

5. *Islamov R., Bashirov F., Izmailov A., Fadeev F., Markosyan V., Sokolov M., Shmarov M., Logunov D., Naroditskiy B., Lavrov I.* New Therapy for Spinal Cord Injury: Autologous Genetically-Enriched Leucoconcentrate Integrated with Epidural Electrical Stimulation. // *Cells. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* — 2022. — Т. 11. — № 1. — С. 1–26.
6. *Islamov R. R., Sokolov M. E., Bashirov F. V., Fadeev F. O., Shmarov M. M., Naroditskiy B. S., Povysheva T. V., Shaymardanova G. F., Yakupov R. A., Chelyshev Y. A., Aleksandrovich L. I.* A pilot study of cell-mediated gene therapy for spinal cord injury in mini pigs // *Neurosci. Lett.* — 2017. — Т. 644. — С. 67–75.
7. *Islamov R. R., Bashirov F. V., Sokolov M. E., Izmailov A. A., Fadeev F. O., Markosyan V. A., Davleeva M. A., Zubkova O. V., Smarov M. M., Logunov D. Y., Naroditskiy B. S., Salafutdinov I. I., Rizvanov A. A., Turaev R. G., Naroditskiy B. S., Salafutdinov I. I., Rizvanov A. A., Turaev R. G.* Gene-modified leucoconcentrate for personalized ex vivo gene therapy in a mini pig model of moderate spinal cord injury // *Neural Regen. Res.* — 2021. — Т. 16. — № 2. — С. 357–361.

Еремеев А. В.^{1,2}, Катюкова К. А.³, Емелин А. М.⁴, Деев Р. В.⁴, Усатова В. С.⁵, Лебедева О. С.¹, Богомазова А. Н.¹, Иллариошкин С. Н.³, Лагарькова М. А.¹

**СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОЛОГИИ,
УЛЬТРАСТРУКТУРЫ И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК
В МОДЕЛИ ОРГАНОИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА, ПОЛУЧЕННЫХ
ИЗ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НОРМАЛЬНЫХ
И ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ КЛЕТОК С ИНДУЦИРОВАННОЙ
ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬЮ**

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины»
ФМБА России, Москва, Россия

²ФГБУ «Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН», Москва, Россия

³ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

⁴ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Санкт-Петербург, Россия

⁵ФБГУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА России, Москва,
Россия

e-mail: art-eremeev@yandex.ru

Атаксия 17 типа (spinocerebellar staxia tpe 17, SCA17) — прогрессирующее нейродегенеративное наследственное заболевание, характеризующееся атаксией, хореей, дистонией, деменцией и другими психическими нарушениями. Причина патологии — увеличение количества CAG-повторов в гене TBP, кодирующем ТАТА-бокс, связывающий белок, который вовлечён в инициацию транскрипции. Клеточные и молекулярные механизмы развития SCA17 в настоящее время не известны. Одной из перспективных модельных систем для изучения SCA17 могут служить мозговые органоиды, которые представляют собой трехмерные

клеточные структуры, повторяющие некоторые из ключевых особенностей морфологии, пространственной архитектуры и функций определенного участка мозга. Морфологический анализ клеток мозговых органоидов с использованием иммуногистохимических методов окрашивания и электронной микроскопии показал, что при SCA17 наблюдается повышенная пролиферативная активность нейральных предшественников, замедление дифференцировки в нейральном направлении, а также нарушения тонкой структуры митохондрий в нейронах.

Ключевые слова: ИПСК, органоиды мозга, дифференцировка, пролиферация, митохондрии.

Полиглутаминовые (polyQ) заболевания представляют собой группу нейродегенеративных расстройств, которые вызваны экспансией тринуклеотидного CAG-повтора в кодирующей части генов, что приводит к появлению белков с удлиненным polyQ трактом [1]. В настоящее время известно девять polyQ-заболеваний: шесть спиноцеребеллярных атаксий (SCA) типа 1, 2, 3, 6, 7 и 17, болезнь Гентингтона (HD), дентаторубро-паллидолюисова атрофия (DRPLA) и спинобульбарная мышечная атрофия [1]. В 1999 г. R. Koide et al. впервые описали пациента с уникальными неврологическими симптомами, у которого выявили экспансию CAG-повтора в гене TBP. В 2001 г. аномальная экспансия CAG повтора в гене TBP была подтверждена в японских родословных, в которых наблюдалось неврологическое расстройство, наследуемое по аутосомно-доминантному типу [3]. В норме в гене TBP может наблюдаться от 25 до 40 CAG/CAA повторов, при увеличении числа повторов от 49 и более продуцируются удлиненные белки, которые накапливаются в нейронах [4, 5]. Увеличение количества повторов в диапазоне 41–48 ассоциировано со сниженной пенетрантностью и наличием аномальной симптоматики.

