Эванса, который значимо различался в стриатуме и коре (рис. 6В) и выявил равномерное распределение астроцитов без образования кластеров в хвостатом ядре и соответствие случайному распределению в коре. Это свидетель-

ствует о том, что трансплантированные клетки не склонны образовывать кластеры (группы), что, по-видимому, связано с отсутствием пролиферации или ее низкой частотой на удалении от трансплантата.

Таким образом, в проведенном нами эксперименте трансплантированные клетки, полученные из ИПСК человека, к шестому месяцу после трансплантации давали *in vivo* смешанную популяцию нейронов и астроцитов. Ксенотрансплантированные астроциты по размерам и экспрессируемым белкам (ALDH1L1, GFAP, AQP4) соответствовали зрелой астроглии, за исключением виментин-позитивных клеток, обнаруживаемых в центральной зоне, что свидетельствует о продолжающемся к шестому месяцу созреванию астроглии. Глиальный вал вокруг трансплантата был сформирован как астроцитами крысы, так и астроцитами человека. В отличие от нейронов, астроциты человека мигрировали в окружающие структуры, причем их плотность и характер распределения в стриатуме и коре головного мозга значимо различались, что свидетельствует о влиянии микроокружения на интеграцию глии человека.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что при трансплантации глиальных предшественников и нейральных стволовых клеток человека в спинной мозг мыши астроциты человека мигрируют вдоль миелинизированных трактов и частично замещают астроциты хозяина, формируя функциональные связи друг с другом и контактируют с сосудами [19, 20]. Обнаруженный нами

высокий уровень экспрессии AQP4 в трансплантированных астроцитах человека ассоциирован, по-видимому, с их миграцией, ремоделированием ткани и со структурной пластичностью глии. Увеличение экспрессии AQP4 и потеря его локализации в концевых ножках астроцитов ассоциированы с подвижностью клеток, в том числе в патологических условиях и при опухолевом росте [21, 22].

В ранних работах по трансплантации фетальной ткани среднего мозга в стриатум обнаружили, что астроциты трансплантата участвуют в аксональном наведении (axon guidance) и образовании нервных связей с нейронами трансплантата [23]. Кроме того, с помощью паракринных механизмов астроглия влияет на рост, дифференцировку нейронов и образование синаптических контактов. Например, сокультивирование и совместная трансплантация животным астроцитов, полученных из эмбрионального вентрального среднего мозга, и нейрональных предшественников увеличивают количество дофаминовых нейронов в трансплантате и повышают их выживаемость и синаптическую интеграцию [12]. Астроциты человека имеют большее фенотипическое разнообразие, чем астроциты крысы, более развитое дерево отростков и способны к более эффективному распространению кальциевых волн [24], что в эксперименте с трансплантацией астроцитов человека в мозг мыши приводило к увеличению эффективности синаптической передачи в гиппокампе [25].

С точки зрения оценки безопасности трансплантации клеточных продуктов необходимо оценивать степень зрелости клеток трансплантата и возможность образования тератом. Оценка только индекса пролиферации не позволяет дифференцировать опухолевый рост от нормального развития трансплантированных клеток [26]. По гистологическим особенностям трансплантат в нашем исследовании отвечает предложенным Sugai [26] критериям дифференцированной нервной ткани, в том числе ограниченному росту, характеру распределения клеток и зональной структуре, отражающей созревание глиальных клеток, формирование глиального вала вокруг трансплантированных нейронов и миграцию клеток глии за пределы трансплантата. Наши результаты согласуются с данными, указывающими на миграцию трансплантированных астроцитов в зрелом мозге. Так, миграция астроцитов трансплантата отмечалась при ксенотрансплантации фетальной ткани стриатума человека в мозг крысы, причем высокий на ранних сроках индекс пролиферации снижался к шестому месяцу [27]. Позже

была показана возможность массивного расселения астроцитов при ксенотрансплантации глиальных предшественников, в том числе полученных из ИПСК, и создания таким образом химерных модельных животных с высокой плотностью астроглии человека [25, 28–30] для изучения разных аспектов патогенеза нейродегенеративных заболеваний.

