

На правах рукописи



**Петухова Елена Олеговна**

**Эффекты трансплантации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека,  
сверхэкспрессирующих глиальный нейротрофический фактор, на механизмы  
нейропластичности в модели болезни Альцгеймера**

03.03.01 – физиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2021

Работа выполнена на кафедре нормальной физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель: Мухамедьяров Марат Александрович** - доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

**Официальные оппоненты:**

**Маслюков Петр Михайлович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ярославль.

**Лопатина Ольга Леонидовна**, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Красноярск.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), г. Москва.

Защита состоится «22» сентября 2021 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета КФУ.03.06 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420015, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 76, ауд. 208 (актовый зал).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском федеральном университете.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета КФУ.03.06,  
д.б.н., профессор



Т.А. Аникина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Изучение механизмов функционирования нервной системы и способов коррекции нейропатологических состояний является важной и актуальной проблемой современной физиологии. Болезнь Альцгеймера (БА) - нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующим снижением когнитивных функций. Это самая частая причина развития деменции и одно из самых распространенных заболеваний пожилого возраста [Hebert et al., 2003].

Выделяют два основных гистопатологических маркера болезни Альцгеймера: внеклеточные депозиты бета-амилоида и внутриклеточные агрегаты гиперфосфорилированного тау-белка. Накопление токсичных белковых агрегатов запускает каскад первичных (непосредственно вызванных действием данных белков) и вторичных (уже не связанных с ними напрямую) повреждений, которые в конечном итоге приводят к синаптической, а затем – нейрональной дегенерации, что выражается нарушениями памяти и поведения. От момента отложения первых амилоидных бляшек в мозге до момента возникновения первых клинических симптомов проходят десятилетия даже в случаях с семейной аутосомно-доминантной формой БА. Поэтому терапевтические стратегии, направленные на снижение образования токсичных белковых агрегатов, могут быть эффективны только на ранних стадиях, когда повреждения еще не приняли масштабный характер. Однако БА диагностируется, как правило, когда пациенты уже имеют когнитивные и поведенческие нарушения [Lu et al., 2013]. В настоящее время нет методов терапевтического воздействия, способных предотвратить развитие или изменить течение болезни Альцгеймера. Поэтому разработка новых терапевтических подходов остается актуальной задачей.

Медленное развитие БА обусловлено включением ряда естественных защитных и компенсаторных процессов. Одним из основных путей защиты мозга от повреждающих воздействий является выделение ростовых и нейротрофических факторов: NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5, CNTF, bFGF, TGFbeta, GDNF и др. Эти биологически активные молекулы регулируют нейрогенез, нейропластичность, обладают нейротрофическими и нейропротекторными свойствами, что сделало их объектами исследований по разработке препаратов для лечения различных нейродегенеративных заболеваний. Предполагается, что терапия, нацеленная на модуляцию синаптогенеза и нейрогенеза способна восстанавливать функциональное состояние мозга пациентов, уже имеющих когнитивные расстройства, и такой подход способен быть эффективным в более широких временных рамках от начала заболевания, нежели терапия, направленная на очистку от токсичных белковых агрегатов [Lu, et al., 2013].

Мы исследуем возможности применения генно-клеточных технологий для доставки ростовых и нейротрофических факторов в мозг при лечении нейродегенеративных заболеваний.

Настоящее исследование посвящено оценке терапевтического потенциала трансплантации в периферический кровоток генно-клеточной конструкции на основе мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, трансдуцированных аденовирусным вектором, кодирующим глиальный нейротрофический фактор (МКПК-Ad5-GDNF) при лечении болезни Альцгеймера в модели на APP/PS1 мышах. Мононуклеарные клетки пуповинной крови (МКПК) способны проникать через гематоэнцефалический барьер и мигрировать к областям дегенерации, что позволяет вводить генно-клеточные конструкции на основе этих клеток в периферический кровоток. Существуют многочисленные данные, свидетельствующие о ряде положительных эффектов внутривенных инъекций этих клеток при различных заболеваниях и при нормальном старении. В частности, в экспериментах на старых крысах было показано, что однократная внутривенная инъекция МКПК в количестве  $10^6$  приводит к усилению нейрогенеза в субгранулярной зоне гиппокампа и снижению количества активированной формы микроглии при практическом отсутствии влияния на микроглию, находящуюся в состоянии покоя [Bachstetter et al., 2008]. Аналогичные результаты были получены на неонатальных крысах с гипоксической ишемией: МКПК способствовали дифференцировке нейронов и снижали глиальную дифференциацию [Ohshima et al., 2016]. Низкая иммуногенность и онкогенность мононуклеарных клеток пуповинной крови обеспечивают безопасность для организма реципиента [Исламов с соавт., 2008; Кудряшова с соавт., 2012]. Глиальный нейротрофический фактор, выбранный нами в качестве терапевтического агента, контролирует такие процессы, как рост отростков, синаптогенез, клеточная адгезия, пролиферация, миграция, дифференцировка, выживание клеток мозга [Cintrón-Colón et al., 2020]. Известно, что количество GDNF снижено в средней височной извилине у пациентов с болезнью Альцгеймера [Aigavaara et al., 2011], у старых мышей [Lee et al., 2000] и мышей моделью БА [Revilla et al., 2014]. Прямая генная терапия, осуществляемая путем инъекции в гиппокамп лентивирусного вектора, экспрессирующего GDNF (Lenti-GDNF), улучшала обучаемость и память у мышей с моделью БА [Revilla et al., 2014]. GDNF и его аналоги осуществляют мощное защитное действие на дофаминергические нейроны и мотонейроны, поэтому их эффекты широко изучаются при лечении болезни Паркинсона, заболеваниях двигательных нейронов, травмах спинного мозга [Ibanez et al., 2017]. Однако при болезни Альцгеймера терапевтический потенциал GDNF раскрыт мало.

Ранее нами было показано, что генно-клеточная конструкция МКПК-Ad5-GDNF улучшает пространственную рабочую память мышей с моделью болезни Альцгеймера, усиливает нейрогенез в субгранулярной зоне гиппокампа. Трансплантированные клетки, достигшие головного мозга, хорошо выживали и были способны длительно экспрессировать рекомбинантные гены. Так, человеческие мононуклеарные клетки, экспрессирующие GDNF, присутствовали в коре и гиппокампе мышей с моделью болезни Альцгеймера через 1,5 месяца

после трансплантации. В настоящем исследовании мы определили влияние конструкции МКПК-Ad5-GDNF на синаптическую пластичность, оцениваемую с применением методов электрофизиологии и молекулярной биологии, а также на воспаление, выражаемое по степени микро- и астроглиоза.

**Цель исследования.** Изучить эффекты трансплантации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, сверхэкспрессирующих глиальный нейротрофический фактор, на механизмы нейропластичности в модели болезни Альцгеймера на APP/PS1 мышях.

**Задачи исследования:**

1. Проанализировать влияние мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, сверхэкспрессирующих глиальный нейротрофический фактор (конструкция МКПК-Ad5-GDNF) на кратковременную синаптическую пластичность в CA1 зоне гиппокампа APP/PS1 мышей.
2. Определить влияние конструкции МКПК-Ad5-GDNF на вызванную NMDA-зависимую долговременную потенциацию в CA1 зоне гиппокампа APP/PS1 мышей.
3. Изучить эффекты генно-клеточной конструкции МКПК-Ad5-GDNF на экспрессию синаптических белков (PSD-95 и синаптофизина) в гиппокампе APP/PS1 мышей.
4. Оценить действие конструкции на микроглиоз в головном мозге APP/PS1 мышей.
5. Исследовать действие конструкции на астроглиоз в головном мозге APP/PS1 мышей.

**Научная новизна работы.** В текущей работе впервые изучены эффекты трансплантации в периферический кровоток генно-клеточной конструкции МКПК-Ad5-GDNF на синаптическую пластичность и глиоз у мышей с моделью болезни Альцгеймера. Показано, что генно-клеточная конструкция не влияет на электрофизиологические параметры синаптической пластичности в CA1 зоне гиппокампа, увеличивает в гиппокампе экспрессию синаптофизина и PSD-95, снижает выраженность микроглиоза в головном мозге.

**Научно-практическая значимость работы.** Настоящее исследование направлено на разработку терапевтического подхода, позволяющего восстановить функциональное состояние поврежденного при болезни Альцгеймера мозга. Актуальность работы определяется большой распространенностью БА и отсутствием эффективного лечения заболевания. Полученные научные данные имеют значение для фундаментальной медицины, а также создают предпосылки для разработки новых подходов к лечению болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний.

**Положение, выносимое на защиту.** Трансплантация мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, сверхэкспрессирующих глиальный нейротрофический фактор, повышает экспрессию синаптических белков (синаптофизин, PSD-95), не влияет на электрофизиологические параметры синаптической пластичности, снижает выраженность микроглиоза в головном мозге APP/PS1 мышей, являясь эффективным подходом для коррекции нейропатологических нарушений в модели болезни Альцгеймера.

