

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЛИАЛЬНЫЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР, НА СОСТОЯНИЕ МИКРОГЛИИ И АСТРОЦИТОВ У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

ПЕТУХОВА ЕЛЕНА ОЛЕГОВНА, ORCID ID: 0000-0002-9100-815X; научный сотрудник Института нейронаук ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, Россия, Казань, ул. Бутлерова, д.49, телефон: +7-843-292-72-99, e-mail: petukhovaeo@mail.ru

МУХАМЕДШИНА ЯНА ОЛЕГОВНА, ORCID ID: 0000-0002-9435-340X; канд. мед. наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, Россия, Казань, ул. Бутлерова 49, ведущий научный сотрудник Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, Россия, Казань, ул. Кремлевская, д. 18, телефон: +7-843-292-76-19, e-mail: yana.k-z-n@mail.ru

ТИМОФЕЕВА АННА ВИКТОРОВНА, ORCID ID: 0000-0002-3393-6775; лаборант-исследователь Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, Россия, Казань, ул. Кремлевская, д. 18, телефон: +7-843-292-76-19, anna_tima@mail.ru

РИЗВАНОВ АЛЬБЕРТ АНАТОЛЬЕВИЧ, ORCID ID: 0000-0002-9427-5739; доктор биол. наук, главный научный сотрудник Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, Россия, Казань, ул. Кремлевская, д. 18, телефон: +7-843-293-43-07, e-mail: rizvanov@gmail.com

МУХАМЕДЬЯРОВ МАРАТ АЛЕКСАНДРОВИЧ, ORCID ID: 0000-0002-0397-9002; доктор мед. наук, профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, Россия, Казань, ул. Бутлерова, д.49, тел. +7-843-292-72-99, e-mail: marat.muhamedyarov@kazangmu.ru

Реферат. Введение. Болезнь Альцгеймера - нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующим снижением когнитивных функций. Болезнь Альцгеймера является самой распространенной формой деменции и одной из основных причин инвалидности пожилых людей. Нейровоспаление является важным фактором патогенеза болезни Альцгеймера. Нейровоспалительная реакция, наблюдаемая при болезни Альцгеймера, в первую очередь вызвана резидентными иммунными клетками центральной нервной системы, в том числе микроглией и астроцитами. **Цель исследования.** Целью данной работы стало изучение влияния трансплантации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, сверхэкспрессирующих глиальный нейротрофический фактор - GDNF, на состояние микроглии и астроцитов у APP/PS1 трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера. **Материалы и методы.** Ксенотрансплантация генно-клеточных конструкций экспериментальным животным осуществлялась ретроорбитально, однократно в количестве 2 млн. клеток. Иммунофлуоресцентное исследование криостатных срезов головного мозга осуществляли путем применения антител к ионизированной кальций-связывающей адапторной молекуле 1 (маркер микроглии и макрофагов) и антител к глиальному фибриллярному белку (маркер астроцитов) и последующей визуализации на конфокальном сканирующем микроскопе LSM 510-Meta (Carl Zeiss). **Результаты и их обсуждение.** Было выявлено, что трансплантация мононуклеарных клеток пуповинной крови, сверхэкспрессирующих GDNF, снижала выраженность микроглиоза в теменной коре и зубчатой извилине гиппокампа, а также снижала выраженность астроглиоза в СА3 зоне гиппокампа головного мозга APP/PS1 мышей. Трансплантация мононуклеарных клеток пуповинной крови, сверхэкспрессирующих усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), только снижала выраженность микроглиоза в теменной коре APP/PS1 мышей. **Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале трансплантации мононуклеарных клеток пуповинной крови, сверхэкспрессирующих GDNF, при альцгеймеровской нейропатологии.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, нейровоспаление, микроглия, астроциты, генно-клеточная терапия.

Для ссылки: Влияние трансплантации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, сверхэкспрессирующих глиальный нейротрофический фактор, на состояние микроглии и астроцитов у трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера / Е.О. Петухова, Я.О. Мухамедшина, А.В. Тимофеева, [и др.] // Вестник современной клинической медицины. – 2022. – Т. 15, вып. 1. – С.68–75. DOI: 10.20969/VSKM.2022.15(1).68-75.

