

# ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОТИПА АСТРОЦИТОВ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОТ ЗДОРОВОГО ИНДИВИДА И ОТ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПРОСВЕЧИВАЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

DOI: 10.17691/stm2026.18.1.01

УДК 616.858:620.187:576.5

Поступила 10.06.2025 г.

© **К.А. Кутукова**, младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Института мозга<sup>1</sup>; старший преподаватель кафедры морфологии Института анатомии и морфологии<sup>2</sup>;  
**М.В. Иванов**, младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Института мозга<sup>1</sup>; старший преподаватель кафедры морфологии Института анатомии и морфологии<sup>2</sup>;  
**Е.В. Новосадова**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной дифференцировки<sup>3</sup>; ведущий научный сотрудник лаборатории трансляционной биомедицины<sup>4</sup>;  
**А.В. Брыдун**, к.м.н., научный сотрудник<sup>1</sup>; зав. учебной лабораторией кафедры морфологии Института анатомии и морфологии<sup>2</sup>;  
**Е.Л. Арсеньева**, к.б.н., главный специалист<sup>3</sup>;  
**Л.В. Новосадова**, инженер 1-й категории<sup>3</sup>;  
**И.В. Кокорев**, студент кафедры биотехнологии и промышленной фармации<sup>5</sup>;  
**И.А. Гривенников**, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной нейрогенетики и врожденного иммунитета<sup>3</sup>;  
**В.С. Сухоруков**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией нейроморфологии Института мозга<sup>1</sup>; профессор кафедры морфологии Института анатомии и морфологии<sup>2</sup>;  
**С.Н. Иллариошкин**, д.м.н., профессор, академик РАН, директор Института мозга<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Российский центр неврологии и нейронаук, Волоколамское шоссе, 80, Москва, 125367;

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ул. Островитянова, 1, Москва, 117513;

<sup>3</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», пл. Академика Курчатова, 1, Москва, 123182;

<sup>4</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, ул. Малая Пироговская, 1а, Москва, 119435;

<sup>5</sup>МИРЭА — Российский технологический университет, проспект Вернадского, 78, Москва, 119454

Для контактов: Кутукова Кристина Александровна, e-mail: chrisbiomag@mail.ru

**Цель исследования** — изучить роль просвечивающей электронной микроскопии в оценке фенотипа астроцитов, полученных с помощью технологии направленной дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от здорового донора и от пациента с наследственной формой болезни Паркинсона (БП).

**Материалы и методы.** В работе использованы монослойные культуры астроцитов, дифференцированных из ИПСК от условно здорового донора и от пациента с БП, имеющего мутацию G2019S в гене *LRRK2*. Полученные глиальные культуры были охарактеризованы с помощью ПЦР в режиме реального времени и иммуноцитохимического окрашивания на глияспецифичные гены и белки. Ультраструктура астроцитов была исследована методом просвечивающей электронной микроскопии.

**Результаты.** ПЦР-исследование и иммуноцитохимическое окрашивание показали, что клеточные линии, полученные от условно здорового донора и от пациента с БП, экспрессировали необходимый паттерн глияспецифичных генов и синтезировали белки, характерные для астроцитов. При этом некоторые глияспецифичные гены экспрессировались мутантными клетками на пониженном уровне. Одним из наиболее типичных ультраструктурных признаков астроцитов, полученных из ИПСК от пациента с БП, были деструктивные изменения митохондрий, включающие их просветление, набухание, а также деструкцию крист. Во многих клетках при длительном культивировании митохондрии полностью отсутствовали. Другим характерным признаком клеток с мутацией в гене *LRRK2* было накопление вакуолей с различным по электронной плотности содержимым. Резко выраженные изменения в культуре астроцитов с БП-ассоциированной мутацией в гене *LRRK2* наблюдались и в ультраструктуре ядер, органелл белоксинтезирующего аппарата и элементов цитоскелета. При этом морфометрическое исследование не выявило различий в средних показателях площади клетки, площади ядра, площади цитоплазмы, ядерно-цитоплазматического соотношения между астроцитами контрольной линии и линии с БП-ассоциированной мутацией.

**Заключение.** Использование технологии репрограммирования с получением астроцитов из ИПСК от донора с БП-ассоциированной мутацией в гене *LRRK2* позволяет оценить характер и динамику патологических морфохимических и ультраструктурных изменений, вызванных данной мутацией, в процессе глиогенеза. Применение комплекса методов (ПЦР, иммуноцитохимия, просвечивающая электронная микроскопия) для сравнения культур клеток, дифференцированных из ИПСК, дает возможность оценить, с одной стороны, общие для культуры параметры, например динамику дифференцировки культуры по изменению уровня экспрессии специфических генов и иммуноцитохимических маркеров, с другой — морфофункциональные изменения на уровне индивидуальных клеток. Применение метода просвечивающей электронной микроскопии демонстрирует значительный потенциал для исследования культур клеток, дифференцированных из ИПСК. Этот метод позволяет фенотипировать получившиеся клетки по их ультраструктуре, оценивать степень их морфологической зрелости, выявлять тонкие ультраструктурные изменения клеток как патологического характера, так и связанные с процессом дифференцировки. Результаты, полученные нами в настоящей работе с помощью метода электронной микроскопии и свидетельствующие о выраженном снижении жизнеспособности митохондрий и о других ультраструктурных нарушениях, подтверждают представление о значительной роли астроглии в развитии нейродегенеративного процесса при *LRRK2*-ассоциированной форме БП и могут служить основой для разработки новых подходов и поиска фармакологических мишеней в патогенетической терапии данного заболевания.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; дифференцировка; электронная микроскопия; астроциты; *LRRK2*.

**Как цитировать:** Kutukova K.A., Ivanov M.V., Novosadova E.V., Brydun A.V., Arsenyeva E.L., Novosadova L.V., Kokorev I.V., Grivennikov I.A., Sukhorukov V.S., Illarioshkin S.N. TEM-based study of the phenotype of astrocytes differentiated from induced pluripotent stem cells from a healthy donor and a patient with Parkinson's disease. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2026; 18(1): 5, <https://doi.org/10.17691/stm2026.18.1.01>

Это статья с открытым доступом, распространяемая по лицензии CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## English

# TEM-based Study of the Phenotype of Astrocytes Differentiated from Induced Pluripotent Stem Cells from a Healthy Donor and a Patient with Parkinson's Disease

**K.A. Kutukova**, Junior Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Institute of Brain Research<sup>1</sup>;

Senior Lecturer, Department of Morphology, Institute of Anatomy and Morphology<sup>2</sup>;

**M.V. Ivanov**, Junior Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Institute of Brain Research<sup>1</sup>;

Senior Lecturer, Department of Morphology, Institute of Anatomy and Morphology<sup>2</sup>;

**E.V. Novosadova**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cell Differentiation<sup>3</sup>; Leading Researcher, Laboratory of Translational Biomedicine<sup>4</sup>;

**A.V. Brydun**, MD, PhD, Researcher<sup>1</sup>; Head of the Educational Laboratory, Department of Morphology, Institute of Anatomy and Morphology<sup>2</sup>;

**E.L. Arsenyeva**, PhD, Chief Specialist<sup>3</sup>;

L.V. Novosadova, Engineer, Grade 1<sup>3</sup>;

I.V. Kokorev, Student, Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy<sup>5</sup>;

I.A. Grivennikov, DSc, Professor, Chief Researcher, Laboratory of Molecular Neurogenetics and Natural Immunity<sup>3</sup>;

V.S. Sukhorukov, MD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Neuromorphology, Institute of Brain Research<sup>1</sup>;  
Professor, Department of Morphology, Institute of Anatomy and Morphology<sup>2</sup>;

S.N. Illarioshkin, MD, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences,  
Director of Institute of Brain Research<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Russian Research Center of Neurology and Neurosciences, 80 Volokolamskoye Shosse, Moscow, 125367, Russia;

<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Bldg., 6 Ostrovityanova St., Moscow, 117513, Russia;

<sup>3</sup>National Research Center "Kurchatov Institute", 1 Academician Kurchatov Square, Moscow, 123182, Russia;

<sup>4</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency,  
1a Malaya Pirogovskaya St., Moscow, 119435, Russia;

<sup>5</sup>MIREA — Russian Technological University, 78 Vernadsky Avenue, Moscow, 119454, Russia

**The aim of this study** was to study the role of transmission electron microscopy (TEM) in assessment of the phenotype of astrocytes obtained with the directed differentiation technique from induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a healthy donor and from a patient with a hereditary form of Parkinson's disease (PD).

**Materials and Methods.** Monolayer astrocyte cultures differentiated from iPSCs from a healthy donor and a PD patient having the G2019S mutation in the *LRRK2* gene were used in the study. The obtained glial cultures were characterized using real-time PCR and immunocytochemical staining for glia-specific genes and proteins. TEM was used to examine astrocyte ultrastructure.

**Results.** PCR analysis and immunocytochemical staining demonstrated that cell lines received from a healthy donor and a PD patient expressed the required pattern of glia-specific genes and synthesized astrocyte-specific proteins. However, some glia-specific genes were expressed at reduced levels by mutant cells. One of the most typical ultrastructural features of astrocytes received from iPSCs from a PD patient was destructive changes in mitochondria, including mitochondrial clearing, swelling, and cristae destruction. In many cells, mitochondria were completely absent after a long culturing. Another characteristic feature of cells with a mutation in the *LRRK2* gene was the accumulation of vacuoles with contents of varied electron density. Distinct changes in the ultrastructure of nuclei, protein-synthesizing organelles, and cytoskeletal elements were also seen in cultured astrocytes with a PD-associated *LRRK2* mutation. Here, the morphometric study did not reveal any differences in the average cell area, nuclear area, cytoplasm area, or nuclear-cytoplasmic ratio between astrocytes of the control line and the PD mutation line.

**Conclusion.** Reprogramming and obtaining of astrocytes from iPSCs received from a donor with a PD-associated mutation in the *LRRK2* gene allow to assess the nature and dynamics of pathological morphochemical and ultrastructural changes caused by the mutation during gliogenesis. The use of combined techniques (PCR, immunocytochemistry, TEM) to compare cell cultures differentiated from iPSCs allow to assess, on the one hand, general culture parameters, such as the dynamics of culture differentiation based on changes in the expression level of specific genes and immunocytochemical markers, and on the other hand, morphofunctional changes at the level of individual cells. TEM demonstrates significant potential for studying cell cultures differentiated from iPSCs. This technique is instrumental for phenotyping the resulting cells based on their ultrastructure, assessing the degree of their morphological maturity, and identifying minor ultrastructural changes in cells, both pathological and differentiation-associated. The results of this TEM-based study indicate a pronounced decrease in mitochondrial viability and other ultrastructural abnormalities, thus confirming the idea of a significant role of astroglia in the development of the neurodegenerative process in the *LRRK2*-associated PD; hence, astroglia can be a basis for development of new approaches as well as for searching pharmacological targets in the pathogenetic therapy of the disease.

**Key words:** Parkinson's disease; induced pluripotent stem cells; differentiation; electron microscopy; astrocytes; *LRRK2*.