**Степень достоверности и апробация работы.** Методы и подходы полностью соответствуют заявленной цели и задачам. Применены современные исследовательские подходы, включая использование модифицированных клеток пуповинной крови, трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера (мутации в генах пресенилина и предшественника бета-амилоида), а также методов: иммуногистохимия, иммуно-блот, электрофизиология. Статистический анализ результатов проводился с помощью пакета прикладных программ Origin 8.0 с использованием теста Манна-Уитни и дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Бонферрони для количественных шкал. Отличия считались достоверными при  $p < 0.05$ . Результаты исследования были доложены на следующих конференциях: 88-я Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых (Казань, 26-27 марта 2014); 91-я Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых (Казань, 11-13 апреля 2017); XXIII съезд Физиологического общества имени И.П. Павлова (Воронеж, 18-22 сентября 2017); 92-я Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых (Казань, 4-6 апреля 2018); Международная научная конференция – школа молодых ученых «Заболевания мозга: вызов XXI века» (Казань, 16-17 мая 2018); Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий» (Санкт-Петербург, 8-11 октября 2019); 94-я Международная научно-практическая конференция молодых ученых (Казань, 25 ноября 2020); III Всероссийская научно-практическая конференция «Физиология человека» (Чебоксары, 27 ноября 2020).

**Личный вклад автора.** Планирование и проведение экспериментов, анализ данных, подготовка публикаций и написание статей осуществлялись при личном участии автора.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых изданиях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов и результатов исследования, заключения, выводов, рекомендаций, списка литературы, включающего 218 наименований. Работа проиллюстрирована 24 рисунками.

## **ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Генно-клеточные конструкции.** Генно-клеточные конструкции были приготовлены сотрудниками НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии – к.н. Гариной Екатериной Евгеньевной и к.н. Салафутдиновым Ильнуром Ильдусовичем. Заготовку пуповинной крови человека проводили после получения информированного согласия у беременной и дородового скрининга на наличие противопоказаний к донорству пуповинных клеток. Кровь собирали в пластиковые контейнеры CPDA-1 250 GG (Terumo). Мононуклеарную фракцию выделяли путем

центрифугирования в градиенте плотности фиколла. Мононуклеарные клетки пуповинной крови (МКПК) ресуспензировали в среде DMEM с добавлением сыворотки крови плодов коровы (10%), L-глутамина (2 мМ) и смеси антибиотиков (пенициллин и стрептомицин - 1%) и трансдуцировали рекомбинантными аденовирусами, экспрессирующими ген EGFP или GDNF (10 блюшко-образующих единиц на клетку). После этого клетки культивировали 14-16 часов во влажной атмосфере при 37 °С с поддержанием 5% уровня CO<sub>2</sub>. Перед трансплантацией МКПК осаждали центрифугированием и разводили в стерильном физиологическом растворе до концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/100 мкл. Часть генно-клеточных конструкций оставили культивироваться на 3 суток для оценки эффективности трансдукции аденовирусными векторами. Методом вестерн-блот детектировали в клеточных линиях МКПК-ad5-EGFP и МКПК-ad5-GDNF экспрессию соответствующих белков. Обе генно-клеточные конструкции экспрессировали кодируемые аденовирусным вектором белки. В интактных клетках экспрессии GDNF выявлено не было.

**Объект исследования.** Мыши с генетической моделью болезни Альцгеймера, экспрессирующие мутантные человеческие гены белка предшественника амилоида и пресенилина 1 (APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>ΔE9</sup> или APP/PS1 мыши) были закуплены в Jackson Laboratory (США) и содержатся в питомнике лабораторных животных «Пушино» (Московская область). К началу эксперимента мышей доставили в КГМУ. Животные содержались в стандартных условиях вивария в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (при естественном освещении и температуре окружающего воздуха  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , с постоянным доступом к комбинированному корму и воде). Работа проведена в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» была одобрена локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета (выписка из протокола заседания №10 от 20 декабря 2016 года). Были сформированы следующие экспериментальные группы: 1) «WT» - мыши дикого типа (n=18); 2) «Alz» - APP/PS1 мыши (n=13); 3) «Alz-EGFP» - APP/PS1 мыши после трансплантации МКПК, экспрессирующих репортерный белок EGFP (n=12); 4) «Alz-GDNF» - APP/PS1 мыши после трансплантации МКПК, экспрессирующих GDNF (n=12). Ксенотрансплантация генно-клеточных конструкций экспериментальным животным осуществлялась однократно в количестве 2 млн. клеток в 100 мкл физиологического раствора путем инъекции в ретроорбитальный венозный синус. В работе использовались мыши обоего пола в возрасте 8-12 месяцев.

**Электрофизиологическая регистрация.** Анестезированных хлоралгидратом (0.53 мг/кг) мышей декапитировали, головной мозг извлекали и помещали в ледяной раствор ACSF. Фронтальные срезы мозга мышей толщиной 350 мкм были изготовлены на моторизованном

виброслайсере NVSLM (World Precision Instruments, США) в ледяном растворе ACSF с повышенным содержанием магния (в мМ): NaCl 126, KCl 3.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, глюкоза 10, NaHCO<sub>3</sub> 25, MgCl<sub>2</sub> 10, CaCl<sub>2</sub> 0.5 (pH 7.3-7.4 при постоянной оксигенации карбогеном; 290-300 mOsm). До начала эксперимента срезы в течение часа инкубировали в ACSF: NaCl 126, KCl 3.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, глюкоза 10, NaHCO<sub>3</sub> 25, MgCl<sub>2</sub> 1.3, CaCl<sub>2</sub> 2 при комнатной температуре. Срезы визуализировали при помощи микроскопа Olympus BX51WI, оборудованного водно-иммерсионными объективами x10 и x60 и видеокамерой. Регистрацию проводили при температуре 30-31°C. Перед началом эксперимента срезы оставляли в ванночке на 30 мин для температурной адаптации. Локальные полевые потенциалы (ЛПП) регистрировали при помощи пэтч-кламп усилителя EPC-10 (НЕКА Elektronik, Germany) в слое Stratum radiatum CA1 области гиппокампа с использованием стеклянных микропипеток с сопротивлением 1-2 МОм, заполненных внеклеточным раствором. ЛПП получали путем стимуляции коллатералей Шаффера внеклеточным биполярным электродом; стимулятор - DS3 Constant Current Isolated Stimulator, Digitimer, England. Интенсивность стимуляции устанавливали на уровне 2 пороговых значений (обычно - 12-20 мкА при длительности 200 мкс). Пороговым значением считали силу, при которой возникал минимальный полевой ответ (0.2-0.5 мВ). Электрофизиологические данные анализировали с использованием пакета программ Igor Pro 6.02 (WaveMetrics, USA). Статистическую обработку данных и построение графиков проводили в программе OriginPro 2015. Результаты представили как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Статическую значимость отличий оценивали с использованием U-критерия Манна-Уитни и дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Бонферрони. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

**Окрашивание срезов тиюфлавином S.** После электрофизиологической регистрации срезы мозга были проверены на предмет наличия амилоидных бляшек путем окрашивания тиюфлавином S. Срезы помещали на 30 минут в 4% раствор формалина, далее промывали в дистиллированной воде. После этого на срезы наносили 100  $\mu$ л 1% раствора тиюфлавина S, разведенного на 50% растворе этанола. Далее срезы дважды промывали в 70% растворе этанола и заключали в глицерин. Визуализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Olympus BX51WI и осветителя Thorlabs (LED4D067) со светодиодом 365 нм.

**Вестерн-блот.** Анестезированных хлоралгидратом (0.53 мг/кг) мышей декапитировали, после чего извлекали головной мозг. Из одного полушария конечного мозга выделяли гиппокамп, замораживали в жидком азоте и переносили в морозильную камеру с температурой - 80°C для проведения количественного анализа белков методом вестерн-блот. Другое полушарие поместили в раствор параформальдегида (4% раствор на основе PBS) на ночь, после чего хранили в 30% растворе сахарозы на PBS с добавлением азида натрия (0.02%) для последующего проведения иммуногистохимических исследований.