Понимание процессов развития нервной системы человека в норме и патологии значительно улучшилось благодаря разработкам новых клеточных моделей, в частности, благодаря методам получения нейральных клеток, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека. Высокоэффективные протоколы 2D дифференцировки ИПСК в нейральные клетки разных типов позволили создать модели ряда нейродегенеративных заболеваний, связанных с нарушением развития нервной системы. Тем не менее, 2D культуры нейронов или глии не способны воспроизвести трехмерную архитектуру мозговой ткани, представленную несколькими функционально активными типами клеток. Разработка протоколов 3D дифференцировки ИПСК в мозговые органоиды позволила получить модель, наиболее приближенную к нативным тканям мозга человека. Разработанная нами ранее технология получения мозговых органоидов позволяет эффективно получать 3D структуры, сходные с мозгом по клеточному составу и морфологическим характеристикам [6, 7]. В данной работе мы изучали тонкую морфологию мозговых органоидов SCA17, полученных из ИПСК с помощью этой технологии.

Материалы и методы. Культуры линий ИПСК, полученных от пациента с атаксией 17-го типа (SCA17.2L, SCA17.7L и SCA17.9L) и здорового донора RG4S, культивировали на чашках Петри диаметром 6 см, предварительно покрытых матригелем (Corning, США) в среде mTESR1 (Stemcell technologies, Канада), как описано в инструкции производителя. Дифференцировку начинали при до-

стижении 80–85%-ной конфлюэнтной плотности монослоя. Протокол дифференцировки и получения мозговых органоидов описан детально ранее [6, 7].

Для иммунофлуоресцентного окрашивания органоиды промывали фосфатносолевым буфером (PBS), фиксировали 30 мин при комнатной температуре в 4%-ном параформальдегиде/PBS, затем заливали жидкостью для заморозки ткани (Leica, Германия), замораживали в парах жидкого азота в течение 5 мин, затем делали срезы толщиной 5–10 мкм на криотоме (Leica, Германия). Срезы фиксировали на предметном стекле, охлажденном до -20°C ацетоном в течение 5 мин, промывали дважды по 5 мин PBS. Инкубировали в блокирующем буфере с первичными антителами в течение ночи во влажной камере при 4°C . Первичные антитела наносили в разведениях, рекомендованных производителем, в PBS с 0,1% Tween 20, содержавшем 5% фетальной коровьей сыворотки и 2% сыворотки козы, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем отмывали 3 раза по 5 мин в PBS с 0,1% Tween 20. Вторичные антитела (Invitrogen, США), конъюгированные с флуоресцентными метками (Alexa 488, Alexa 555), наносили в разведениях, рекомендованных производителем, инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте, отмывали 3 раза по 5 мин в PBS с 0,1% Tween 20. Затем препараты инкубировали в течение 10 мин с 4',6-диамино-2-фенилиндолом дигидрохлоридом (DAPI) в концентрации 0,1 мкг/мл в PBS для визуализации ядер, отмывали 2 раза PBS. Полученные препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа (Olympus, Япония) или конфокального микроскопа на базе федерального центра мозга и нейротехнологий ФМБА России. Для электронной микроскопии образцы мозговых органоидов передавали в отдел исследования мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии». Исследования пролиферативной активности клеток в органоидах мозга и морфометрический анализ проводили на базе кафедры патологической анатомии СЗГМУ им. И. И. Мечникова.

Результаты и обсуждение. Иммуногистохимический анализ криосрезов органоидов мозга показал наличие морфологически детерминированных структур, положительных по маркерам нейрогенеза: нестин и SOX2, а также характерного для астроглии маркера GFAP. Иммуногистохимическое окрашивание также показало, что в органоидах экспрессируются нейрональные маркеры: ассоциированный с микротрубочками белок 2 (Microtubule-associated protein 2, Map 2), β -3-тубулин, нестин, тирозингидроксилаза (TH), FOXA2. Электрофизиологическая активность нейронов, меченных флуоресцентной меткой (с помощью вируса AAV GFP под hSyn промотором) показана методом patch-clamp (наличие потенциалов действия, характерных для зрелых нейронов). Таким образом, мы показали, что мозговые органоиды здорового донора и мозговые органоиды SCA17 содержат электрофизиологически активные зрелые нейроны и глию. При этом гистологический анализ показал, что в мозговых органоидах, полученных из ИПСК пациентов с SCA17, значительно тормозится дифференцировка в нейральном направлении. Так, в органоидах SCA17 наблюдаются малодифференцированные кластеры, экспрессирующие маркеры плюрипотентности. Наличие низкодифференцированных кластеров в органоидах SCA17 сочетается с высокой пролиферативной активностью. В органоидах SCA17 обнаруживается почкование, при этом почкующиеся структуры имеют нейрональную природу. Также органоиды SCA17 имеют тенденцию к более активному росту по сравнению со