## Введение

Болезнь Паркинсона (БП) — это второе по распространенности (после болезни Альцгеймера) нейродегенеративное заболевание, характеризующееся нарастающей двигательной дисфункцией (гипокинезия, мышечная ригидность, тремор покоя), морфологическим субстратом которой является дегенерация черной субстанции среднего мозга с преимущественной гибелью дофаминергических нейронов. Большинство случаев БП — спорадические, однако около 10% пациентов имеют моногенные формы заболевания, наследуемые по аутосомно-доминантному или аутосомно-рецессивному типам

[1]. Среди наиболее значимых генов, ассоциированных с развитием БП, можно назвать гены *LRRK2*, *SNCA*, *PARK2*, *DJ-1*, *PINK1*, *GBA*, *VPS35* и *ATP13A2* [2]. Так, мутации в гене *LRRK2*, кодирующем белок дардадин, вызывают одну из семейных форм БП с поздним началом, клинические и патологические проявления которой схожи с проявлениями более распространенной спорадической формы БП [3, 4]. При патогенной мутации G2019S в гене *LRRK2* увеличивается киназная активность дардадина [5]. Морфологическими проявлениями мутаций в гене *LRRK2* на уровне нейронов являются укорочение отростков, упрощение дендритного древа [6], а так-

же внутриклеточные изменения, связанные с нарушением макроаутофагии [7–11].

В настоящее время все большее внимание привлекает проблема БП-ассоциированных нарушений нейроглии и нейроглиальных взаимодействий. Так, было выяснено, что мутации в гене *LRRK2* связаны не только с нарушением внутриклеточной утилизации белка альфа-синуклеина в нейронах, но и со снижением способности астроцитов поглощать путем эндоцитоза внеклеточный альфа-синуклеин, попадающий в межклеточное пространство в результате гибели нейронов [12]. Кроме того, известно, что активированные астроциты в головном мозге участвуют в запуске процессов нейровоспаления, ассоциированного с нейродегенерацией [13]. Технология получения из ИПСК глиальных клеток значительно расширила возможности исследования их роли в нейрогенезе и в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, в том числе БП [14, 15]. В работе [16] на культурах полученных из ИПСК астроцитов с мутацией G2019S в гене *LRRK2* методами иммунофлуоресценции и электронной микроскопии показано нарушение биогенеза экзосом. А. di Domenico и соавт. [17] выявили в астроцитах с данной мутацией нарушения шаперон-опосредованной митофагии, макроаутофагии и накопление альфа-синуклеина.

Таким образом, в настоящее время особую актуальность представляет выявление возможной роли астроцитов в патогенезе БП с помощью комплексного изучения их морфофункциональных изменений, в том числе на ультраструктурном уровне.

**Цель настоящей работы** — провести сравнительную характеристику астроцитов, полученных из ИПСК от здорового донора и от донора с наследственной *LRRK2*-ассоциированной формой БП, с помощью комплекса методов — полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, иммуноцитохимического окрашивания и просвечивающей электронной микроскопии.

## Материалы и методы

**Клеточные линии.** В работе были использованы монослойные культуры астроцитов, дифференцированных из ИПСК от условно здорового донора и от пациента с БП, имеющего мутацию G2019S в гене *LRRK2* [18]. Работа была выполнена после одобрения этическим комитетом Российского центра неврологии и нейронаук и проведена в соответствии с этическими принципами, утвержденными Хельсинкской декларацией (2024). От каждого донора клеточного материала получено письменное информированное согласие.

**Направленная дифференцировка нейрональных предшественников в глиальные клетки.** Протокол основан на методических рекомендациях, описанных в статье [19]. Нейрональные предшественники, полученные из ИПСК, рассевали на чашки

Петри диаметр 35 мм, покрытые матриксом Матригель (BD Biosciences, США), из расчета 250–400 тыс. клеток на 1 см<sup>2</sup> и культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в течение 24 ч в среде для нейрональных предшественников. Среда состояла из Neurobasal Medium (Gibco, США), 2% SR (Gibco, США), 1% N2 добавки (Gibco, США), 1% B-27 добавки («ПанЭко», Россия), 2 мМ глутамин (ICN Biomedicals, США), 1% смеси аминокислот («ПанЭко», Россия), 50 ед./мл пенициллина–стрептомицина («ПанЭко», Россия), 80 нг/мл Noggin (PeproTech, США), 10 мкМ SB431542 (Stemgent, Inc, США). На следующий день нейрональную среду заменяли на среду для культивирования глиальных клеток (DMEM/F12 (Gibco, США), 1% незаменимые аминокислоты (Hyclone, Logan, UT, США), глутамин 2 мМ («ПанЭко», Россия), добавки N2 и B-27, FGF2 8 нг/мл, Heregulin 10 нг/мл, IGF1 200 нг/мл, Activin A 10 нг/мл (Stem Cell Technologies, Канада), пенициллин–стрептомицин 50 мкг/мл («ПанЭко», Россия)). По мере нарастания до полного монослоя клетки пересевали в пропорции 1:3 на новые чашки с помощью 0,05% раствора трипсина. Смену среды осуществляли через день.

**Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.** ПЦР-амплификацию осуществляли с помощью 5X готовой реакционной смеси («Евроген», Россия), в состав которой входят следующие компоненты: Taq ДНК-полимераза, смесь нуклеотид-трифосфатов, Mg<sup>2+</sup> и реакционный буфер. Для ПЦР в режиме реального времени применяли интеркалирующий краситель (SYBR Green). Реакцию проводили в амплификаторе LightCycler® 96 (Roche, Германия) согласно инструкциям производителя. Для ПЦР-амплификации продуктов реакции обратной транскрипции использовали 0,04 части реакционной смеси (комплементарной ДНК) — 1 мкл; 5X реакционную смесь qPCRmix-HS («Евроген», Россия) — 5 мкл; праймеры (см. таблицу) («Евроген», Россия) — по 1 мкл; деионизированную воду (mQ) — до конечного объема 25 мкл.

**Фиксация клеток параформальдегидом и иммуноцитохимический анализ.** Клетки промывали однократно раствором PBS (ICN Biomedicals, США) и фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma, США) в течение 20 мин при комнатной температуре. После трехкратной отмывки раствором PBS клетки инкубировали в растворе PBS с добавлением 0,1% Triton X-100 и 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в течение 15 мин для пермеабиллизации и уменьшения неспецифической сорбции антител. Затем клетки инкубировали в растворе PBS с добавлением 0,1% Triton X-100 и 5% ЭТС, который содержал специфические первичные антитела, в концентрациях, рекомендованных производителем, в течение ночи при 4°C. После трехкратных отмывок по 10 мин раствором PBS с 0,1% Tween 20 клетки инкубировали в растворе PBS с 0,1% Triton X-100 и 5% ЭТС, который содержал вторичные антитела, меченные флюоресцентным красителем, в концентрациях, указан-

## Праймеры, использованные в работе

Название гена	Нуклеотидная последовательность праймеров	Температура отжига, °С
<i>GLUT1</i>	GCTGTGCTTATGGGCTTCTC CACATACATGGGCACAAAGC	60
<i>VIM</i>	ATTCCACTTTGCGTTCAAGG CTTCAGAGAGAGGAAGCCGA	60
<i>AQP4</i>	GGCCGTAATCTGACTCCCAG TGTGGGTCTGTCACTCATGC	60
<i>PLP1</i>	GGCGCAGTCAGGCAGATC CCCTTGCCGCAGATGGT	60
<i>MBP</i>	CTATAAATCGGCTCACAAGG AGGCGTTATATTAAGAAGC	60
<i>CNP</i>	CACCATGCACCTCTCCCAGC ATGGAGCCGATCCGGTCCAG	60
<i>S100B</i>	CTGGAGAAGGCCATGGTTGC CTCCAGGAAGTGAGAGAGCT	60
<i>EAAT1</i>	CGAAGCCATCATGAGACTGGTA TCCAGCAATCAGGAAGAGAA	60
<i>GAT3</i>	CTGATACGAGGGGTCACGTT GTTCAAGCAACAGAGCATGA	65
<i>ALDH1L1</i>	TCACAGAAGTCTAACCTGCC AGTGACGGGTGATAGATGAT	55,5
<i>SOX10</i>	AGTACCCGCACCTGCACA GAAGGGCGCTTGTCACT	57
<i>GFAP</i>	TCCTGGAACAGCAAAACAAG CAGCCTCAGGTTGGTTTCAT	60
<i>BDNF</i>	ATTGGCTGGCGATTATAAG GTTTCCCTTCTGGTCATGGA	60
<i>NT3</i>	AACTGCTGCGACAACAGAGA CCAGCCACGAGTTATTGT	60
<i>GDNF</i>	ACCTGGAGTTAATGTCCAACC GGCATATTTGAGTCACTGCT	60

ных производителем, в течение 1,5 ч при комнатной температуре. После трехкратных отмывок по 10 мин раствором PBS с 0,1% Tween 20 к клеткам добавляли раствор ядерного красителя DAPI (Sigma, США) в концентрации 0,1 мкг/мл, инкубировали 20 мин и затем отмывали трехкратно раствором PBS с 0,1% Tween 20. Визуализацию препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Imager Z1 (Zeiss, Германия). Изображения анализировали с использованием программного пакета ImageJ 1.49р (NCBI, США).

Первичные антитела, использованные в работе: мышинные Anti-VGLUT (MAB5502; Sigma-Aldrich, США), 1:30;

кроличьи Anti-SLC1A3 (EAAT1) (MBS136184; My Bio Source, США), 1:100;

кроличьи Anti-NG2 (ab 83178; Abcam, Великобритания), 1:50;

кроличьи Anti-CD44 (GTX102111; GeneTex, США), 1:300;

кроличьи Anti-S100 (IR50461–2; Dako, Дания), 1:2.

Вторичные антитела, использованные в работе: козы анти-мышинные Alexa Fluor 488 (A11001; Invitrogen, США), 1/2000;

козы анти-кроличьи Alexa Fluor 546 (A11010; Invitrogen, США), 1/2000.

#### **Просвечивающая электронная микроскопия.**

Для электронно-микроскопического исследования использовали клеточные культуры, полученные от здорового донора и культивированные в течение 25 дней *in vitro* (25 DIV), а также соответствующие по сроку

культивирования (26 DIV) клетки от донора с БП с мутацией в гене *LRRK2*. Дополнительно исследовали клетки от донора с БП той же линии, но на меньшем сроке дифференцировки (10 DIV). Клетки фиксировали 2,5% глутаральдегидом на 0,1 М фосфатном буфере (pH=7,4) в течение 2 ч, постфиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub> в течение 2 ч, дегидратировали в этаноле восходящей концентрации и заключали в смолу Epon (Fluka, Швейцария). Ультратонкие срезы получали на ультратоме 8800 Ultratome III (LKB Bromma, Швеция), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония), оснащенный камерой ES500W Model 782 (Gatan Erlangshen, Китай). Морфометрию проводили в программе ImageJ на цифровых фотографиях срезов, полученных при одинаковом увеличении. Измеряли площади профилей полей клеток, ядер, митохондрий; оценивали показатель округлости митохондрий (circularity) и площадь, занимаемую митохондриями, относительно площади цитоплазмы клетки. В морфометрическом исследовании включали митохондрии при наличии в них хотя бы одной различимой кристы.