Метод вестерн-блот использовали для оценки эффективности трансдукции мононуклеарных клеток пуповинной крови и определения количества синаптических белков в гиппокампе мышей. Был применен адаптированный и модифицированный протокол ABCAM (<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/wb-beginner.pdf>). Ткань гиппокампа или генно-клеточные конструкции гомогенизировали и затем центрифугировали при 15,000 грм в течение 30 минут. Концентрацию белков довели до 40 мкг/10 мкл. При проведении электрофореза использовали коммерческий гель «Express Plus RAGE Gels» и коммерческий буфер «Express Gel Running Buffer Powder». В каждую лунку геля поместили по 10 мкл стандартизированного гомогената. Электрофорез проводили при 200 В. Перенос белков с геля на мембрану (PVDF) провели на аппарате SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD) при 17 В в течение 40 минут. Неспецифическое связывание антител блокировали, поместив PVDF мембрану на сутки при 4°C в PBSTw (Phosphate buffer saline, 0.2% Tween 20), содержащем 5% обезжиренного молока (blocking buffer). Затем в течение суток мембрану инкубировали в blocking buffer с первичными антителами: rabbit polyclonal to PSD-95 (1:500, Abcam), rabbit polyclonal to synaptophysin (1:500, Abcam), mouse monoclonal to  $\beta$ -actin-HRP (1:6000, GenScript), goat polyclonal to GDNF (1:500, Sigma), rabbit polyclonal to GFP antibody (1:300, GenScript). Далее мембрану промывали в PBSTw и инкубировали 2 часа со вторичными антителами. При анализе эффективности трансдукции мононуклеарных клеток пуповинной крови использовали вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена: goat anti-rabbit HRP conjugated antibodies (1:000, Sigma). Окрашенную антителами мембрану помещали в реагент ECL Western blotting substrate kit (horseradish peroxidase) на 5 минут при комнатной температуре. Визуализировали результаты проведенного анализа на приборе ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad). Для количественной оценки синаптических белков применяли вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентными красителями: donkey anti-rabbit Alexa Fluor 555 conjugated antibodies (1:2000, Thermo Fisher Scientific), donkey anti-mouse Alexa Fluor 647 conjugated antibodies (1:2000, Thermo Fisher Scientific). Визуализировали флуоресцентные изображения на приборе Typhoon FLA 9500 и анализировали при помощи программы ImageJ Launcher. Для определения количества белка оценивали сумму значений яркости пикселей в полосках белка (RawIntDen). Далее количество исследуемых белков выражали в процентах относительно количества бета-актина. Для этого RawIntDen исследуемого белка делили на RawIntDen бета-актина. Полученные в группе мышей дикого типа значения приняли за 100%. Данные групп «Alz», «Alz-EGFP» и «Alz-GDNF» перевели в проценты от дикого типа. Полученные результаты обрабатывали с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Бонферрони, отличия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

**Иммунофлуоресцентное окрашивание криостатных срезов.** Изготавливали фронтальные срезы головного мозга на уровне от -1.5 до -2.5 мм от брегмы с применением

микротомы-криостата HM560 Cryo-Star (Carl Zeiss). Перед окрашиванием криостатные срезы промывали в 0.1% растворе Triton-X100 на PBS (PBST) и инкубировали в 5% растворе ослиной сыворотки на PBST в течение 45 минут при комнатной температуре. В первичных антителах срезы инкубировали в течение 2 суток при 4°C, во вторичных – 2 часа при комнатной температуре в темноте. Для визуализации ядер срезы окрашивали в растворе DAPI (10 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере). Применяли следующие первичные и вторичные антитела: rabbit anti-Iba1 (1:200, Abcam), rabbit anti-GFAP (1:200, Abcam), rabbit anti-PSD-95 (1:200, Abcam), rabbit anti-Synaptophysin (1:200, Abcam), Alexa 647 anti-rabbit (1:200), Alexa 488 anti-rabbit (1:200). Окрашенные срезы заключали в среду Shandon Immu-Mount, визуализировали при помощи конфокального сканирующего микроскопа LSM 510-Meta (Carl Zeiss). Исследовали зубчатую извилину, CA1, CA3 зоны гиппокампа, кору больших полушарий головного мозга. Оценивали среднюю плотность свечения при помощи программы ImagePro. Значение плотности выражали в условных единицах (шкала от 0 до 255 для 8-битных изображений, где 0 – черный, а 255 – белый). Результаты морфометрии обрабатывали с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Бонферрони или U-критерия Манна-Уитни, отличия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Электрофизиологическое исследование синаптической пластичности

Известно о положительном влиянии инъекций в кровотоки мононуклеарных клеток пуповинной крови человека на память мышей с генетическими моделями болезни Альцгеймера [Darlington et al., 2013; Petukhova et al., 2019; Петухова с соавт., 2014]. Однако не освещено, меняются ли при этом параметры синаптической пластичности. В связи с этим нами была поставлена задача оценить эффекты трансплантации генно-клеточных конструкций на кратковременную и долговременную синаптическую пластичность.

**1.1. Анализ кратковременной синаптической пластичности.** Кратковременную синаптическую пластичность оценивали в экспериментах с парной и ритмической стимуляцией. При подаче на пресинаптическое волокно двух или более последовательных раздражений с коротким интервалом ответ на каждое последующее раздражение может меняться. В основе этого явления лежит ряд событий. Основными из них являются: накопление остаточного кальция, истощение пула везикул, готовых к высвобождению, активация пресинаптических рецепторов, изменение чувствительности рецепторов к медиатору и др. [Zucker et al., 2002].

**Парная фасилитация.** Парную фасилитацию измеряли при следующих временных интервалах: 400 мс, 100 мс, 50 мс и 30 мс. Значения амплитуд вызванных локальных полевых потенциалов, полученных в ответ на второй стимул, представили в долях относительно

амплитуд, полученных в ответ на первый. У APP/PS1 мышей парная фасилитация в CA1 зоне гиппокампа не отличалась от показателей мышей дикого типа. В группе «WT» относительная амплитуда второго ответа при интервалах между раздражениями в 400 мс, 100 мс, 50 мс и 30 мс составила  $1.17 \pm 0.01$ ,  $1.6 \pm 0.02$ ,  $1.9 \pm 0.02$  и  $1.98 \pm 0.02$ , соответственно, а в группе «Alz»:  $1.16 \pm 0.01$ ,  $1.58 \pm 0.02$ ,  $1.87 \pm 0.02$  и  $1.94 \pm 0.03$ , соответственно. Парная фасилитация у APP/PS1 мышей не менялась после трансплантации генно-клеточных конструкций. В группе «Alz-EGFP» относительная амплитуда второго ответа составила  $1.17 \pm 0.01$ ,  $1.59 \pm 0.03$ ,  $1.95 \pm 0.06$  и  $2.05 \pm 0.06$  при интервалах 400 мс, 100 мс, 50 мс и 30 мс, соответственно, а в группе «Alz-GDNF» -  $1.18 \pm 0.02$ ,  $1.55 \pm 0.03$ ,  $1.81 \pm 0.06$  и  $1.98 \pm 0.06$ , при соответствующих интервалах.

**Ритмическая стимуляция.** Для оценки кратковременной синаптической пластичности применяли также протоколы постоянной электрической стимуляции коллатералей Шаффера в течение 4 секунд с различными частотами (5, 10 и 40 Гц). Анализировали изменение амплитуды вызванных локальных полевых потенциалов (вЛПП) в течение ритмической стимуляции. Амплитуду ответов нормализовали относительно первого вЛПП [Sun et al., 2017].

При 4-х секундной стимуляции с частотой 5, 10 и 40 Гц достоверных отличий в динамике изменения амплитуд между APP/PS1 мышами и мышами дикого типа нами обнаружено не было (рис. 1).

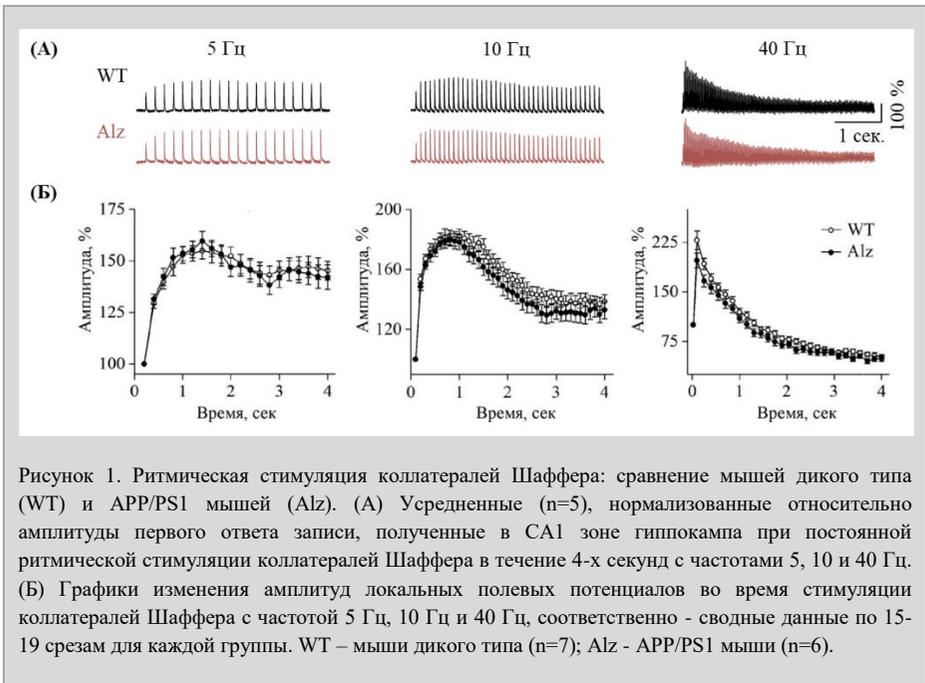


Рисунок 1. Ритмическая стимуляция коллатералей Шаффера: сравнение мышей дикого типа (WT) и APP/PS1 мышей (Alz). (А) Усредненные ( $n=5$ ), нормализованные относительно амплитуды первого ответа записи, полученные в CA1 зоне гиппокампа при постоянной ритмической стимуляции коллатералей Шаффера в течение 4-х секунд с частотами 5, 10 и 40 Гц. (Б) Графики изменения амплитуд локальных полевых потенциалов во время стимуляции коллатералей Шаффера с частотой 5 Гц, 10 Гц и 40 Гц, соответственно - сводные данные по 15-19 срезам для каждой группы. WT – мыши дикого типа ( $n=7$ ); Alz - APP/PS1 мыши ( $n=6$ ).