Помимо положительных эффектов, ксенотрансплантированные астроциты могут, по-видимому, оказывать и негативное влияние, провоцируя нейровоспаление и оказывая токсический эффект. В настоящей работе отмечена гипертрофия астроцитов в области глиального вала, показана экспрессия трансплантированными реактивными астроцитами компонента C3 комплемента, а отдельные клетки имели интенсивное окрашивание на MHC-I, что в комплексе свидетельствует о провоспалительных изменениях глии. Экспрессия C3 отмечается как признак нейротоксических астроцитов [31, 32], вместе с тем, представление о бинарном делении реактивной астроглии на нейротоксическую и нейропротективную подвергается в последнее время критике [33]. Выделяются различные фенотипы активированной глии, что подчеркивает необходимость более детальной функциональной оценки трансплантированных астроцитов. Хотя реактивные изменения астроцитов и образование глиального рубца могут замедлять аксональный рост, в то же время активация астроцитов связана с ремоделированием окружающей ткани и интеграцией трансплантата. Так, по данным Томов, глиальная реакция вокруг трансплантата отличается от формирования типичного глиального рубца и связана с формированием окружения (glial scaffold) вокруг трансплантированных клеток, в том числе с реваскуляризацией трансплантата [13].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная нами работа показывает, что морфологические особенности и распределение трансплантированных астроцитов отражают их сложные взаимодействия с клетками хозяина и трансплантированными нейронами. Помимо расселения и интеграции трансплантированных астроцитов в структуры мозга, трансплантация сопровождается формированием глиального вала и реактивными изменениями астроглии. Особенности распределения ксенотрансплантированных астроцитов необходимо учитывать при планировании экспериментов, а контроль глиального компонента необходим при анализе состояния трансплантата. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doss M.X., Sachinidis A. // *Cells*. 2019. V. 8. № 5. P. 403.
2. Bigarreau J., Rouach N., Perrier A.L., Mouthon F., Charvériat M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 3. P. 1684.
3. Kriks S., Shim J.-W., Piao J., Ganat Y.M., Wakeman D.R., Xie Z., Carrillo-Reid L., Auyeung G., Antonacci C., Buch A., et al. // *Nature*. 2011. V. 480. № 7378. P. 547–551.
4. Antonov S.A., Novosadova E.V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 7. P. 3381.
5. Bianchi F., Malboubi M., Li Y., George J.H., Jerusalem A., Szele F., Thompson M.S., Ye H. // *Stem Cell Res.* 2018. V. 32. P. 126–134.
6. Muñoz S.S., Engel M., Balez R., Do-Ha D., Cabral-da-Silva M.C., Hernández D., Berg T., Fifita J.A., Grima N., Yang S., et al. // *Cells*. 2020. V. 9. № 9. P. 2018.
7. Liu Y., Liu H., Sauvey C., Yao L., Zarnowska E.D., Zhang S.-C. // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. № 9. P. 1670–1679.
8. Arenas E., Denham M., Villaescusa J.C. // *Development*. 2015. V. 142. № 11. P. 1918–1936.
9. Engel M., Do-Ha D., Muñoz S.S., Ooi L. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2016. V. 73. № 19. P. 3693–3709.
10. Tanimoto Y., Yamasaki T., Nagoshi N., Nishiyama Y., Nori S., Nishimura S., Iida T., Ozaki M., Tsuji O., Ji B., et al. // *Stem Cells Transl. Med.* 2020. V. 9. № 4. P. 465–477.