#### **Статистическая обработка результатов.**

Обработку и статистический анализ данных выполняли с помощью программ GraphPad Prism 8 и Statistica 8. Для оценки характера распределения данных использовали критерий асимметрии и эксцесса. Статистический анализ данных ПЦР проводили с помощью непарного двустороннего *t*-критерия. Различия признавали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . При морфометрическом электронно-микроскопическом исследовании различия между изучаемыми выборками выявляли при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

**Полимеразная цепная реакция и иммуоцитохимия.** Полученные глиальные культуры были охарактеризованы с помощью ПЦР в режиме реального времени и иммуоцитохимического окрашивания.

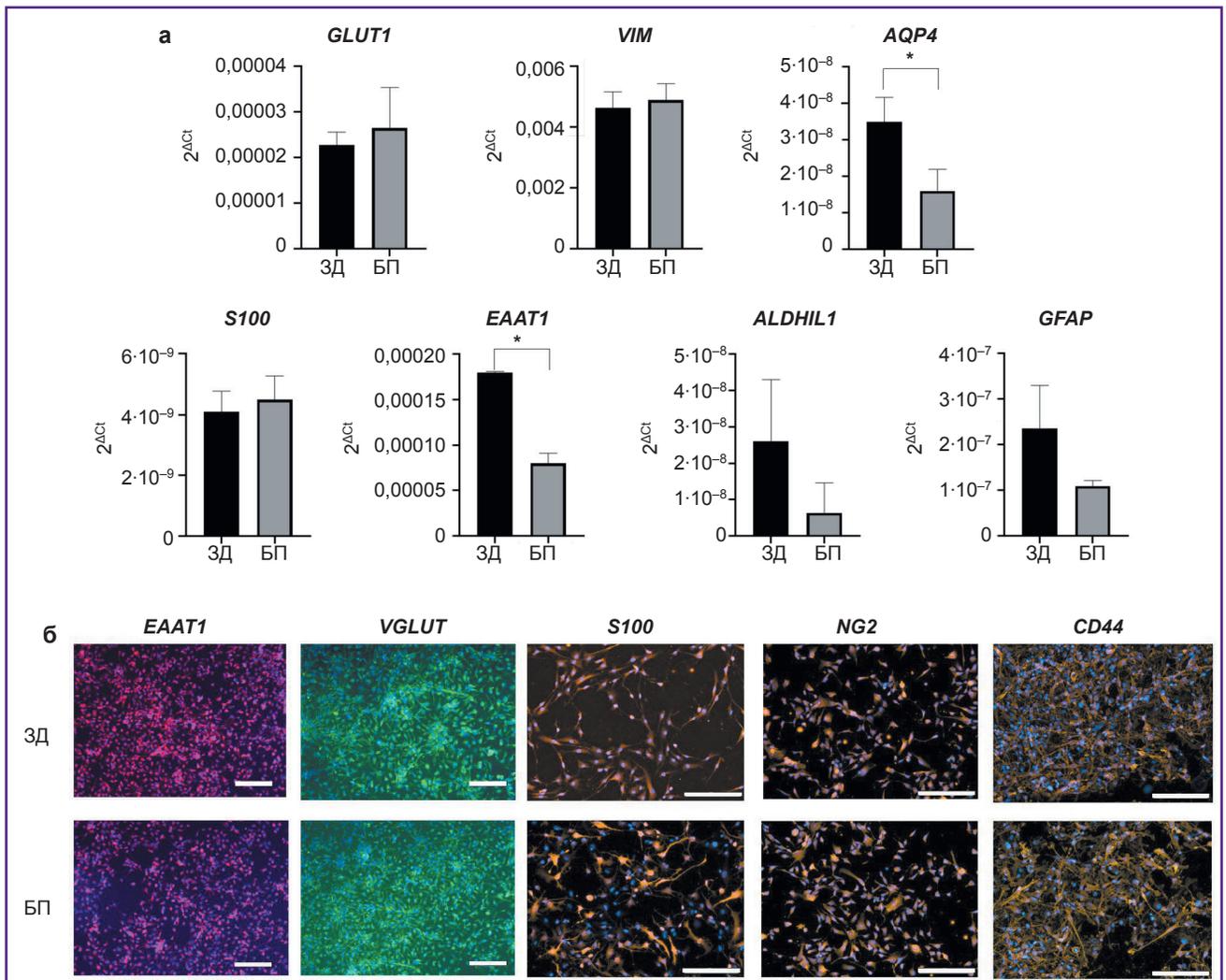
Обе клеточные линии экспрессировали необходимый паттерн глияспецифичных генов и синтезировали видоспецифические белки (рис. 1). При этом часть глияспецифичных генов (*AQP4*, *EAAT1*) в культурах с мутацией в гене *LRRK2* экспрессировалась на пониженном уровне, по сравнению с контролем.

**Ультроструктура астроцитов, дифференцированных из ИПСК от условно здорового донора.** Культуры контрольных астроцитов имели однородные клетки с умеренно электронно-прозрачной цитоплазмой и светлыми ядрами. Присутствовали делящиеся клетки, гибнущие клетки практически не встречались (рис. 2, а). Ядра клеток были преимущественно умеренно электронно-светлые с равномерно распределенным хроматином и с хорошо

выраженным ядрышком, расположенным эксцентрично. Внутри ядра наблюдались равномерно распределенные небольшие глыбки гетерохроматина. В ядрах отдельных клеток присутствовали неглубокие инвагинации (рис. 2, б). Цитоплазма была бедна органеллами и в основном заполнена тонкой сетью промежуточных филаментов и полисомами (см. рис. 2, б; рис. 2, в). Гиалоплазма характеризовалась электронной прозрачностью, что характерно и для нормальных астроцитов головного мозга человека. Цитоскелет составлял основной элемент ультроструктуры клеток и представлял собой сеть тонких нитей, образующих промежуточные филаменты. В одних клетках цитоскелет был распределен равномерно, в других наблюдались зоны с более плотными и редкими скоплениями филаментов. В теле клеток отмечалась хаотичная ориентация филаментов, в отростках же они располагались параллельно друг другу. Встречались клетки, в которых одна часть цитоплазмы была заполнена густой сетью филаментов с небольшим количеством полисом между ними, а в другой части, наоборот, преобладали полисомы и содержалось мало элементов цитоскелета (см. рис. 2, в). Возможно, участки цитоплазмы с большим количеством полисом — это зоны, в которых только начиналась активная наработка белков для построения цитоскелета. Митохондрии преимущественно имели удлиненную форму, с электронно-плотным матриксом и регулярными кристами. В отдельных митохондриях были заметны локусы просветления и набухания, расположенные либо в центре, либо на конце органеллы (рис. 2, в). Встречались измененные митохондрии с деструкцией крист. Митохондрии были немногочисленны, разбросаны поодиночке либо агрегировались возле ядра или в местах расхождения отростков (рис. 2, д). Выявлялись отдельные контакты митохондрий друг с другом и с ядром. Белоксинтезирующий аппарат был представлен преимущественно свободными рибосомами и полисомами. Отдельные короткие цистерны гранулярной эндоплазматической сети (ЭПС) встречались редко (рис. 2, е). Комплекс Гольджи был слабо развит, присутствовали единичные диктиосомы.

Отростки клеток разных калибров содержали элементы цитоскелета, полисомы, отдельные мелкие цистерны ЭПС и удлиненные митохондрии с темным матриксом. В части отростков цитоплазма была более электронно-плотной и содержала значительное количество различных органелл. В других же отростках наблюдалось запустевание цитоплазмы, органелл почти не было, присутствовал лишь фибриллярный материал элементов цитоскелета. Вероятно, эти различия связаны с перестройкой отростков, образованием новых и дегенерацией старых.

Вакуоли были единичны, вероятно митохондриального генеза, поскольку рядом с ними встречались митохондрии с просветлениями на разных стадиях превращения в вакуоли.



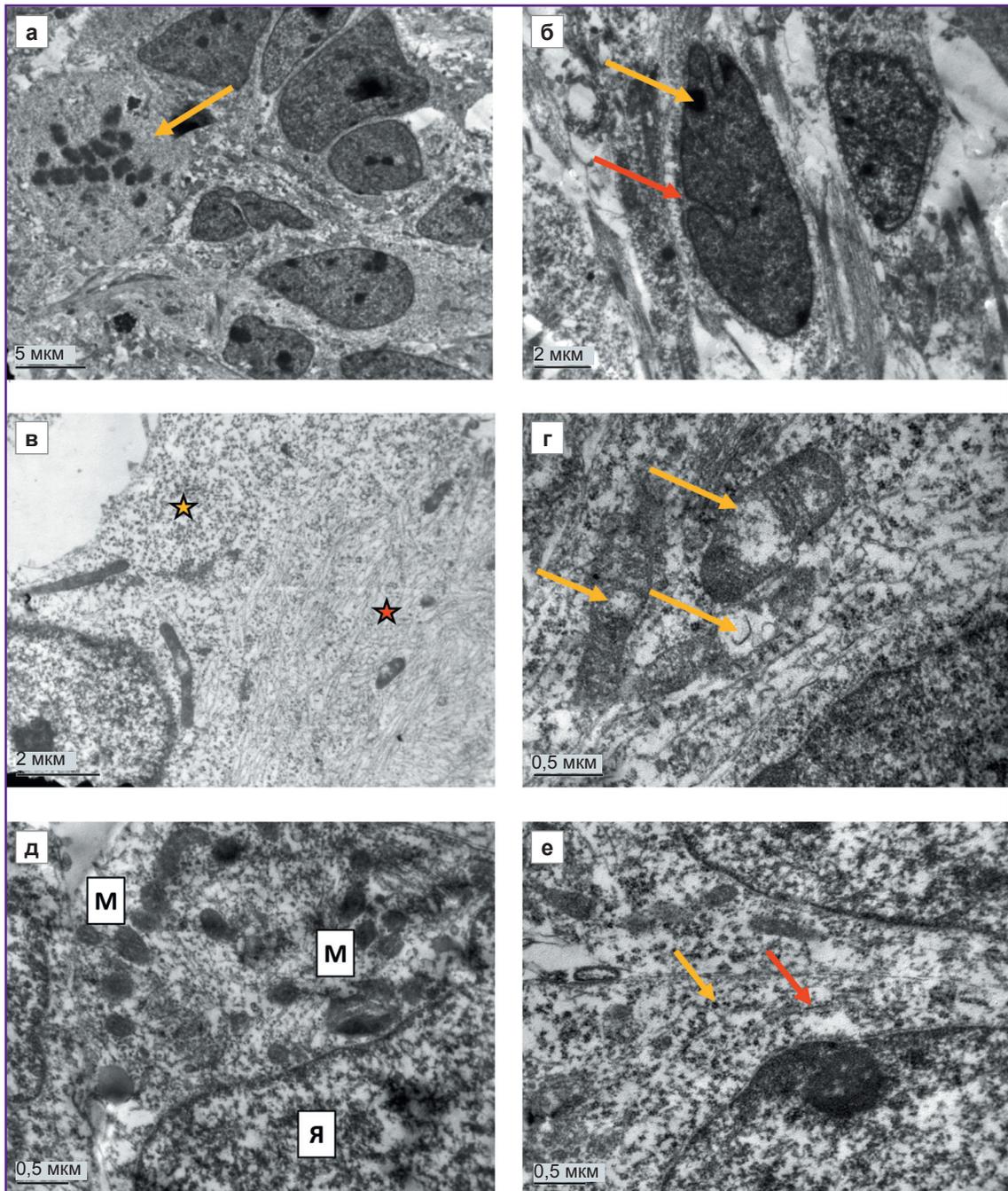
**Рис. 1.** Результаты полимеразной цепной реакции и иммуноцитохимического окрашивания культур астроглии, полученных от здорового донора (ЗД) и от донора с мутацией в гене *LRRK2* (БП):