Следовательно, в данных группах нет различий в динамике истощения готового к высвобождению пула везикул, скорости рециклирования везикул, эффективности удаления внутриклеточного кальция, и других, связанных с кратковременной синаптической пластичностью, событиях.

У APP/PS1 мышей после трансплантации конструкции МКПК-Ad5-EGFP динамика изменения амплитуд при высокочастотной стимуляции (10 Гц и 40 Гц) лишь незначительно отличалась от мышей, не получивших лечения. Следовательно, скорость рециклирования везикул и размеры рециклирующего и готового к высвобождению везикулярных пулов в этих группах практически одинаковы. При низкой частоте стимуляции в группе «Alz-EGFP» фронт спада становился более глубоким, чем в группе «Alz» (хотя при стимуляции с частотой 40 Гц он был даже несколько выше), а фронт нарастания полностью совпадал (рис. 2). Это позволяет предположить, что изменения, наблюдаемые при низкочастотной стимуляции, могут быть связаны с гомеостазом кальция (более высокая активность АТФ-зависимых кальциевых насосов) или сетевыми явлениями, вызванными тормозной системой мозга. Если бы отличия были в работе кальциевых буферных систем, то различался бы фронт нарастания: кальциевые буферные системы срабатывают быстро - в течение нескольких миллисекунд [Faas et al., 2011].

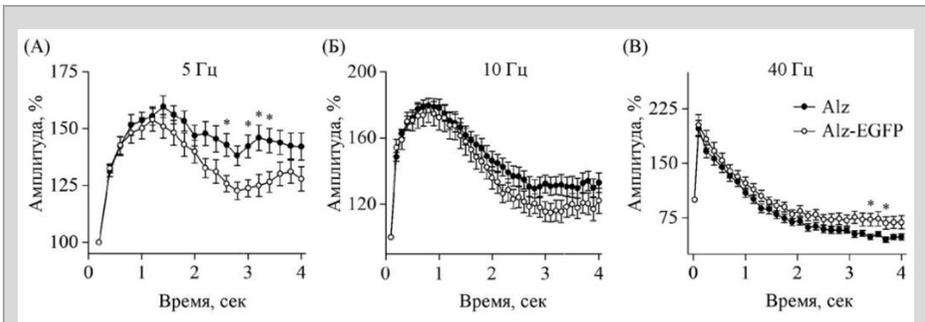


Рисунок 2. Ритмическая стимуляция коллатералей Шаффера: сравнение интактных APP/PS1 мышей и APP/PS1 мышей после трансплантации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека (МКПК), экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок (EGFP). А-В - графики изменения амплитуд локальных полевых потенциалов во время стимуляции коллатералей Шаффера с частотами 5 Гц, 10 Гц и 40 Гц, соответственно - сводные данные по 14-20 срезам для каждой группы. Alz - APP/PS1 мыши (n=6). Alz-EGFP - APP/PS1 мыши после трансплантации МКПК, экспрессирующих EGFP (n=4). \* Статистически достоверное отличие по U-критерию Манна-Уитни ( $p < 0.05$ ).

В группе «Alz-GDNF» амплитуды локальных полевых потенциалов во время ритмической стимуляции не отличались достоверно ни от группы «Alz», ни от группы «Alz-

EGFP». Следовательно, трансплантация генно-клеточной конструкции МКПК-Ad5-GDNF не влияла на параметры кратковременной синаптической пластичности в CA1 зоне гиппокампа APP/PS1 мышей.

**1.2. Изучение долговременной потенциации.** Долговременная потенция (ДВП) - это стойкое усиление передачи сигнала через синапсы, вызванное предшествующими паттернами активности. В настоящей работе протестирована N-метил-D-аспартат (NMDA) рецептор-зависимая синаптическая потенция. При индукции этого вида ДВП применяются различные протоколы высокочастотной стимуляции в целях обеспечения достаточного уровня деполяризации постсинаптических мембран, необходимого для активации NMDA-рецепторов. Активация NMDA рецепторов обеспечивает приток кальция в постсинаптические окончания, что служит пусковым механизмом для ДВП. В результате в постсинаптическую мембрану встраиваются новые AMPA рецепторы, фосфорилируются AMPA- и NMDA-рецепторы, что позволяет им дольше оставаться открытыми после активации, а также запускается синтез различных синаптических белков.

Долговременную потенцию индуцировали «тета-всплесками» - 10 пачек из 5 стимулов с частотой 100 Гц с интервалами между ними 100 мс. Такие всплески высокочастотной стимуляции напоминают импульсные разряды (комплексные спайки) пирамидных нейронов гиппокампа. Одного всплеска недостаточно для индукции ДВП, т.к. он активирует не только возбуждающие, но и тормозные пути, что ограничивает постсинаптическую деполяризацию. Всплески, повторяющиеся с частотой эндогенного тета-ритма (~ 4-8 Гц), вызывают максимальную ДВП, в первую очередь потому, что эта частота отключает постсинаптическое торможение (англ. - feed-forward inhibition), позволяя легче достичь необходимого уровня деполяризации для активации потенциал-зависимых NMDA рецепторов. Процесс растормаживания вовлекает пресинаптические ауторецепторы ГАМК, которые ингибируют высвобождение ГАМК. Поэтому стимуляция тета-всплесками более эффективна при индукции ДВП, чем другие виды стимуляции [Larson et al., 2015].

Известно, что используемая в работе трансгенная линия мышей (B6C3 - Tg(APP695)85Dbo Tg(PSENI)85Dbo) проявляет нарушения памяти, которые идентифицируются в поведенческих тестах. Однако долговременная потенция у них либо вовсе не отличается от здоровых мышей, либо снижена недостоверно в зависимости от применяемого протокола стимуляции [Marchetti et al., 2011]. Недостоверное снижение ДВП показано при однократной стимуляции с частотой 100 Гц в течение 1 секунды. Тенденция к снижению долговременной потенциации возникает рано, но не прогрессирует с возрастом животных [Volianskis et al., 2010].

В наших исследованиях мы запускали протокол стимуляции «тета-всплесками» 3 раза с интервалом 10 с. До и после стимуляции запись вызванных ответов проводили с частотой 0.033

Гц (1 раз в 30 секунд). Силу стимуляции устанавливали на уровне 2 пороговых значений. Результаты представили в процентах относительно амплитуд до предъявления тета-всплесков

У 8-месячных APP/PS1 мышей, несмотря на то, что у них имелось массивное накопление амилоидных бляшек, долговременная потенция, индуцированная тета-всплесками, не отличалась от мышей дикого типа. В первые три минуты амплитуда вызванных локальных полевых потенциалов в группе мышей дикого типа составила  $225.8 \pm 13.6\%$  от исходного уровня, а в группе «Alz» -  $222 \pm 17.5\%$ . К 30-ой минуте значения амплитуд в данных группах составили  $187.8 \pm 8.4\%$  и  $189.6 \pm 18.8\%$ , соответственно; к 60-ой минуте:  $177.8 \pm 9.8\%$  и  $180.7 \pm 8.4\%$ , соответственно. Следовательно, непосредственно механизм формирования долговременной потенции у APP/PS1 мышей не изменен (рис. 3).