11. Kondo T., Funayama M., Tsukita K., Hotta A., Yasuda A., Nori S., Kaneko S., Nakamura M., Takahashi R., Okano H., et al. // *Stem Cell Repts.* 2014. V. 3. № 2. P. 242–249.
12. Song J.-J., Oh S.-M., Kwon O.-C., Wulansari N., Lee H.-S., Chang M.-Y., Lee E., Sun W., Lee S.-E., Chang S., et al. // *J. Clin. Invest.* 2017. V. 128. № 1. P. 463–482.
13. Tomov N. // *Neural Regen. Res.* 2020. V. 15. № 7. P. 1173–1178.
14. Proschel C., Stripay J.L., Shih C., Munger J.C., Noble M.D. // *EMBO Mol. Med.* 2014. V. 6. № 4. P. 504–518.
15. Nicaise C. // *World J. Stem Cells*. 2015. V. 7. № 2. P. 380–398.
16. Izrael M., Slutsky S.G., Admoni T., Cohen L., Granit A., Hasson A., Itskovitz-Eldor J., Krush Paker L., Kuperstein G., Lavon N., et al. // *Stem Cell Res. Ther.* 2018. V. 9. № 1. P. 152.
17. Holmqvist S., Lehtonen Š., Chumarina M., Puttonen K.A., Azevedo C., Lebedeva O., Ruponen M., Oksanen M., Djelloul M., Collin A., et al. // *NPJ Park. Dis.* 2016. V. 2. № 1. P. 16009.
18. Kendall T.J., Duff C.M., Thomson A.M., Iredale J.P. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 17572.
19. Lu P., Ceto S., Wang Y., Graham L., Wu D., Kumamaru H., Staufenberg E., Tuszynski M.H. // *J. Clin. Invest.* 2017. V. 127. № 9. P. 3287–3299.
20. Chen H., Qian K., Chen W., Hu B., Blackburn L.W., Du Z., Ma L., Liu H., Knobel K.M., Ayala M., et al. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 3. P. 1033–1042.
21. Smith A.J., Duan T., Verkman A.S. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2019. V. 7. № 1. P. 74.
22. Vandebroek A., Yasui M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 5. P. 1603.
23. Petit A., Pierret P., Vallée A., Doucet G. // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 18. P. 7182–7193.
24. Sosunov A.A., Wu X., Tsankova N.M., Guilfoyle E., McKhann G.M., Goldman J.E. // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. № 6. P. 2285–2298.
25. Han X., Chen M., Wang F., Windrem M., Wang S., Shanz S., Xu Q., Oberheim N.A., Bekar L., Betstadt S., et al. // *Cell Stem Cell*. 2013. V. 12. № 3. P. 342–353.
26. Sugai K., Fukuzawa R., Shofuda T., Fukusumi H., Kawabata S., Nishiyama Y., Higuchi Y., Kawai K., Isoda M., Kanematsu D., et al. // *Mol. Brain*. 2016. V. 9. № 1. P. 85.
27. Hurelbrink C.B., Armstrong R.J.E., Dunnett S.B., Rosser A.E., Barker R.A. // *Eur. J. Neurosci.* 2002. V. 15. № 7. P. 1255–1266.
28. Windrem M.S., Schanz S.J., Morrow C., Munir J., Chandler-Militello D., Wang S., Goldman S.A. // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. № 48. P. 16153–16161.
29. Benraiss A., Wang S., Herrlinger S., Li X., Chandler-Militello D., Mauceri J., Burm H.B., Toner M., Osipovitch M., Jim Xu Q., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. № 1. P. 11758.
30. Preman P., Tcw J., Calafate S., Snellinx A., Alfonso-Triguero M., Corthout N., Munck S., Thal D.R., Goate A.M., De Strooper B., et al. // *Mol. Neurodegener.* 2021. V. 16. № 1. P. 68.
31. Liddelov S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E., Bennett F.C., Bohlen C.J., Schirmer L., Bennett M.L., Münch A.E., Chung W.-S., Peterson T.C., et al. // *Nature*. 2017. V. 541. № 7638. P. 481–487.
32. Bombeiro A.L., Hell R.C.R., Simões G.F., de Castro M.V., de Oliveira A.L.R. // *Neurosci. Lett.* 2017. V. 647. P. 97–103.
33. Escartin C., Galea E., Lakatos A., O’Callaghan J.P., Petzold G.C., Serrano-Pozo A., Steinhäuser C., Volterra A., Carmignoto G., Agarwal A., et al. // *Nat. Neurosci.* 2021. V. 24. № 3. P. 312–325.