а — экспрессия глиаспецифичных генов в клетках; результаты представлены в виде «среднее значение ± стандартная ошибка среднего»; статистический анализ проводили с помощью непарного двустороннего t-критерия; \* статистически значимые различия между группами,  $p < 0,05$ ;

б — иммуноцитохимическое окрашивание глиальных клеток антителами против *EAAT1*, *VGLUT*, *S100*, *NG2*, *CD44* и ядерным красителем DAPI; бар для *EAAT1* и *VGLUT* — 100 мкм, для остальных — 200 мкм

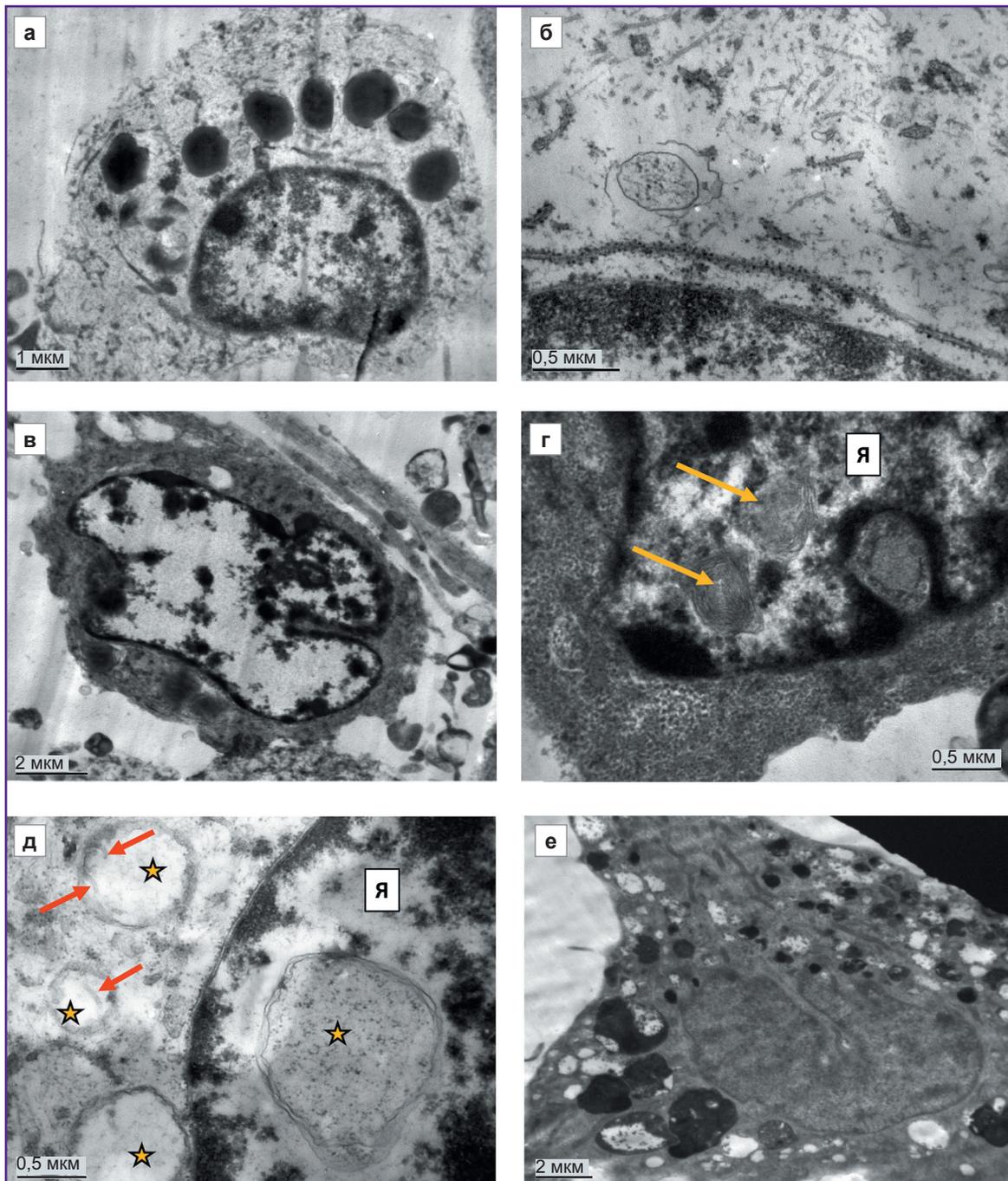
**Ультраструктура астроцитов, дифференцированных из ИПСК от донора с БП.** Культуры клеток с мутацией в гене *LRRK2*, совпадающие по срокам культивирования с контролем (26 DIV — БП, 25 DIV — контроль), демонстрировали признаки значительных дегенеративных изменений (рис. 3–5). В некоторых клетках цитоплазма была электронно-прозрачной, запустевшей, содержала единичные элементы цитоскелета и короткие фрагменты цистерн ЭПС, цитолемма при этом была частично или полностью разрушена (рис. 3, а, б). У другой части клеток, наоборот, в цитоплазме выявлялся умеренно электронно-плотный мелкозернистый материал, представляющий, по всей видимости, коагулиру-

ющие белки цитозоля и цитоскелета (рис. 3, в, г). Ядра большинства клеток содержали хлопьевидный материал в кариоплазме, глыбки конденсированного хроматина и мембранные включения, образовывавшие пузыри и мультиламеллярные структуры (см. рис. 3, в, г; рис. 3, д). Цистерны гранулярной ЭПС были часто лишены рибосом; открепившиеся рибосомы находились в цитоплазме вблизи цистерн (см. рис. 4, а, б). Нередко встречались расширенные и заполненные умеренно электронно-плотным содержимым цистерны гранулярной ЭПС. Наблюдались также цистерны гранулярной ЭПС с аномально суженным внутренним пространством. Гранулярная ЭПС часто образовывала 1–3 сплошных кольца во-



**Рис. 2. Электронная микроскопия культуры астроцитов на 25 DIV, полученных из клеточного материала от здорового донора:**

- а* — общий вид культуры; присутствуют делящиеся клетки (*желтая стрелка*);  
*б* — типичное ядро клетки с эксцентрично расположенным ядрышком (*желтая стрелка*) и неглубокими инвагинациями (*красная стрелка*);  
*в* — различное соотношение элементов цитоскелета и органелл в клетке: зона с меньшим количеством промежуточных филаментов и большим количеством полисом и митохондрий (*желтая звезда*) и зона с большим количеством промежуточных филаментов и меньшим количеством органелл (*красная звезда*);  
*г* — митохондрии с регулярными кристами и участками просветления и набухания (*желтые стрелки*);  
*д* — мелкие округлые митохондрии, агрегирующие в перинуклеарной зоне цитоплазмы; М — митохондрии, Я — ядро;  
*е* — белоксинтезирующий аппарат представлен полисомами (*желтая стрелка*) и отдельными короткими цистернами гранулярной эндоплазматической сети (*красная стрелка*)



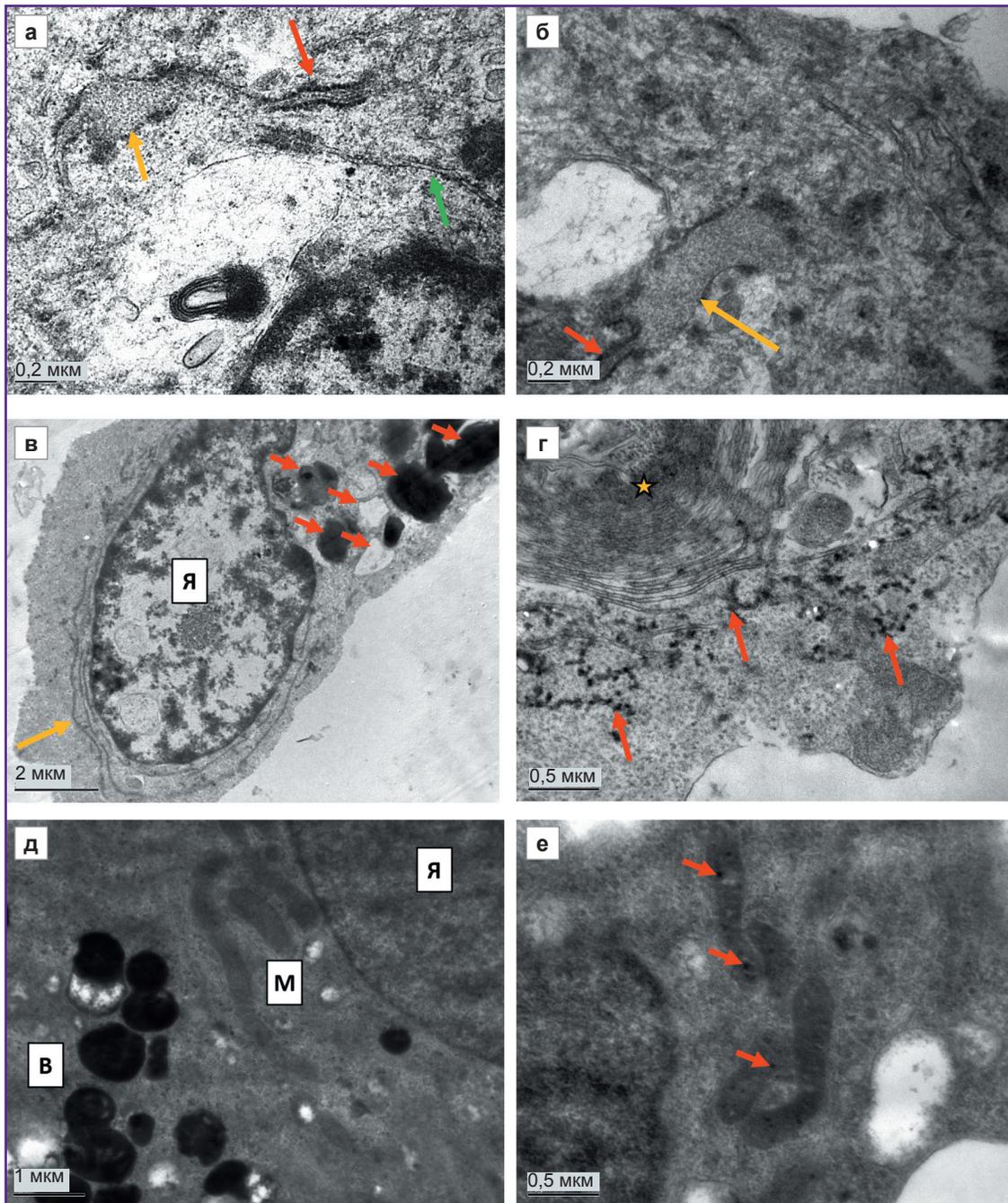
**Рис. 3. Электронная микроскопия культуры астроцитов на 26 DIV, полученных из клеточного материала от донора с мутацией в гене *LRRK2*:**