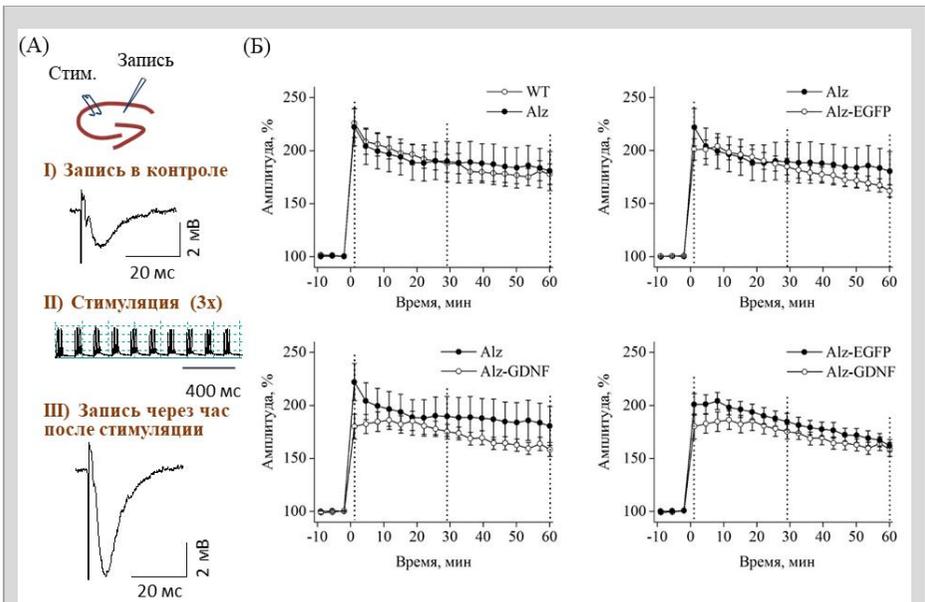


Рисунок 3. Долговременная потенция в СА1 зоне гиппокампа. (А) Расположение стимулирующего (Стим.) и полевых регистрирующего (Запись) электродов. (I, III) – примеры вызванных локальных полевых потенциалов (вЛПП) - усредненные записи по 5 отдельным вЛПП до и после стимуляции тета-всплесками (II), полученные от APP/PS1 мыши. (Б) Графики изменения амплитуды вызванных полевых постсинаптических потенциалов после стимуляции «тета-всплесками», момент стимуляции - 0 мин. (усредненные данные по 10-28 срезам). WT – мыши дикого типа (n=8), Alz - APP/PS1 мыши (n=6), Alz-EGFP - APP/PS1 мыши после трансплантации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека (МКПК), экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок (EGFP) (n=4). Alz-GDNF - APP/PS1 мыши после трансплантации МКПК, экспрессирующих глиальный нейротрофический фактор (GDNF) (n=4).

Трансплантация мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, экспрессирующих как зеленый флуоресцентный белок, так и глиальный нейротрофический фактор, не модулировала долговременную потенциацию в CA1 зоне гиппокампа. В группе «Alz-EGFP» через 1,5, 30 и 60 минут после стимуляции амплитуда вызванных постсинаптических потенциалов составила:  $201 \pm 10.1\%$ ,  $184.7 \pm 7.8\%$  и  $162 \pm 5.7\%$ , соответственно, а в группе «Alz-GDNF» в это же время -  $180.3 \pm 11.7\%$ ,  $175.4 \pm 6.9\%$  и  $158.7 \pm 6.6\%$ , соответственно (рис. 3).

## 2. Анализ экспрессии синаптических белков

При болезни Альцгеймера происходит утрата синаптических контактов, коррелирующая со степенью нарушения когнитивных функций. Электронно-микроскопический анализ мозговой ткани пациентов с легкой и умеренной формой болезни Альцгеймера показал прогрессирующую потерю синапсов в гиппокампе, лобной, нижней теменной и энторинальной коре [Scheff et al., 2007; Scheff et al., 2006]. В CA1 области гиппокампа у субъектов с легкими когнитивными нарушениями (MCI) количество синапсов снижено на 18%, а у субъектов с умеренной формой болезни Альцгеймера – на 55% [Scheff et al., 2007]. Плотность дендритных шипиков и количество синаптических контактов снижено в непосредственной близости к амилоидным бляшкам [Dong et al., 2007]. Уже на ранней стадии мышинной модели болезни Альцгеймера с семейной формой мутации белка предшественника амилоида hAPP (“J20”) показано снижение экспрессии синаптических белков (PSD-Zip45, PSD95 и синаптогамина) в гиппокампе. Утрата синапсов происходила до момента отложения амилоидных бляшек в мозге [Hong et al., 2016].

Следующим этапом нашей работы стало определение влияния генно-клеточной терапии на молекулярные показатели синаптической пластичности, а именно – экспрессию ключевых синаптических белков – синаптофизина и белка постсинаптической плотности – 95 (англ. postsynaptic density-95, PSD-95). Синаптофизин - это белок, локализованный на мембране синаптических везикул. Снижение экспрессии синаптофизина коррелирует с выраженностью когнитивных нарушений у пациентов с болезнью Альцгеймера [Terry et al., 1991]. PSD-95 является частью белкового комплекса постсинаптической плотности, имеющего цитоскелетную специализацию. Постсинаптическая плотность принимает участие в организации рецепторов на постсинаптической мембране и определяет мощность передачи сигнала через синапс. PSD-95, в частности, - это мембраносвязанная гуанилаткиназа, функцией которой является связывание или стабилизация различных мембранных белков и сигнальных молекул в пределах постсинаптической плотности [Sheng et al., 2011]. По изменению уровня экспрессии синаптофизина и PSD-95 можно судить о количественных или качественных изменениях в синапсах. Экспрессию синаптических белков оценивали в гиппокампе – структуре, принимающей непосредственное участие в формировании памяти. Для этого применили два метода - иммуно-блот и иммуногистохимия.

## 2.1. Количественный анализ экспрессии синаптических белков.

**PSD-95.** У мышей с моделью болезни Альцгеймера количество PSD-95 в гиппокампе составило  $76.47 \pm 9.30\%$  относительно показателей группы «WT», однако отличия не были статистически достоверны. Трансплантация МКПК, экспрессирующих EGFP, не влияла на уровень экспрессии PSD-95. Достоверное увеличение количества PSD-95 отмечено в группе «Alz-GDNF»:  $160.10 \pm 19.20\%$  (рис. 4).

**Синаптофизин.** Количество синаптофизина в гиппокампе APP/PS1 мышей составило  $69.06 \pm 12.12\%$ , но отличия от мышей дикого типа достоверными не были ( $p=0.66$ ). У APP/PS1 мышей после трансплантации конструкции МКПК-ad5-EGFP количество синаптофизина в гиппокампе имело тенденцию к увеличению ( $103.44 \pm 11.94\%$ ). Достоверно увеличивалось количество синаптофизина у APP/PS1 мышей после трансплантации МКПК-ad5-GDNF:  $227.79 \pm 24.08\%$  (рис. 4).

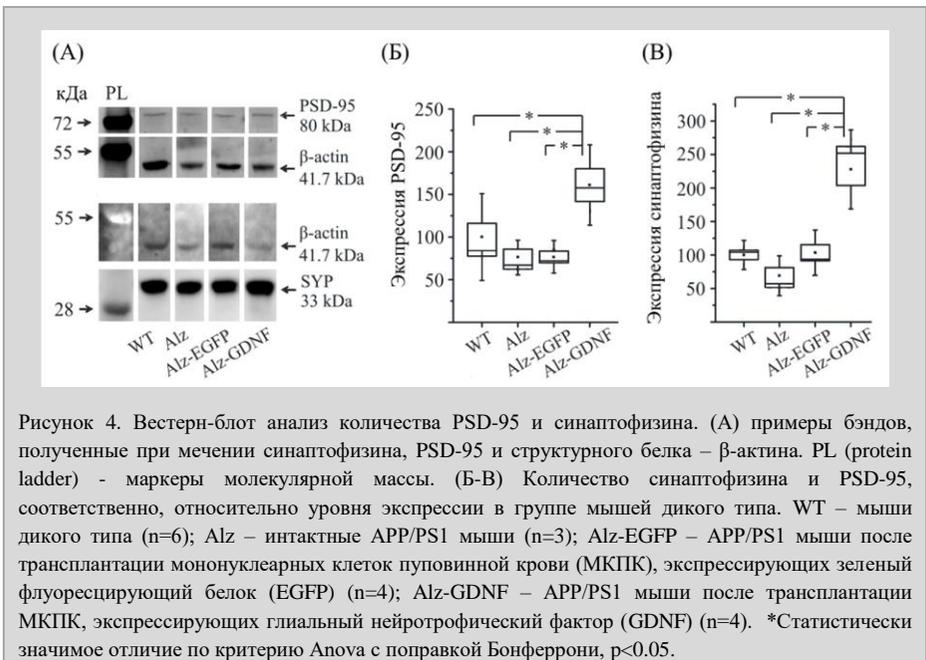


Рисунок 4. Вестерн-блот анализ количества PSD-95 и синаптофизина. (А) примеры бэндов, полученные при мечении синаптофизина, PSD-95 и структурного белка –  $\beta$ -актина. PL (protein ladder) - маркеры молекулярной массы. (Б-Б) Количество синаптофизина и PSD-95, соответственно, относительно уровня экспрессии в группе мышей дикого типа. WT – мыши дикого типа ( $n=6$ ); Alz – интактные APP/PS1 мыши ( $n=3$ ); Alz-EGFP – APP/PS1 мыши после трансплантации мононуклеарных клеток пуповинной крови (МКПК), экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок (EGFP) ( $n=4$ ); Alz-GDNF – APP/PS1 мыши после трансплантации МКПК, экспрессирующих глиальный нейротрофический фактор (GDNF) ( $n=4$ ). \*Статистически значимое отличие по критерию Anova с поправкой Бонферрони,  $p<0.05$ .

## 2.2. Полуколичественный анализ экспрессии синаптических белков методом иммуногистохимии.

Экспрессию синаптических белков оценивали по средней плотности свечения после иммунофлуоресцентного окрашивания. Исследовали зубчатую извилину, CA1, CA3 и CA4 зоны гиппокампа.