«здоровыми» органоидами. В органоидах SCA17 менее выражено образование нейроноподобных клеток, а также образование дендритной сети между клетками. Таким образом, мозговые органоиды SCA17 отличаются большими размерами, большим числом розеток на срез и специфическими паттернами роста. Одной из причин может являться высокая митотическая активность нейральных стволовых клеток SCA17, генерирующих клеточные розетки и органоиды на ранних этапах нейрогенеза *in vitro*.

При помощи электронной микроскопии исследовали ультраструктуру клеток в составе мозговых органоидов, полученных из ИПСК здоровых доноров и пациентов со SCA17. Ультраструктура клеток в составе мозговых органоидов гетероморфна: присутствуют клетки с морфологией, характерных для зрелых нейронов, и клетки с ультраструктурой, свойственной малодифференцированным клеткам. «Зрелая нейрональная» морфология характеризуется электронно-светлым ядром с ядрышком и небольшим количеством гетерохроматина, конденсированного вблизи внутренней ядерной мембраны; цитоплазмой, содержащей хорошо развитые органеллы, прежде всего, цистерны гранулярной эндоплазматической сети, вместе с полирибосомами образующей тельца Ниссля, диктиосомы комплекса Гольджи, митохондрии с хорошо выраженными кристами и светлым матриксом, длинными тонкими отростками с параллельно расположенными микротрубочками. Цитоплазма незрелых нейрональных клеток, в том числе митотически делящихся нейробластов, заполнена почти исключительно хаотично расположенными элементами цитоскелета (промежуточными филаментами и микрофиламентами), рибосомами и полирибосомами, мелкими митохондриями с темным матриксом. Цистерны эндоплазматической сети единичны, короткие, комплекс Гольджи не развит. Клетки, образующие поверхностный слой органоида, имеют особое строение, отличающееся от строения клеток, описанных выше. Они соединяются друг с другом адгезивными контактами большой протяженности на латеральных поверхностях, на апикальных поверхностях имеют микроворсинки и единичные реснички, среди них встречаются митотически делящиеся клетки. Всё это свидетельствует о сходстве клеток поверхности органоида с клетками нейроэпителия, выстилающими канал нервной трубки *in vivo*.

Наиболее ярким патологическим изменением клеток в органоидах SCA17 является наличие многочисленных электронно-прозрачных вакуолей разной величины, представляющих собой, по-видимому, измененные митохондрии, так как они содержат двойную мембрану и едва заметные остатки крист. Причем в таких митохондриях электронно-плотный материал и единичные кристы локализуются в одной части органеллы, а другая часть запустевает и превращается в вакуоль. В результате большинство вакуолей представляют собой электронно-прозрачные пузырьки, содержащие остатки электронно-плотного материала и единичных крист по периферии. Мы полагаем, что процесс образования таких вакуолей начинается с разрушения крист и появления просветления в центральной части митохондрии. Затем светлый участок расширяется, митохондрия набухает, увеличивается в размерах, а ее внутреннее содержимое — кристы и матрикс — разрушаются, гомогенизируются и превращаются в однородный электронно-плотный материал, смещенный к периферии митохондрии. Многочисленные почти полностью прозрачные вакуоли иногда заполняют большую часть клетки, локализуясь перинуклеарно, в центральной зоне цитоплазмы или по ее периферии,

а также располагаются в отростках, перекрывая их. Клетки, переполненные набухшими электронно-прозрачными вакуолями, находящимися как в их телах, так и в их отростках, чаще обнаруживались вблизи поверхностного слоя органоида. Таким образом, ультраструктурное исследование митохондрий в клетках и отростках при SCA17 выявило очевидный полиморфизм с преобладанием патологически измененных митохондрий.

Электронные микрофотографии были проанализированы морфометрически. Было проведено сравнение размера и формы (степени округлости, circularity) митохондрий. Отдельно измеряли митохондрии в клетках, строение цитоплазмы которых соответствовало зрелым нейронам, и в клетках с морфологией незрелых нейронов (нейробластов, нейрональных предшественников). При SCA17 митохондрии в телах и отростках нейронов достоверно крупнее, чем в контроле. Форма митохондрий при атаксии 17 была более вытянутой в отростках как зрелых, так и незрелых клеток.