*а, б* — клетки, дегенерирующие по «светлому» типу; цитоплазма электронно-прозрачная, с крупными липидными каплями, одиночными фрагментами цитоскелета и органелл; митохондрии отсутствуют;

*в, г* — клетки, дегенерирующие по «темному» типу; цитоплазма электронно-плотная, содержит одиночные дегенерирующие рибосомы и другие органеллы; присутствуют липидные капли и липофагосомы, митохондрии отсутствуют; в ядре (Я) видны мультиламеллярные структуры (*желтые стрелки*);

*д* — двумембранные вакуоли присутствуют как в ядре, так и в цитоплазме (*желтые звезды*); последние предположительно образовались из митохондрий, поскольку в них определяются единичные кристы (*красные стрелки*);

*е* — клетка, заполненная аутофаголизосомами со смешанным электронно-плотным и электронно-прозрачным содержимым



**Рис. 4. Электронная микроскопия культуры астроцитов на 26 DIV, полученных из клеточного материала от донора с мутацией в гене *LRRK2*:**

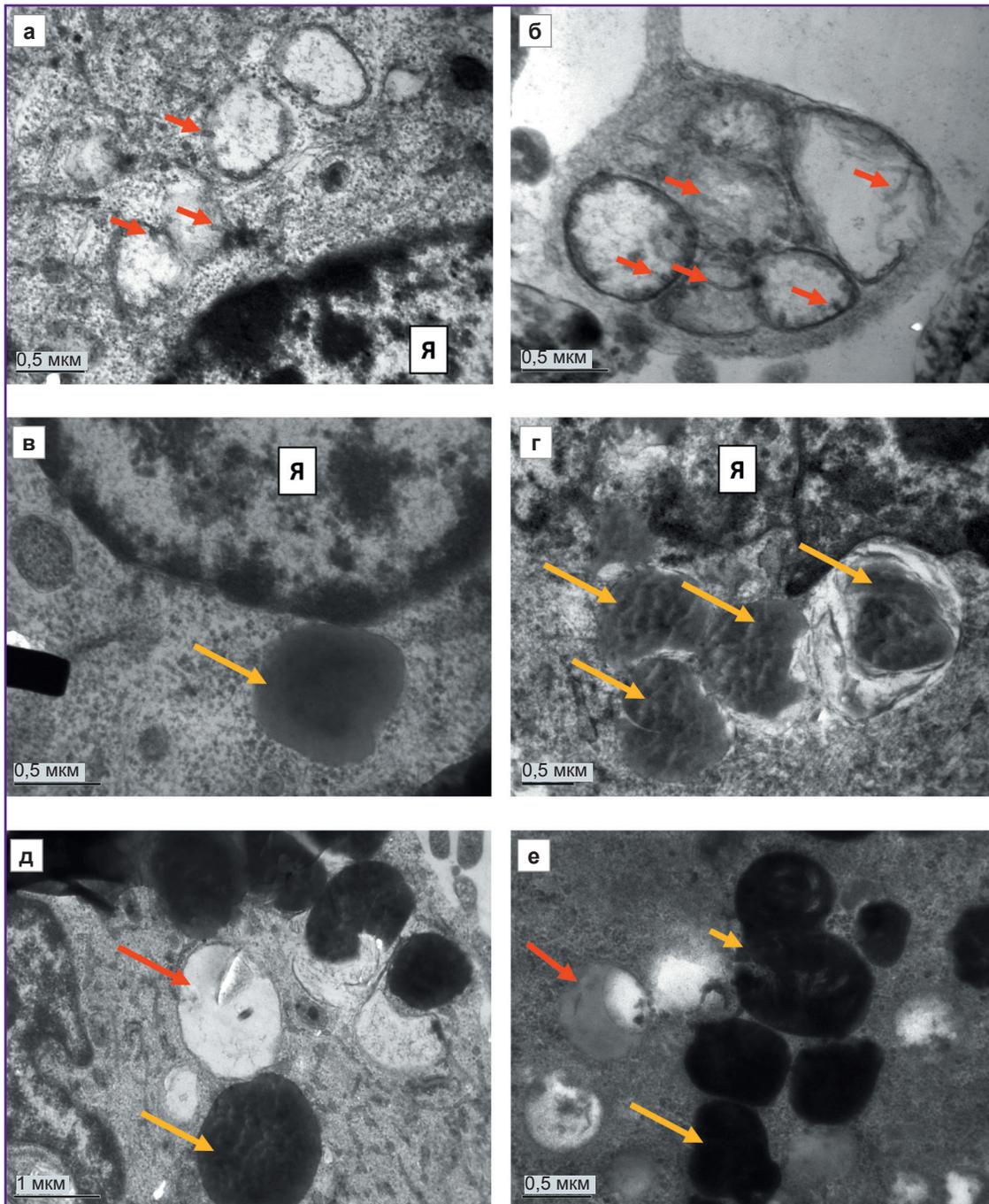
*а, б* — изменения гранулярной эндоплазматической сети; *красная стрелка* — участок цистерны нормального диаметра; *желтая стрелка* — аномально расширенный участок гранулярной эндоплазматической сети, заполненный умеренно электронно-плотным содержимым; *зеленая стрелка* — аномально суженный участок гранулярной эндоплазматической сети, лишенный рибосом;

*в* — длинные цистерны гранулярной эндоплазматической сети (*желтая стрелка*) концентрически закручены вокруг ядра (Я); в цитоплазме присутствуют разнообразные крупные вакуоли (*красные стрелки*); митохондрии отсутствуют;

*г* — концентрически закрученные ламеллярные структуры (*желтая звезда*), по всей вероятности, образовавшиеся из эндоплазматического ретикулума; рядом присутствуют электронно-плотные включения гликогена (*красные стрелки*);

*д* — клетка с электронно-плотной цитоплазмой, аутофагическими вакуолями (В) и удлинёнными митохондриями (М) с темным матриксом; Я — ядро;

*е* — удлинённые митохондрии с темным матриксом и включениями кальция (*красные стрелки*)



**Рис. 5. Электронная микроскопия культуры астроцитов на 26 DIV, полученных из клеточного материала от пациента с мутацией в гене *LRRK2*:**

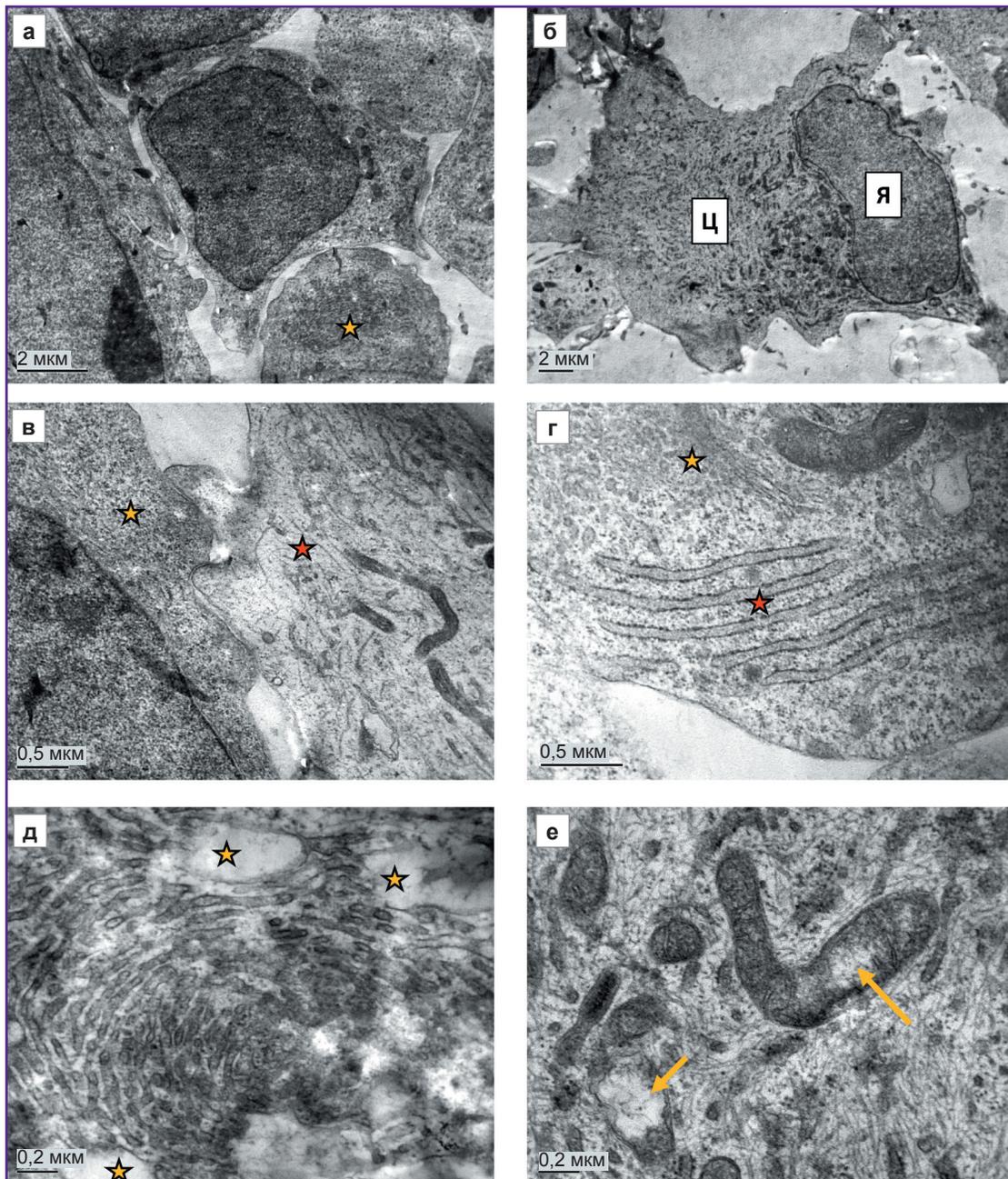
*а, б* — набухшие митохондрии, превратившиеся в вакуоли с электронно-прозрачным содержимым; о митохондриальном происхождении этих вакуолей можно судить по двойной мембране и наличию по периферии небольших единичных крист (красные стрелки); Я — ядро;

*в* — липидная капля (желтая стрелка) с неоднородно умеренно электронно-плотным содержимым и одинарной мембраной; Я — ядро;

*г* — липофagosомы (желтые стрелки), окруженные двумя или большим количеством мембран; Я — ядро;

*д* — электронно-прозрачные, заполненные жидкостью вакуоли (красная стрелка); вакуоли с электронно-плотным белково-липидным содержимым (желтая стрелка) в клетке, полностью лишенной митохондрий;

*е* — разнообразные аутофаголизосомы, содержащие частично лизированные липидные капли (красная стрелка); белковое содержимое (длинная желтая стрелка) и множество спрессованных дегенерирующих мембран (короткая желтая стрелка)