**PSD-95.** У APP/PS1 мышей средняя плотность свечения PSD-95 в зубчатой извилине, CA3 и CA4 зонах гиппокампа была достоверно ниже, чем у мышей дикого типа ( $p < 0.05$ ). Трансплантация генно-клеточной конструкции МКПК-Ad5-EGFP не влияла на иммунофлуоресценцию PSD-95. В группе APP/PS1 мышей после трансплантации МКПК-Ad5-GDNF средняя плотность свечения PSD-95 была достоверно выше, чем у мышей, не получивших лечения, во всех исследованных областях гиппокампа (рис. 5).

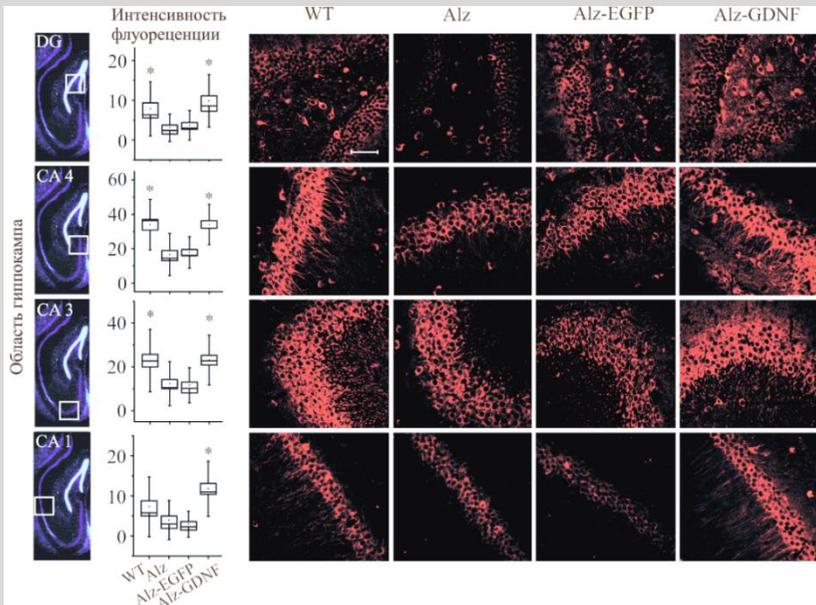


Рисунок 5. Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов гиппокампа на PSD-95 (белок постсинаптической плотности). Красный – свечение PSD-95. Синий – свечение ядер (окрашивание DAPI); белая рамка показывает область, взятую для анализа интенсивности свечения исследуемого белка. Значения интенсивности свечения выражали в условных единицах (шкала от 0 до 255 для 8-битных изображений, где 0 – черный, а 255 – белый). WT – мыши дикого типа (n=4); Alz – интактные APP/PS1 мыши (n=4); Alz-EGFP – APP/PS1 мыши после трансплантации мононуклеарных клеток пуповинной крови (МКПК), экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок (EGFP) (n=4); Alz-GDNF – APP/PS1 мыши после трансплантации МКПК, экспрессирующих глиальный нейротрофический фактор (GDNF) (n=4). \*Статистически значимое отличие от показателей мышей группы «Alz» по критерию Anova,  $p < 0.05$ . Коронарные срезы головного мозга на уровне от -1.5 до -2.3 мм от брегмы. Масштабная линейка: 50 мкм.

**Синаптофизин.** В зубчатой извилине средняя плотность свечения синаптофизина у мышей с моделью БА и мышей дикого типа не различалась ( $13.3 \pm 2.2$  о.е. и  $17.4 \pm 2.2$  о.е., соответственно). В группе «Alz-EGFP» изменений в иммуноэкспрессии синаптофизина в данной

области гиппокампа не было ( $17.5 \pm 2.1$ ). У APP/PS1 мышей после трансплантации генно-клеточной конструкции МКПК-ad5-GDNF значения средней плотности свечения синаптофизина в зубчатой извилине были достоверно выше, чем у мышей, не получивших лечения ( $21.10 \pm 2.38$  о.е.). В CA1 зоне гиппокампа отличий в плотности свечения синаптофизина у APP/PS1 мышей и мышей дикого типа не было ( $13.89 \pm 2.61$  о.е. и  $12.97 \pm 2.72$  о.е., соответственно). Трансплантация МКПК, экспрессирующих как EGFP, так и GDNF, не оказывала значительного влияния на иммуноэкспрессию исследуемого белка ( $17.17 \pm 3.17$  о.е. и  $18.22 \pm 2.64$  о.е., соответственно). В CA3 зоне гиппокампа средняя плотность свечения синаптофизина не различалась у мышей с моделью БА и мышей дикого типа ( $16.72 \pm 2.30$  о.е. и  $17.16 \pm 1.89$  о.е., соответственно). Трансплантация исследуемых генно-клеточных конструкций не повлияла на уровень свечения синаптофизина в данном регионе. Так, в группе «Alz-EGFP» средняя плотность свечения составила  $21.36 \pm 2.76$  о.е., в группе «Alz-GDNF» -  $21.04 \pm 2.61$  о.е. В CA4 зоне гиппокампа средняя плотность свечения синаптофизина у мышей с моделью БА и мышей дикого типа не различалась ( $18.83 \pm 2.103$  о.е. и  $22.87 \pm 2.83$  о.е., соответственно), а трансплантация генно-клеточных конструкций не изменила иммуноэкспрессию. В группе «Alz-EGFP» средняя плотность свечения составила  $24.84 \pm 3.27$  о.е., в группе «Alz-GDNF» -  $20.35 \pm 2.51$  о.е. Таким образом, в гиппокампе средняя плотность свечения синаптофизина достоверно не отличалась у мышей дикого типа и мышей с моделью болезни Альцгеймера. Значительных изменений плотности свечения данного белка в группах «Alz-GDNF» и «Alz-EGFP» выявлено не было.

### 3. Модуляция глиоза у мышей с моделью болезни Альцгеймера

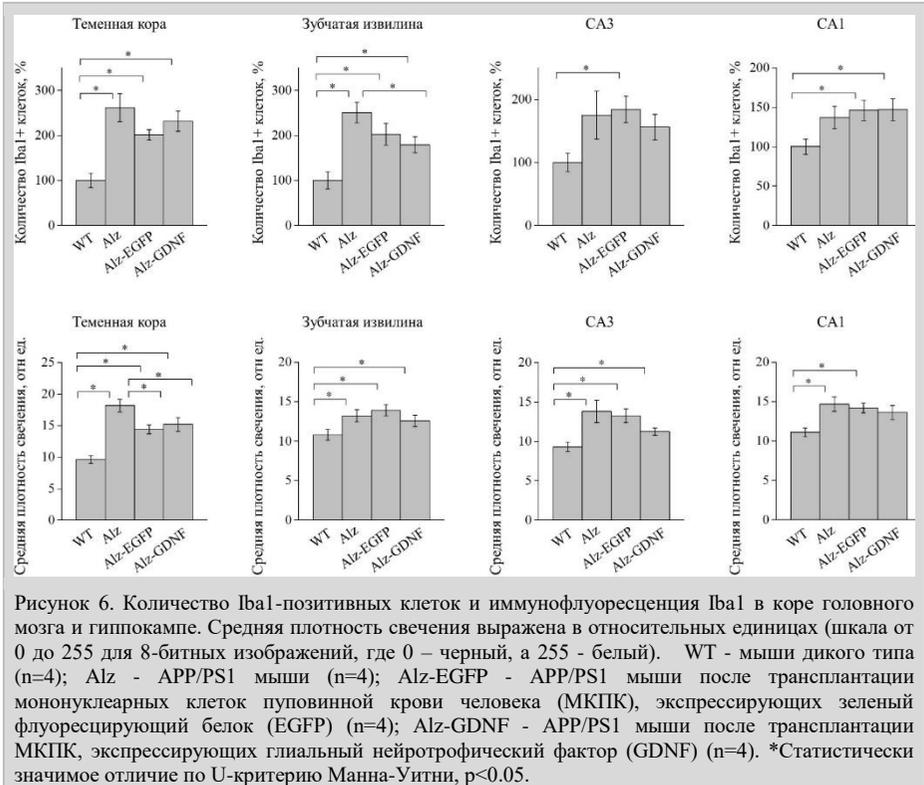
Нейровоспаление при болезни Альцгеймера опосредовано дисфункцией миелинозных клеток (преимущественно микроглии) и астроцитов. Нарушение функции глиальных клеток поддерживает и ускоряет течение болезни. Многочисленные исследования указывают на перспективность модуляции иммунной реакции в качестве мишени для разработки терапевтических стратегий против БА [Heppner *et al.*, 2015].