В мозговых органоидах SCA17 нейроны содержат митохондрии преимущественно либо мелкие, темные, с единичными кристами, которые, по-видимому, являются функционально неактивными, либо патологически значительно измененные. Очевидно, что клетки, практически лишенные морфологически и функционально нормальных митохондрий — как энергообразующего аппарата клетки и органеллы, обеспечивающей поддержание ионного гомеостаза — обречены на дегенерацию. Интересно, однако, что апоптотические клетки практически не встречаются, что свидетельствует о наличии компенсаторных механизмов, позволяющих клеткам продолжать существование даже при столь тяжелых патологических изменениях митохондрий. В частности, патологические изменения митохондрий, заканчивающиеся либо митофагией, либо превращением их в вакуоли, по-видимому, компенсируются постоянным образованием новых митохондрий путем деления, о чём свидетельствует наличие признаков усиленной фрагментации митохондрий: обилие практически во всех клетках мелких митохондрий с темным матриксом и общее численное преобладание таких митохондрий.

Таким образом, органоиды мозга из дифференцированных ИПСК производных, полученных от пациентов с SCA17 и здоровых пациентов, могут быть удобной моделью для изучения молекулярно-клеточных механизмов развития этого заболевания. В данной работе показано, что мутация в гене ТВР приводит к изменению пролиферативной активности нейральных предшественников, замедлению дифференцировки в нейральном направлении, а также к структурным нарушениям митохондрий в нейронах мозговых органоидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Orr H. T., Zoghbi H. Y.* Trinucleotide repeat disorders. // *Annu Rev Neurosci.* — 2007. — № 30. — С. 575–621.
2. *Koide R., Kobayashi S., Shimohata T.* A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? // *Hum. Mol. Genet.* — 1999. — № 8. — С. 2047–2053.
3. *Nakamura K., Jeong S. Y., Uchihara T.* SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein // *Hum. Mol. Genet.* — 2001. — № 10. — С. 1441–1448.

4. *И Д. В., Проскокова Т. Н., Сикора Н. В., Абрамычева Н. Ю., Иллариошкин С. Н.* Спиноцеребеллярная атакия 17-го типа: полный фенотип у носителя 42 CAG/CAA-повторов // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. — 2021. — Т. 121. — № 12. — С. 100–105.
5. *Qiong L., Yongcheng P., Xiao-Jiang L., Shihua L.* Molecular Mechanisms and Therapeutics for SCA17 // Neurotherapeutics. — 2019. — № 16. — С. 1097–1105.
6. *Еремеев А. В., Воловиков Е. А., Шувалова Л. Д., Давиденко А. В., Хомякова Е. А., Богомякова М. Е., Лебедева О. С., Зубкова О. А., Лагарькова М. А.* Голь на выдумки хитра, или Дешевый, надежный и воспроизводимый способ получения органоидов // Биохимия. — 2019. — Т. 84. — № 3. — с. 448–456.
7. *Eremeev A., Shuvalova L., Ruchko E., Volovikov E., Zubkova O., Emelin A., Deev R., Lebedeva L., Bogomazova A., Lagarkova M.* Brain Organoid Generation from Induced Pluripotent Stem Cells in Home-Made Mini Bioreactors // J. Vis. Exp. — 2021. — Dec. — Vol. 11. — № 178. doi: 10.3791/62987.

Зиновьев С. В., Плехова Н. Г., Радьков И. В.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ЭЛАСТИЧЕСКИХ И КОЛЛАГЕНОВЫХ ВОЛОКОН ЛЕГКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Владивосток, Россия

e-mail: sinowev@mail.ru

Аннотация. Цель исследования — выявить особенности строения эластических и коллагеновых волокон легкого крыс-альбиносов. Для изучения аутофлуоресценции и гистохимического выявления эластических и коллагеновых волокон в тканях легких применяли метод окраски тканей ализариновым красным С (АКС) и борной кислотой, затем препараты исследовали под флуоресцентным микроскопом.

Результаты. В тканях легких отмечается аутофлуоресценция внутренней и наружной эластических мембран дистальных отделов легочных артерий, которая при окраске АКС блокировалась. При добавлении в процессе окрашивания к АКС борной кислоты обнаруживалась флуоресценция эластических мембран в виде яркого свечения соединительнотканых волокон и базальных мембран в желто-зеленом диапазоне. Эти данные свидетельствовали о низком содержании тирозина и сахаров в этих структурах.

Ключевые слова: флуоресценция, эластические мембраны, легочные артерии и вены.