**Рис. 6. Электронная микроскопия культуры астроцитов на 10 DIV, полученных из клеточного материала от донора с мутацией в гене *LRRK2*:**

*а* — разнообразные по размеру и форме клетки, с относительно нормальной ультраструктурой; в одной из клеток виден значительный по размеру конгломерат цистерн, вероятно гладкой эндоплазматической сети (*желтая звезда*);  
*б* — крупная клетка с маленьким ядерно-цитоплазматическим соотношением, с объемной цитоплазмой (Ц), богатой органеллами; Я — ядро;

*в* — 2 типа клеток с разной ультраструктурой; клетка слева (*желтая звезда*) с более темной цитоплазмой, бедной элементами цитоскелета и богатой полисомами; клетка справа (*красная звезда*) с более электронно-прозрачной цитоплазмой, хорошо развитыми элементами цитоскелета и темными удлинёнными митохондриями;

*г* — клетка, напоминающая по ультраструктуре нейрон; хорошо развитый комплекс Гольджи (*желтая звезда*); стопка цистерн гранулярной эндоплазматической сети (*красная звезда*), напоминающая тельце Ниссля, характерное для нейронов;

*д* — концентрически расположенные цистерны гладкой эндоплазматической сети с зонами набухания (*желтые звезды*);

*е* — набухающие митохондрии с зонами просветления (*желтые стрелки*)

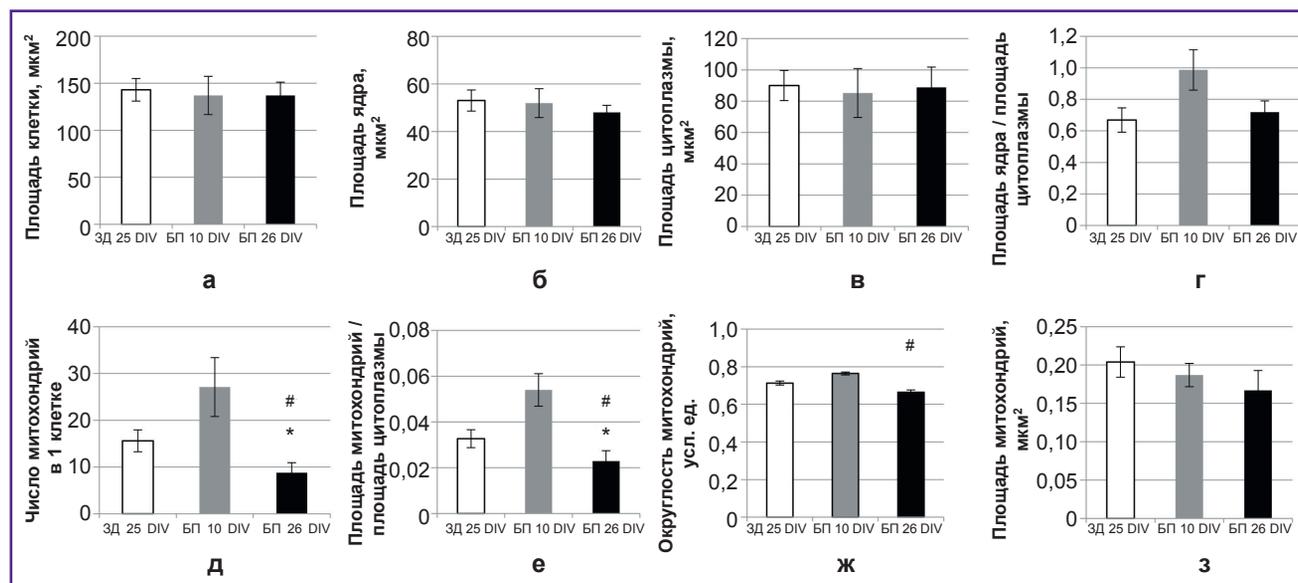
круг ядра (рис. 4, в). В некоторых клетках присутствовали концентрические структуры, состоящие из цистерн или трубочек; вокруг некоторых из них обнаруживались гранулы гликогена (рис. 4, а).

Митохондрии во многих клетках были неопределимы. Вместо них присутствовали вакуоли с различным по плотности содержимым (см. рис. 3, а, в; см. рис. 4, в). Уцелевшие митохондрии были небольшие, вытянутые, с темным матриксом и слабо различимыми кристами и темными гранулами — включениями кальция (рис. 4, д, е).

Вакуоли с различным по электронной плотности содержимым составляли наиболее характерный элемент ультраструктуры астроцитов с БП-ассоциированной мутацией на 26 DIV (см. рис. 3, а, рис. 3, е; см. рис. 5). Некоторые вакуоли выглядели пустыми, у части из них имелось 2 мембраны, причем внутренняя подчас образовывала единичные впячивания, напоминающие кристы, что позволяет предположить образование их из дегенерировавших путем набухания митохондрий (см. рис. 3, д; рис. 5, а, б). Другие вакуоли имели одну мембрану и умеренно электронно-плотное, неравномерно окрашенное содержимое и представляли собой липидные капли (рис. 5, в). Третий вид вакуолей содержал внутри неравномерно окрашенный электронно-плотный материал, вероятно смешанной липид-белковой природы (рис. 5, д). В большом

количестве встречались аутофаголизосомы, содержащие продукты частичного переваривания мембранных органелл и липидных капель (см. рис. 3, е; см. рис. 4, д; рис. 5, з, е).

Поскольку клетки культуры от пациента с БП на 26 DIV демонстрировали ультраструктурные признаки дегенерации, характерные для состояния некробиоза, мы дополнительно исследовали клетки данной линии на меньшем сроке культивирования (10 DIV) для оценки динамики этих патологических изменений. По ультраструктуре клетки на 10 DIV значительно отличались от контроля (рис. 6). Культуры были морфологически неоднородны. Наряду с крупными глиальными клетками (рис. 6, б, в, красная звезда) встречались как мелкие малодифференцированные клетки (рис. 6, в, желтая звезда), так и клетки, по ультраструктуре соответствующие нейронам: с более развитыми органеллами, в том числе с упорядоченно расположенными стопками цистерн гангулярной ЭПС, напоминающими тельца Ниссля (рис. 6, з). Часто наблюдались клетки с гипертрофированными цистернами гладкого эндоплазматического ретикулума или комплекса Гольджи. Цистерны были концентрически закручены и занимали порой значительную площадь в клетке (рис. 6, д). Эти цистерны в отдельных участках набухали и давали начало электронно-прозрачным вакуолям. Цитоскелет был представлен короткими хаотично располо-



**Рис. 7.** Морфометрическое исследование астроцитов на 25 DIV (а–з), полученных из клеточного материала от здорового донора, и астроцитов на 10 DIV и 25 DIV, полученных из клеточного материала от донора с мутацией в гене *LRRK2*

Данные представлены в виде «среднее значение ± стандартная ошибка среднего». ЗД 25 DIV — здоровый донор, 25 дней *in vitro*; БП 10 DIV — донор с БП, 10 дней *in vitro*; БП 26 DIV — донор с БП, 26 дней *in vitro*. Сравнения проводили между группами: ЗД 25 DIV и БП 26 DIV и между группами БП 26 DIV и БП 10 DIV. Различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$  (критерий Манна–Уитни); \* статистически значимое различие между группами ЗД 25 DIV и БП 26 DIV; # между группами БП 26 DIV и БП 10 DIV

женными фрагментами промежуточных филаментов и микротрубочек (рис. 6, е).

Белоксинтезирующий аппарат в одной части клеток был представлен хорошо развитой гранулярной ЭПС и полисомами, в других, наоборот, он был слабо развит и состоял в основном из свободных неактивных рибосом.

В клетках присутствовали как нормальные митохондрии, так и набухающие, с деструкцией крист и электронно-плотными включениями кальция (см. рис. 6, е).

Мы провели морфометрическую оценку различных параметров клеток всех исследованных культур и сравнили по этим параметрам клетки от пациента с БП на 26 DIV с клетками от здорового донора, соответствующими по сроку культивирования (25 DIV), а также клетки от пациента с БП на 26 DIV с клетками той же линии на 10 DIV (рис. 7). По средним показателям площади клетки, площади ядра, площади цитоплазмы, ядерно-цитоплазматическому соотношению клетки не различались (рис. 7, а–е).

Были выявлены различия в средних значениях морфометрических параметров митохондрий в клетках исследованных культур. В культуре с БП-ассоциированной мутацией на 26 DIV число митохондрий на клетку и относительная площадь, занимаемая митохондриями в цитоплазме, были значительно меньше, чем в контроле (рис. 7, д, е). Вместе с тем в культуре астроцитов с БП-ассоциированной мутацией на 10 DIV среднее значение этих параметров было выше, чем в культуре той же линии на 26 DIV. Как видно из гистограммы (см. рис. 7, д, е), значения этих показателей в культуре БП на 10 DIV были несколько выше, чем в контроле. Однако мы не проводили сравнения между двумя этими культурами, поскольку они различались по срокам культивирования, и любые выявленные различия между ними могут объясняться в большей степени различиями в сроках дифференцировки, нежели патологическими особенностями культуры с генетической мутацией. В культуре БП на 25 DIV показатель степени округлости митохондрий был ниже, чем в культуре БП на 10 DIV, но не отличался от контроля (рис. 7, ж). Площадь митохондрий в клетках культуры БП на 25 DIV была немного меньше, чем в контроле и в культуре БП на 10 DIV, однако эти различия не были статистически значимыми (рис. 7, з).

## Обсуждение

В настоящей работе исследованы культуры астроцитов, полученные методом направленной дифференцировки из ИПСК. Разработка технологии репрограммирования соматических клеток в ИПСК с дальнейшей их направленной дифференцировкой в клетки любого заданного типа произвела революцию в области *in vitro* технологий и в настоящий момент является одним из наиболее бурно развива-

ющихся направлений биомедицинских исследований во всем мире. Протоколы дифференцировки клеток каждого типа постоянно обновляются и совершенствуются. Разработанный и описанный в данном исследовании протокол основан на методических рекомендациях, описанных в работе 2018 г. [19], и обеспечивает стабильное получение жизнеспособных культур астроцитов, фенотип которых был нами подтвержден в настоящей работе с помощью комплекса методов: ПЦР в режиме реального времени, иммуноцитохимического окрашивания и просвечивающей электронной микроскопии. И в контрольной линии, и в линии с БП-ассоциированной мутацией клетки экспрессировали глияспецифичные белки, а их ультраструктура в основном соответствовала ультраструктуре астроцитов серого вещества головного мозга человека, описанной в литературе [20]. Вместе с тем в культуре астроцитов с БП-ассоциированной мутацией в гене *LRRK2* встречались клетки, ультраструктурно соответствующие развивающимся нейронам. В ранее опубликованной работе [14] выявлено более значительное повышение транскрипции гена  $\beta$ -III-тубулина, специфичного для нейронов, в процессе длительного культивирования астроцитов с мутацией в гене *LRRK2* по сравнению с контрольными астроцитами. Эти данные свидетельствуют о возможности наличия в культуре астроцитов, полученных из ИПСК по использованному протоколу, некоторого количества клеток, дифференцировавшихся в нейрональном направлении. Кроме того, ПЦР-исследование показало, что часть глияспецифичных генов экспрессировалась на пониженном уровне в клетках, несущих мутантный ген, что может указывать на смещение сроков или нарушение процесса дифференцировки в глиальных клетках от пациента с БП. Проведенное морфометрическое исследование не выявило различий в размере клеток и ядерно-цитоплазматическом соотношении между клетками от здорового донора и от пациента с БП. В работе [21] получены другие данные морфометрии: астроциты с мутацией G2019S в гене *LRRK2* отличались от контроля значительно меньшими размерами.