EFFECT OF TRANSPLANTATION OF HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD MONONUCLEAR CELLS OVEREXPRESSING GLIAL NEUROTROPHIC FACTOR ON THE STATE OF MICROGLIA AND ASTROCYTES IN TRANSGENIC MICE WITH ALZHEIMER'S DISEASE MODEL

PETUKHOVA ELENA O., ORCID ID: 0000-0002-9100-815X; Researcher, Institute of Neuroscience, Kazan State Medical University, 49 Butlerova str., Kazan, 420012, Russia, tel: +7-843-292-72-99, e-mail: petukhovaeo@mail.ru

MUKHAMEDSHINA YANA O., ORCID ID: 0000-0002-9435-340X; C. Med. Sci., Associate Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University, 420012, Russia, Kazan, 49 Butlerova Str., Leading Researcher of Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, 18 Kremlevskaya Str., Kazan, 420008, Russia, tel: +7-843-292-76-19, e-mail: yana.k-z-n@mail.ru

TIMOFEEVA ANNA V., ORCID ID: 0000-0002-3393-6775; laboratory assistant-researcher of Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Kremlevskaya str. 18, 420008, Russia, tel: +7-843-292-76-19, anua_tima@mail.ru

RIZVANOV ALBERT A., ORCID ID: 0000-0002-9427-5739; Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher of Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Kremlevskaya str. 18, 420008, Russia, tel: +7-843-293-43-07, e-mail: rizvanov@gmail.com

MUKHAMEDYAROV MARAT A., ORCID ID: 0000-0002-0397-9002; Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Normal Physiology, Kazan State Medical University, 49 Butlerova str., Kazan, 420012, Russia, tel: +7-843-292-72-99, e-mail: marat.muhamedyarov@kazangmu.ru

Abstract. Introduction. Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease characterized by a progressive decline in cognitive functions. Alzheimer's disease is the most common form of dementia and one of the main causes of disability in older people. Neuroinflammation is an important factor in the pathogenesis of Alzheimer's disease. The neuroinflammatory reaction observed in Alzheimer's disease is primarily caused by resident immune cells of the central nervous system, including microglia and astrocytes. **Aim.** The aim of this work was to study the effect of transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells (UCBMC) overexpressing glial neurotrophic factor (GDNF) on the state of microglia and astrocytes in APP/PS1 transgenic mice with Alzheimer's disease model. **Material and methods.** Xenotransplantation of gene-cell structures to experimental animals was carried out retroorbitally, once in the amount of 2 million cells. Immunofluorescence examination of cryostatic sections of the brain was carried out by applying antibodies to ionized calcium-binding adaptive molecule 1 (Iba1, marker of microglia and macrophages) and antibodies to glial fibrillar acid protein (GFAP, marker of astrocytes) and subsequent imaging on a confocal scanning microscope LSM 510-Meta (Carl Zeiss). **Results and discussion.** It was found that transplantation of UCBMC overexpressing GDNF reduced the severity of microgliosis in the parietal cortex and dentate gyrus of the hippocampus, and also reduced the severity of astrogliosis in the CA3 zone of the hippocampus of the brain of APP/PS1 mice. Transplantation of UCBMC overexpressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) only reduced the severity of microgliosis in the parietal cortex of APP/PS1 mice. **Conclusion.** The data obtained indicate a high therapeutic potential of transplantation of UCBMC overexpressing GDNF in Alzheimer's neuropathology.

Keywords: Alzheimer's disease, neuroinflammation, microglia, astrocytes, gene-cell therapy.

For reference: Petukhova EO, Mukhamedshina YO, Timofeeva AV, Rizvanov AA, Mukhamedyarov MA. The effect of transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells overexpressing glial neurotrophic factor on the state of microglia and astrocytes in transgenic mice with Alzheimer's disease model. // Вестник современной клинической медицины. – 2022. – Т. 15, вып. 1. – С.68–75. DOI: 10.20969/VSKM.2022.15(1).68-75.