Известно, что системное введение моноклеарных клеток пуповинной крови человека в моделях болезни Альцгеймера на мышах способно модулировать иммунные реакции и таким образом влиять на ход развития нейродегенеративных процессов. На двух трансгенных линиях мышей с генетическими моделями болезни Альцгеймера (APP/PS1 и Tg2576) показаны следующие эффекты периферической трансплантации МКПК: снижение воспаления и микроглиоза, снижение отложений бета-амилоида в сосудах и матриксе мозга, улучшение памяти [Darlinton *et al.*, 2013; Nikolic *et al.*, 2008; Петухова с соавт., 2014]. С другой стороны, исследования Rocha S.M. показали, что GDNF, выделяемый астроцитами, является мощным блокатором активации микроглии [Rocha *et al.*, 2012]. В связи с этим следующей нашей задачей стала оценка влияния генно-клеточных конструкций на глиоз у мышей с генетической моделью

болезни Альцгеймера. Для оценки степени глиоза был применен метод иммуногистохимии. Миелоидные клетки метили антителами к Iba1, астроциты – антителами к GFAP. Провели подсчет клеток глии, ядра которых находились в проекции среза, на площади 228.6x228.6 мкм в теменной коре, зубчатой извилине, CA3 и CA1 зонах гиппокампа, а также оценили среднюю плотность свечения в этих участках. Количество клеток в группе мышей дикого типа приняли за 100%. Результаты, полученные в остальных группах, нормализовали относительно контроля. Значения плотности свечения выражали в условных единицах (шкала от 0 до 255 для 8-битных изображений, где 0 – черный, а 255 – белый).

Iba1 (англ. - ionized calcium binding adaptor molecule 1) – это специфичный для макрофагов и микроглии кальций-связывающий белок. При наличии в мозге воспалительных процессов количество Iba1-позитивных клеток увеличивается. У мышей с моделью болезни Альцгеймера иммунофлуоресценция Iba1 во всех исследованных областях была достоверно выше, чем у мышей дикого типа. При этом количество Iba1-позитивных клеток достоверно отличалось только в коре и зубчатой извилине. В CA1 и CA3 зонах гиппокампа количество Iba1-позитивных клеток хотя и было несколько выше, но отличия не являлись статистически значимыми (рис. 6). Активированная микроглия отличается повышенной экспрессией Iba1. В CA1 и CA3 зонах гиппокампа воспалительная реакция со стороны микроглии проявилась в большей степени увеличением количества ее активированных форм, нежели общего числа. Трансплантация мононуклеарных клеток пуповинной крови человека не приводила к изменению количества Iba1-позитивных клеток в мозге APP/PS1 мышей. Иммунофлуоресценция Iba1 не менялась в гиппокампе, однако в теменной коре была достоверно ниже, что предполагает снижение активации микроглии в этой области. Генно-клеточная конструкция, экспрессирующая глиальный нейротрофический фактор, также способствовала снижению иммуноэкспрессии Iba1 в коре головного мозга, но не меняла количество Iba1-позитивных клеток. В CA1 и CA3 зонах гиппокампа не было изменений ни в количестве клеток, ни в экспрессии Iba1. В зубчатой извилине количество Iba1-позитивных клеток было достоверно меньшим при неизменной экспрессии Iba1. Статистически значимых различий в эффектах между конструкциями МКПК-ad5-EGFP и МКПК-ad5-GDNF не было (рис 6).

Таким образом, обе генно-клеточные конструкции, ингибировали активацию микроглии в коре головного мозга мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера. Генно-клеточная конструкция, экспрессирующая GDNF, приводила к уменьшению количества Iba1-позитивных клеток в зубчатой извилине. Конструкция МКПК-ad5-EGFP хотя и несколько снижала количество Iba1-позитивных клеток в зубчатой извилине, но отличия от APP/PS1 мышей, не получивших лечение, не было статистически значимым.



GFAP (англ. – glial fibrillary acidic protein), глиальный фибриллярный кислый белок, является промежуточным филаментом типа III, применяется в качестве маркера астроцитов в головном мозге [Messing *et al.*, 2020]. В норме не во всех астроцитах GFAP экспрессируется в детектируемых методами иммуногистохимии количествах. Активированные астроциты увеличивают экспрессию GFAP, что позволяет использовать этот белок в качестве маркера воспалительных процессов в мозге. Экспрессию GFAP, а также количество GFAP-позитивных клеток оценивали в теменной коре, в CA1 и CA3 зонах гиппокампа. GFAP экспрессируется в субгранулярной зоне гиппокампа в недифференцированных клетках, в связи с этим зубчатая извилина была исключена из анализа.

У APP/PS1 мышей относительно мышей дикого типа иммуноэкспрессия GFAP и количество GFAP-позитивных астроцитов было достоверно выше в теменной коре и CA3, но не в CA1 зоне гиппокампа. Трансплантация мышам с моделью болезни Альцгеймера МКПК, экспрессирующих EGFP, не влияла на количество астроцитов и на уровень экспрессии GFAP в теменной коре и CA3 зоне гиппокампа. Однако в CA1 зоне как количество астроцитов, так и

экспрессия GFAP в этой группе были достоверно ниже, чем у мышей, не получивших лечения. Однако тут стоит обратить внимание, что у APP/PS1 мышей в данной зоне количество GFAP-позитивных клеток не изменено значительно относительно мышей дикого типа. Мононуклеарные клетки пуповины крови, экспрессирующие глиальный нейротрофический фактор, не влияли достоверно на количество GFAP-позитивных астроцитов и на экспрессию GFAP в теменной коре и CA1 гиппокампа APP/PS1 мышей. В CA3 зоне гиппокампа было достоверно меньшим количество GFAP-позитивных астроцитов при неизменной общей иммуноэкспрессии GFAP. Эффекты генно-клеточной конструкции МКПК-Ad5-GDNF на экспрессию GFAP и количество GFAP-позитивных астроцитов не отличались от эффектов конструкции МКПК-ad5-EGFP. Таким образом, обе генно-клеточные конструкции мало влияли на астроглиоз в головном мозге APP/PS1 мышей.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании проанализированы эффекты применения мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, сверхэкспрессирующих глиальный нейротрофический фактор, при лечении болезни Альцгеймера в модели на мышах. Были приготовлены две генно-клеточные конструкции: мононуклеарные клетки пуповинной крови человека (МКПК), трансдуцированные аденовирусным вектором, кодирующим зеленый флуоресцирующий белок (МКПК-Ad5-EGFP) и МКПК, трансдуцированные аденовирусным вектором, кодирующим GDNF (МКПК-Ad5-GDNF). Успешность трансдукции подтверждалась в экспериментах *in vitro*. Генно-клеточная конструкция МКПК-Ad5-EGFP использовалась для выявления собственных эффектов мононуклеарных клеток пуповинной крови человека.

Ранее мы показали, что трансплантация мононуклеарных клеток пуповинной крови, экспрессирующих как репортерный зеленый флуоресцирующий белок, так и GDNF, приводила к улучшениям пространственной рабочей памяти APP/PS1 мышей [Petukhova et al., 2019]. Такого рода функциональные изменения опосредуются пластическими изменениями на уровне синапсов, нейронов, на модальном уровне (локальные нейронные сети) и на мультимодальном уровне (взаимодействие между отделами головного мозга, полями) [Mauford et al., 2012].

Чтобы определить наличие корреляции между улучшениями памяти и пластическими изменениями на синаптическом уровне, была проведена оценка экспрессии ключевых синаптических белков (синаптофизина и PSD-95), а также оценка синаптической пластичности в гиппокампе (структуре, напрямую вовлеченной в процессы консолидации памяти). Поскольку известно, что при БА уже на ранних ее этапах критическую роль в дегенерации синаптических контактов и нарушении синаптической функции играет нейровоспаление [Furman et al., 2012; Hong et al., 2016], нами было изучено влияние генно-клеточных конструкций на степень астро- и микроглиоза.

Трансплантация генно-клеточной конструкции МКПК-Ad5-GDNF не влияла на кратковременную и долговременную синаптическую пластичность в CA1 зоне гиппокампа APP/PS1 мышей, однако приводила к структурным изменениям в синапсах, выражаемым увеличением экспрессии синаптических белков, а также снижала выраженность микроглиоза в головном мозге. На экспрессию синаптических белков генно-клеточная конструкция может оказывать влияние через сверхэкспрессию глиального нейротрофического фактора [Ledda et al., 2007] и снижение активации микроглии [Hong et al., 2016].

### **ВЫВОДЫ**

1. Трансплантация генно-клеточной конструкции МКПК-Ad5-GDNF не влияла на кратковременную синаптическую пластичность в CA1 зоне гиппокампа APP/PS1 мышей.
2. Трансплантация генно-клеточной конструкции МКПК-Ad5-GDNF не влияла на вызванную NMDA-зависимую долговременную потенциацию в CA1 зоне гиппокампа APP/PS1 мышей.
3. Конструкция МКПК-Ad5-GDNF приводила к увеличению экспрессии синаптофизина и PSD-95 в гиппокампе APP/PS1 мышей.
4. Конструкция МКПК-Ad5-GDNF снижала активацию микроглии в коре головного мозга и зубчатой извилине гиппокампа APP/PS1 мышей.
5. Конструкция МКПК-Ad5-GDNF не влияла на микроглиоз в CA1 и CA3 зонах гиппокампа APP/PS1 мышей.
6. Конструкция МКПК-Ad5-GDNF не влияла на астроглиоз в коре головного мозга и гиппокампе APP/PS1 мышей.