Полученные в настоящей работе результаты электронно-микроскопического исследования свидетельствуют о резко выраженных изменениях ультраструктуры астроцитов с БП-ассоциированной мутацией в гене *LRRK2*, приводящих в конечном итоге к гибели этих клеток при длительном их культивировании. Повышенный уровень апоптоза был ранее показан в работах на культурах нейроblastомы и мышечных кортикальных нейронов с мутацией в гене *LRRK2* [22]. Однако в нашей работе в клетках с мутацией *LRRK2* при длительном культивировании (26 DIV) не наблюдалось классических ультраструктурных признаков апоптоза, таких как структурированная конденсация хроматина и органелл и образование апоптотических телец. Клетки находились в состо-

янии некробиоза с характерными необратимыми изменениями ядра и органелл: деструкцией хроматина, прекращением синтеза белка с отсоединением рибосом от цистерн гранулярной ЭПС и распадом их на отдельные субъединицы, дезинтеграцией цитоскелета и клеточных мембран, а также исчезновением митохондрий. Последний признак был самым выраженным, и это свидетельствует, что именно митохондрии при мутациях в гене *LRRK2* подвержены наиболее драматическим изменениям. Разрушение митохондрий приводит к нарушению окисления жирных кислот в клетке и образованию липидных и белковых включений, а также вызывает остановку продукции АТФ и, как следствие, прекращение всех энергозависимых внутриклеточных процессов. Астроциты способны синтезировать и накапливать небольшое количество гликогена [23]. В нашем исследовании в культурах астроцитов с БП, в отличие от контроля, в клетках были значительно сильнее развиты цистерны гладкой ЭПС и встречались включения гликогена, что свидетельствует о наличии компенсаторно-приспособительных реакций клеток в ответ на снижение продукции АТФ вследствие деструкции митохондрий. Накопленный гликоген позволяет астроцитам еще некоторое время поддерживать жизнедеятельность за счет гликолиза, однако запасы гликогена исчерпаемы. О снижении митохондриальной активности и продукции АТФ при одновременном усилении процесса гликолиза у астроцитов, полученных из ИПСК лиц с БП и мутацией G2019S в гене *LRRK2*, сообщалось также в работе [21].

В ранее опубликованном исследовании мы показали патологические изменения митохондрий в культуре нейронов, дифференцированных из ИПСК от того же донора с мутацией в гене *LRRK2* [24]. Митохондрии в нейронах находились на разных стадиях разрушения крист, набухания и превращения в электронно-прозрачные вакуоли. В том же исследовании с помощью технологии мультиплексного измерения транскрипционной активности генов Nanostring было продемонстрировано изменение в нейронах пациентов с БП активности генов, связанных с функционированием дыхательной цепи, продукцией АТФ, взаимодействием митохондрий с ЭПС, поддержанием внутриклеточного баланса кальция, митофагией и репликацией митохондриальной ДНК [24]. Митохондриальные нарушения были выявлены не только в нейронах и глии, но и в фибробластах с мутацией в гене *LRRK2* [25]. Эти нарушения, по-видимому, являются универсальным и ведущим признаком БП, ассоциированной с данной мутацией. Несколько других исследований также показали изменение уровня митофагии в культурах с мутацией в гене *LRRK2*. Например, в работе [26] продемонстрировано уменьшение количества митохондрий в дендритах в результате повышения уровня митофагии вследствие нарушения кальциевого баланса. В нашем же исследовании снижение

количества митохондрий вплоть до полного их исчезновения в культуре на 26 DIV проходило не столько путем митофагии, сколько в результате постепенной деструкции самих митохондрий, их набухания и превращения в вакуоли. Возможной причиной дисфункции митохондрий у астроцитов с мутацией G2019S в гене *LRRK2* может быть стресс эндоплазматического ретикулума [27], свидетельствующий о нарушении и прекращении посттрансляционных изменений и дальнейшего внутриклеточного транспорта синтезированных в гранулярной ЭПС белков. Ультраструктурные признаки стресса эндоплазматического ретикулума, такие как появление расширенных и заполненных умеренно электронно-плотным содержимым цистерн, открепление от гранулярной ЭПС рибосом, были выявлены в нашей работе. Усиленное образование контактов между дисфункциональной ЭПС и митохондриями при этом состоянии приводит к перегрузке митохондрий ионами  $Ca^{2+}$ , их повреждению [27] и последующему запуску процесса клеточной гибели [28].

Другой характерной патологией глиальных клеток от пациента с БП в нашей работе было появление вакуолей с содержимым различной электронной плотности. Такие вакуоли особенно часто встречались в клетках, полностью лишенных митохондрий на длительном сроке культивирования (26 DIV). Мы полагаем, что образование вакуолей напрямую связано с дегенерацией митохондрий.

Крупные вакуоли с электронно-прозрачным содержимым, вероятно, образовались в результате набухания митохондрий. С.М. Higgins и соавт. [29] описали вакуолизацию цитоплазмы у мышей на модели бокового амиотрофического склероза. Методами иммунофлуоресценции и иммуноэлектронной микроскопии авторы показали, что эти вакуоли образовывались путем набухания митохондрий, а не в результате аутофагии. Процесс набухания, разрушения крист и постепенного превращения митохондрий в вакуоли описан и при патологии кардиомиоцитов под названием «митохондриальная вакуолярная дегенерация» [30].

Накопление в клетках липидных капель рассматривают как признак стресса, вызванного разнообразными внешними и внутренними факторами [31]. Липидные капли были обнаружены и в нейронах с той же мутацией в гене *LRRK2* [32]. Увеличение количества липидных капель в астроцитах при митохондриальной дисфункции, гипоксии и образовании активных форм кислорода представляет собой адаптационно-защитный эволюционно-консервативный механизм, являющийся одним из ранних признаков нейродегенеративного процесса [33, 34]. Выявленные в нашем исследовании липидные капли и липофагосомы в погибающих клетках могли быть образованы как в результате повышения уровня их синтеза в эндоплазматической сети, так и в результате декомпозиции (фанероза)

дегенерирующих митохондрий и других мембранных органелл, что, однако, требует подтверждения с помощью методов молекулярной биологии. В ряде исследований последних лет показана локализация продукта экспрессии гена *LRRK2*, дардарина, в тесной взаимосвязи с мембранными органеллами и клеточными везикулами и участие его в метаболизме липидов, в том числе в фосфорилировании и катаболизме плазматических мембран и лизосомальных липидов [35]. Следовательно, мутация в гене *LRRK2* может быть связана с нарушением нормальной утилизации мембран клеточных органелл и накоплением продуктов деградации в виде липидных и белковых включений.

Выявленное в нашей работе накопление аутофаголизосом свидетельствует о нарушении процесса макроаутофагии в клетках с мутацией в гене *LRRK2* и согласуется с многочисленными данными литературы [7–11, 17].

Для оценки динамики патологических изменений в астроцитах с мутацией в гене *LRRK2* мы сравнили ультраструктуру длительно культивированных (26 DIV) клеток с клетками этой же линии на меньшем сроке культивирования (10 DIV). По морфометрическим параметрам (площадь профильного поля, площадь ядра, ядерно-цитоплазматическое соотношение) клетки этих культур не различались. В культуре на 10 DIV ультраструктура клеток была более сохранна, лишь единичные клетки демонстрировали признаки развивающейся клеточной гибели. Более того, клетки этой культуры проявляли признаки гиперпластических компенсаторно-адаптационных изменений, таких как гипертрофия синтетического аппарата, увеличение количества митохондрий. Вероятно, к 26-му дню *in vitro* адаптационный резерв был исчерпан и у клеток в культуре на 26 DIV выявлялись уже только ультраструктурные признаки дегенерации.

Проведенное морфометрическое исследование показало, что в культурах с БП-ассоциированной мутацией (26 DIV) среднее количество митохондрий на клетку было статистически значимо меньше, чем в контроле. Эти различия в значительной мере объяснялись тем, что во многих клетках в культуре с БП-ассоциированной мутацией вообще не обнаруживалось ни одной митохондрии: они были изменены до неузнаваемости. Вместе с тем по морфометрическим параметрам (размеры и вытянутость) оставшиеся митохондрии слабо отличались от контроля. В обеих группах митохондрии были преимущественно мелкие, овальные. В клетках с *LRRK2*-мутацией в культуре на 10 DIV количество и площадь митохондрий были выше, чем в клетках культуры на 26 DIV, что является признаком компенсаторно-приспособительных реакций на более коротком сроке культивирования.

Результаты нашего электронно-микроскопического исследования, свидетельствующие о выраженном снижении жизнеспособности митохондрий в клетках при наличии мутации в гене *LRRK2*, соотносятся

с литературными данными [24–26] о ключевой роли митохондрий в патогенезе БП. Накопление разнообразных вакуолей является характерным фенотипическим признаком клеток с данной мутацией и свидетельствует о нарушении в них процессов аутофагии. Дальнейшие исследования необходимы для уточнения молекулярных механизмов, приводящих к наблюдаемым ультраструктурным изменениям в клетках с мутантным геном *LRRK2*.

## Заключение

В проведенном исследовании с помощью комплекса методов ПЦР в режиме реального времени, иммуноцитохимического окрашивания на глиаспецифичные белки и просвечивающей электронной микроскопии подтвержден фенотип астроцитов, дифференцированных из ИПСК. И ПЦР, и электронно-микроскопическое исследование показали нарушения процесса дифференцировки в линии клеток с БП-ассоциированной мутацией. Вместе с тем применение метода электронной микроскопии позволило выявить ультраструктурные патологические признаки в клетках мутантной линии, не заметные при рутинном исследовании живых клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии и клеток, окрашенных иммунофлуоресцентным методом, с помощью люминесцентной микроскопии. Среди выявленных электронно-микроскопическим методом нарушений отмечаются повреждение митохондрий, нарушение аутофагии и стресс эндоплазматического ретикула. Эти патологии можно выявить и молекулярно-генетическими методами, в том числе ПЦР, Nanostring и другими. Однако метод электронной микроскопии значительно менее дорогостоящий и не требует применения разных реактивов под разные задачи, как, например, специальных панелей для Nanostring или праймеров для ПЦР. При электронно-микроскопическом исследовании на одном срезе можно наблюдать морфофункциональное состояние сразу всех компонентов клетки: ядра, цитоплазмы, органелл. Поэтому электронная микроскопия может быть использована и как первичный метод исследования на начальном этапе изучения патологического образца для определения векторов дальнейшего молекулярно-генетического и функционального исследования с применением других методов.

Таким образом, просвечивающая электронная микроскопия демонстрирует значительный потенциал применения в исследованиях, касающихся клеточных технологий, как в качестве самостоятельного метода, так и в комплексе с традиционными для данной области методами, в том числе ПЦР, иммуноцитохимическим окрашиванием на глиаспецифичные белки и другими.

**Финансирование.** Работа поддержана грантом Российского научного фонда №24-45-00052.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература/References

1. Lesage S., Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 2009; 18(R1): R48–R59, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp012>.
2. Trevisan L., Gaudio A., Monfrini E., Avanzino L., Di Fonzo A., Mandich P. Genetics in Parkinson's disease, state-of-the-art and future perspectives. *Br Med Bull* 2024; 149(1): 60–71, <https://doi.org/10.1093/bmb/ldad035>.
3. Paisán-Ruiz C., Jain S., Evans E.W., Gilks W.P., Simón J., van der Brug M., López de Munain A., Aparicio S., Gil A.M., Khan N., Johnson J., Martínez J.R., Nicholl D., Martí Carrera I., Pena A.S., de Silva R., Lees A., Martí-Massó J.F., Pérez-Tur J., Wood N.W., Singleton A.B. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; 44(4): 595–600, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.10.023>.
4. Zimprich A., Biskup S., Leitner P., Lichtner P., Farrer M., Lincoln S., Kachergus J., Hulihan M., Uitti R.J., Calne D.B., Stoessl A.J., Pfeiffer R.F., Patenge N., Carbajal I.C., Vieregge P., Asmus F., Müller-Myhsok B., Dickson D.W., Meitinger T., Strom T.M., Wszolek Z.K., Gasser T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44(4): 601–607, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.005>.
5. Chen C., Soto G., Dumrongprechachan V., Bannon N., Kang S., Kozorovitskiy Y., Parisiadou L. Pathway-specific dysregulation of striatal excitatory synapses by LRRK2 mutations. *Elife* 2020; 9: e58997, <https://doi.org/10.7554/eLife.58997>.
6. MacLeod D., Dowman J., Hammond R., Leete T., Inoue K., Abeliovich A. The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron* 2006; 52(4): 587–593, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.008>.
7. Plowey E.D., Cherra S.J. 3rd, Liu Y.J., Chu C.T. Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 2008; 105(3): 1048–1056, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05217.x>.
8. Friedman L.G., Lachenmayer M.L., Wang J., He L., Poulouse S.M., Komatsu M., Holstein G.R., Yue Z. Disrupted autophagy leads to dopaminergic axon and dendrite degeneration and promotes presynaptic accumulation of  $\alpha$ -synuclein and LRRK2 in the brain. *J Neurosci* 2012; 32(22): 7585–7593, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5809-11.2012>.
9. Gómez-Suaga P., Luzón-Toro B., Churamani D., Zhang L., Bloor-Young D., Patel S., Woodman P.G., Churchill G.C., Hilfiker S. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates autophagy through a calcium-dependent pathway involving NAADP. *Hum Mol Genet* 2012; 21(3): 511–525, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr481>.
10. Ramonet D., Daher J.P., Lin B.M., Stafa K., Kim J., Banerjee R., Westerlund M., Pletnikova O., Glauser L., Yang L., Liu Y., Swing D.A., Beal M.F., Troncoso J.C., McCaffery J.M., Jenkins N.A., Copeland N.G., Galter D., Thomas B., Lee M.K., Dawson T.M., Dawson V.L., Moore D.J. Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2. *PLoS One* 2011; 6(4): e18568, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018568>.
11. Alegre-Abarrategui J., Christian H., Lufino M.M., Mutihac R., Venda L.L., Ansoorge O., Wade-Martins R. LRRK2 regulates autophagic activity and localizes to specific membrane microdomains in a novel human genomic reporter cellular model. *Hum Mol Genet* 2009; 18(21): 4022–4034, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp346>.
12. Streubel-Gallasch L., Giusti V., Sandre M., Tessari I., Plotegher N., Giusto E., Masato A., Iovino L., Battisti I., Arrigoni G., Shimshek D., Greggio E., Tremblay M.E., Bubacco L., Erlandsson A., Civiero L. Parkinson's disease-associated LRRK2 interferes with astrocyte-mediated alpha-synuclein clearance. *Mol Neurobiol* 2021; 58(7): 3119–3140, <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02327-8>.
13. Miyazaki I., Asanuma M. Neuron-astrocyte interactions in Parkinson's disease. *Cells* 2020; 9(12): 2623, <https://doi.org/10.3390/cells9122623>.
14. Новосадова Е.В., Арсеньева Е.Л., Антонов С.А., Казанцева Е.А., Новосадова Л.В., Курко О.Д., Иллариошкин С.Н., Тарантул В.З., Гривенников И.А. Получение и характеристика глиальных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. *Нейрохимия* 2020; 37(4): 358–367, <https://doi.org/10.31857/S1027813320040068>.
- Novosadova E.V., Arsenyeva E.L., Antonov S.A., Kazantseva E.A., Novosadova L.V., Kurko O.D., Illarioshkin S.N., Tarantul V.Z., Grivennikov I.A. Generation and characteristics of glial cells from induced human pluripotent stem cells. *Nejrohimiya* 2020; 37(4): 358–367, <https://doi.org/10.31857/S1027813320040068>.
15. Soubannier V., Maussion G., Chaineau M., Sigutova V., Rouleau G., Durcan T.M., Stifani S. Characterization of human iPSC-derived astrocytes with potential for disease modeling and drug discovery. *Neurosci Lett* 2020; 731: 135028, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135028>.
16. de Rus Jacquet A., Tancredi J.L., Lemire A.L., DeSantis M.C., Li W.P., O'Shea E.K. The LRRK2 G2019S mutation alters astrocyte-to-neuron communication via extracellular vesicles and induces neuron atrophy in a human iPSC-derived model of Parkinson's disease. *Elife* 2021; 10: e73062, <https://doi.org/10.7554/eLife.73062>.
17. di Domenico A., Carola G., Calatayud C., Pons-Espinal M., Muñoz J.P., Richaud-Patin Y., Fernandez-Carasa I., Gut M., Faella A., Parameswaran J., Soriano J., Ferrer I., Tolosa E., Zorzano A., Cuervo A.M., Raya A., Consiglio A. Patient-specific iPSC-derived astrocytes contribute to non-cell-autonomous neurodegeneration in Parkinson's disease. *Stem Cell Reports* 2019; 12(2): 213–229, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.12.011>.

18. Novosadova E.V., Nekrasov E.D., Chestkov I.V., Surdina A.V., Vasina E.M., Bogomazova A.N., Manuilova E.S., Arsenyeva E.L., Simonova V.V., Konovalova E.V., Fedotova E. Yu., Abramychyeva N.Yu., Khaspekov L.G., Grivennikov I.A., Tarantul V.Z., Kiselev S.L., Illarioshkin S.N. A platform for studying molecular and cellular mechanisms of Parkinson's disease based on human induced pluripotent stem cells. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(4): 157, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.4.20>.
19. Lundin A., Delsing L., Clausen M., Ricchiuto P., Sanchez J., Sabirsh A., Ding M., Synnergren J., Zetterberg H., Brolén G., Hicks R., Herland A., Falk A. Human iPSC-derived astroglia from a stable neural precursor state show improved functionality compared with conventional astrocytic models. *Stem Cell Reports* 2018; 10(3): 1030–1045, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.021>.
20. Nahirney P.C., Tremblay M.E. Brain ultrastructure: putting the pieces together. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 629503, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.629503>.
21. Ramos-Gonzalez P., Mato S., Chara J.C., Verkhatsky A., Matute C., Cavaliere F. Astrocytic atrophy as a pathological feature of Parkinson's disease with LRRK2 mutation. *NPJ Parkinsons Dis* 2021; 7(1): 31, <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00175-w>.
22. Smith W.W., Pei Z., Jiang H., Moore D.J., Liang Y., West A.B., Dawson V.L., Dawson T.M., Ross C.A. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(51): 18676–18681, <https://doi.org/10.1073/pnas.0508052102>.
23. Bak L.K., Walls A.B., Schousboe A., Waagepetersen H.S. Astrocytic glycogen metabolism in the healthy and diseased brain. *J Biol Chem* 2018; 293(19): 7108–7116, <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.803239>.
24. Vetchinova A.S., Kapkaeva M.R., Ivanov M.V., Kutukova K.A., Mudzhiri N.M., Frumkina L.E., Brydun A.V., Sukhorukov V.S., Illarioshkin S.N. Mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons derived from patients with LRRK2- and SNCA-associated genetic forms of Parkinson's disease. *Curr Issues Mol Biol* 2023; 45(10): 8395–8411, <https://doi.org/10.3390/cimb45100529>.
25. Singh A., Zhi L., Zhang H. LRRK2 and mitochondria: recent advances and current views. *Brain Res* 2019; 1702: 96–104, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.06.010>.
26. Cherra S.J. 3rd, Steer E., Gusdon A.M., Kiselyov K., Chu C.T. Mutant LRRK2 elicits calcium imbalance and depletion of dendritic mitochondria in neurons. *Am J Pathol* 2013; 182(2): 474–484, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.10.027>.
27. Lee J.H., Han J.H., Kim H., Park S.M., Joe E.H., Jou I. Parkinson's disease-associated LRRK2-G2019S mutant acts through regulation of SERCA activity to control ER stress in astrocytes. *Acta Neuropathol Commun* 2019; 7(1): 68, <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0716-4>.
28. Matuz-Mares D., González-Andrade M., Araiza-Villanueva M.G., Vilchis-Landeros M.M., Vázquez-Meza H. Mitochondrial calcium: effects of its imbalance in disease. *Antioxidants (Basel)* 2022; 11(5): 801, <https://doi.org/10.3390/antiox11050801>.
29. Higgins C.M., Jung C., Xu Z. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* 2003; 4: 16, <https://doi.org/10.1186/1471-2202-4-16>.
30. Chaanine A.H. Morphological stages of mitochondrial vacuolar degeneration in phenylephrine-stressed cardiac myocytes and in animal models and human heart failure. *Medicina (Kaunas)* 2019; 55(6): 239, <https://doi.org/10.3390/medicina55060239>.
31. Lee S.J., Zhang J., Choi A.M., Kim H.P. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 327167, <https://doi.org/10.1155/2013/327167>.
32. Sánchez-Danés A., Richaud-Patin Y., Carballo-Carbajal I., Jiménez-Delgado S., Caig C., Mora S., Di Guglielmo C., Ezquerro M., Patel B., Giralto A., Canals J.M., Memo M., Alberch J., López-Barneo J., Vila M., Cuervo A.M., Tolosa E., Consiglio A., Raya A. Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPSC-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med* 2012; 4(5): 380–395, <https://doi.org/10.1002/emmm.201200215>.
33. Liu L., Zhang K., Sandoval H., Yamamoto S., Jaiswal M., Sanz E., Li Z., Hui J., Graham B.H., Quintana A., Bellen H.J. Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell* 2015; 160(1–2): 177–190, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.019>.
34. Mallick K., Paul S., Banerjee S., Banerjee S. Lipid droplets and neurodegeneration. *Neuroscience* 2024; 549: 13–23, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2024.04.014>.
35. Galper J., Kim W.S., Dzamko N. LRRK2 and lipid pathways: implications for Parkinson's disease. *Biomolecules* 2022; 12(11): 1597, <https://doi.org/10.3390/biom12111597>.