### **РЕКОМЕНДАЦИИ**

Полученные научные данные имеют важное значение для нейрофизиологии и фундаментальной медицины, расширяют современные представления о функционировании нервной системы в норме и патологии, а также создают предпосылки для разработки новых подходов к лечению болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний.

### **СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

#### **Статьи в рецензируемых изданиях:**

1. **Петухова Е.О.** Трансплантация мононуклеарных клеток пуповинной крови человека улучшает пространственную память у APP/PS1 трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера / **Е.О. Петухова**, Я.О. Мухамедшина, А.А. Ризванов, А.Р. Мухитов, А.Л. Зефирова, Р.Р. Исламов, М.А. Мухамедьяров // *Гены и клетки*. – 2014. – Т. 9, № 3. – С. 40-45. (Статья Scopus, ВАК), автора – 0,2 п.л.

2. **Петухова Е.О.** Стимулирование нейрогенеза в гиппокампе при болезни Альцгеймера / **Е.О. Петухова**, Я.О. Мухамедшина, О.Ю. Васильева, Л.Ю. Аксенова, В.В. Соловьева, Е.Е. Гаранина, А.А. Ризванов, А.Л. Зефирова, Р.Р. Исламов, М.А. Мухамедьяров // *Гены и клетки*. – 2015. – Т. 10, № 4. – С. 54-59. (Статья Scopus, ВАК), автора – 0,2 п.л.

3. Мухамедьяров М.А. Периферическая дисфункция как один из механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний / М.А. Мухамедьяров, А.В. Мартынов, **Е.О. Петухова**, П.Н. Григорьев, Р.А. Эшпай, А.А. Ризванов, А.Л. Зефирова // *Гены и клетки*. – 2015. – Т. 10, № 4. – С. 8-14. (Статья Scopus, ВАК), автора – 0,1 п.л.

4. Mukhamedyarov M.A. Intravenous Transplantation of Human Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells Overexpressing Nerve Growth Factor Improves Spatial Memory in APP/PS1 Transgenic Mice with a Model of Alzheimer's Disease / М.А. Mukhamedyarov, A.V. Leushina, A.E. Tikhonova, **Е.О. Petukhova**, E.E. Garanina, R. Ben Taleb, M.S. Kaligin, Y.O. Mukhamedshina, A.A. Rizvanov, A.L. Zefirov, R.R. Islamov // *BioNanoScience*. – 2018. – V. 8. – P. 473–480 (Статья Scopus), автора – 0,1 п.л.

5. **Petukhova E.O.** Effects of Transplanted Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells Overexpressing GDNF on Spatial Memory and Hippocampal Synaptic Proteins in a Mouse Model of Alzheimer's Disease / **Е.О. Petukhova**, Y.O. Mukhamedshina, I.I. Salafutdinov, E.E. Garanina, M.S. Kaligin, A.V. Leushina, A.A. Rizvanov, H.J. Reis, A. Palotás, A.L. Zefirov, M.A. Mukhamedyarov // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2019. – V. 69, № 2. – P. 443-453. (Статья Scopus, WoS), автора – 0,34 п.л.

#### **Основные работы, опубликованные в материалах конференций и иных научных изданиях:**

1. **Петухова Е.О.** Нейрогенез в гиппокампе мышей с моделью болезни Альцгеймера после трансплантации мононуклеарных клеток пуповинной крови, экспрессирующих GDNF / **Е.О. Петухова**, Я.О. Мухамедшина, М.А. Мухамедьяров // Сборник тезисов 89-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, 18-й Всероссийской медико-исторической конференции студентов и молодых ученых, посвященных 70-летию Победы в Великой Отечественной войне. 1-2 апреля 2015 г. – Казань: ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 2015. – С. 453-454, автора – 0,06 п.л.

2. **Петухова Е.О.** Влияние трансплантации генетически модифицированных мононуклеарных клеток пуповинной крови (МКПК) на процессы синаптогенеза в гиппокампе трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера / **Е.О. Петухова**, Л.Ю. Аксенова, О.Ю. Васильева // Сборник тезисов 90-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, 19-й Всероссийской медико-исторической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 150-летию со дня рождения профессора Викторина Сергеевича Груздева. 11-13 апреля 2016 г. – Казань: ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 2016. – С. 380-381, автора - 0,06 п.л.

3. Мухамедьяров М.А. Разработка генно-клеточных подходов для лечения болезни Альцгеймера / М.А. Мухамедьяров, **Е.О. Петухова**, А.А. Ризванов, Я.О. Мухамедшина, А.Л. Зефирова, Р.Р. Исламов // *Нейронаука для медицины и психологии: двенадцатый международный междисциплинарный конгресс: в рамках подготовки к XXIII съезду Российского физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2017)*, посвященному 100-летию создания этого общества Иваном Петровичем Павловым, Судак, Крым, Россия, 1-11 июня 2016 г. – М.: Макс-Пресс, 2016. – С. 289, автора - 0,02 п.л.

4. **Петухова Е.О.** Применение мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, трансдуцированных аденовирусными векторами adGDNF для лечения болезни Альцгеймера в модели на трансгенных мышах / **Е.О. Петухова**, Я.О. Мухамедшина, Л.Ю. Аксенова // Сборник тезисов 91-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, 20-й Всероссийской медико-исторической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 160-летию со дня рождения профессора Владимира Михайловича Бехтерева. 11-13 апреля 2017 г. – Казань: ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 2017. – С. 450, автора – 0,03 п.л.

5. **Петухова Е.О.** Разработка генно-клеточной терапии болезни Альцгеймера с применением мононуклеарных клеток пуповинной крови, экспрессирующих глиальный нейротрофический фактор / **Е.О. Петухова**, Я.О. Мухамедшина, А.А. Ризванов, М.А. Мухамедьяров // *Материалы XXIII съезда Физиологического общества имени И.П. Павлова*. 18-22 сентября 2017 г. – Воронеж: Издательство «ИСТОКИ», 2017. – С. 576-578, автора – 0,09 п.л.

6. **Петухова Е.О.** Искусственная доставка GDNF ингибирует активацию микроглии в мозге мышей с моделью болезни Альцгеймера / Сборник тезисов 92-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, 21-й Всероссийской медико-исторической конференции студентов, посвященная 85-летию со дня рождения профессора Ирины Андреевны Студенцовой. 4-6 апреля 2018 г. – Казань: ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 2018. – С. 593, автора – 0,03 п.л.

7. **Петухова Е.О.** Применение мононуклеарных клеток пуповинной крови, сверхэкспрессирующих глиальный нейротрофический фактор, для лечения болезни Альцгеймера в модели на трансгенных мышах / **Е.О. Петухова**, Я.О. Мухамедшина, А.В. Леушина, А.А. Ризванов, А.Л. Зефирова, М.А. Мухамедьяров // *Заболевания мозга: вызов XXI века: Сборник тезисов международной научной конференции-школы молодых ученых*. 16-17 мая 2018 г. – Казань: Издательство ООО "Конвент", 2018. – С. 37-38, автора – 0,06 п.л.

8. **Петухова Е.О.** Применение мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, сверхэкспрессирующих GDNF, для лечения APP/PS1 мышей / **Е.О. Петухова**, Н.В. Михайлова, А.А. Ризванов, М.А. Мухамедьяров // *Гены и клетки*. – 2019. – Т.14, №3. (Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий». Санкт-Петербург, 8–11 октября 2019 г.). – С. 112, автора – 0,03 п.л.

9. **Петухова Е.О.** Оценка терапевтического потенциала мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, сверхэкспрессирующих GDNF, при лечении APP<sup>sw</sup>/PS1<sup>de9</sup> мышей / **Е.О. Петухова**, Я.О. Мухамедшина, Н.В. Михайлова // *Сборник тезисов 93-й Международной студенческой научно-практической конференции, 93-й Международной научно-практической конференции молодых ученых, 22-й Международной медико-исторической конференции студентов, посвященная 125-летию со дня рождения профессора Владимира Александровича Энгельгардта, I Всероссийской практической конференции «Слушаю. Вижу. Лечу»*. 25 ноября 2020 г. – Казань: ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 2020. – С. 168-169, автора – 0,06 п.л.

10. **Петухова Е.О.** Клеточные и молекулярные воздействия мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, сверхэкспрессирующих GDNF, в модели болезни Альцгеймера / **Е.О. Петухова**, М.А. Мухамедьяров // *Физиология человека: материалы III Всероссийской научно-практической конференции / под ред. Е.В. Саперовой*. – Чебоксары: Чуваш. гос. пед. ун-т, 2020. – С. 143-147, автора – 0,2 п.л.

Эл. почта автора: [petukhovaeo@mail.ru](mailto:petukhovaeo@mail.ru).

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский (Приволжский) федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, ученому секретарю Диссертационного совета КФУ.03.06 Аникиной Татьяне Андреевне. Факс: +7 (843) 238-76-01. Эл. почта: [tania57vg1@rambler.ru](mailto:tania57vg1@rambler.ru).