Введение. Болезнь Альцгеймера (БА) - нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующим снижением когнитивных функций. БА является самой распространенной формой деменции и одной из основных причин инвалидности пожилых людей [1]. Нейровоспаление является важным фактором патогенеза БА. Воспалительная реакция, наблюдаемая при БА, в первую очередь вызвана резидентными иммунными клетками ЦНС, а именно микроглией, периваскулярными миелиноидными клетками и астроцитами, и в целом отражает реакцию тканей на патологические события, возникающие при болезни [2].

Согласно бета-амилоидной теории патогенеза БА, активация иммунной системы следует за отложением бета-амилоида. Но не исключается, что иммунные реакции могут иметь ключевую роль в иницировании болезни Альцгеймера независимо от бета-амилоида. В частности, было показано, что системный иммунный вызов вирусной имитацией полирибоинозиновой-полирибозитидиловой кислотой «спорадически» приводил к развитию БА-подобной нейропатологии, включающей амилоидные бляшки, агрегацию тау-белка, активацию микроглии и реактивный глиоз у мышей дикого

типа, что позволяет предположить, что иммунные события могут предшествовать патологии, подобной БА, и достаточны для ее возникновения [3]. Нейровоспалительные реакции могут быть вызваны как внутренними факторами центральной нервной системы (ЦНС), так и системными влияниями. Системное воспаление может быть результатом хронических заболеваний, таких как псориаз, который связан с повышенным риском развития деменции, включая БА [4], или сахарный диабет 2-го типа, при котором описаны воспаление в ЦНС и активация микроглии [5]. Внутренние нейровоспалительные состояния ЦНС (например, черепно-мозговая травма [6]) также способствуют развитию БА. Активация иммунной системы при БА может поддерживать повышенные уровни бета-амилоида, обостряя патологию и формируя порочный патофизиологический цикл [2]. Нейровоспаление при БА опосредовано дисфункцией миелиноидных клеток (преимущественно микроглии) и астроцитов. Нарушение функции глияльных клеток поддерживает и ускоряет течение болезни. Многочисленные исследования указывают на перспективность модуляции иммунной реакции в качестве мишени для разработки терапевтических стратегий против БА [2].

Известно, что системное введение мононуклеарных клеток пуповинной крови (МКПК) человека в моделях БА на мышах способно модулировать иммунные реакции и таким образом влиять на ход развития нейродегенеративных процессов. На двух трансгенных линиях мышей с генетическими моделями БА (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 [7,8,9]. Известно, что глиальный нейротрофический фактор (GDNF), выделяемый астроцитами, является мощным блокатором активации микроглии, что говорит о его иммуномодулирующей роли в пределах ЦНС [10].

Цель исследования. Целью данной работы стало изучение влияния трансплантации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, сверхэкспрессирующих GDNF, на состояние микроглии и астроцитов у APP/PS1 трансгенных мышей с моделью БА.

Материал и методы. Создание генно-клеточных конструкций. 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. МКПК ресуспензировали в среде DMEM с добавлением сыворотки крови плодородной коровы (10%), L-глутамина (2 мМ) и смеси антибиотиков (пенициллин и стрептомицин - 1%) и трансдуцировали рекомбинантными аденовирусами, экспрессирующими ген усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) или GDNF (10 бляшко-образующих единиц на клетку). После этого клетки культивировали 14-16 часов во влажной атмосфере при 37°C с поддержанием 5%-ного уровня CO₂. Перед трансплантацией МКПК осаждали центрифугированием и разводили в стерильном физиологическом растворе до концентрации 2x10⁶ клеток/100 мкл.

Объект исследования. Мыши с генетической моделью болезни Альцгеймера, экспрессирующие мутантные человеческие гены белка предшественника амилоида и пресенилина 1 (APP^{swe}/PS1^{ΔE9} или APP/PS1 мыши) были закуплены в Jackson Laboratory (США) и содержатся в питомнике лабораторных животных «Пушино» (Московская область). К началу эксперимента мышам доставили в КГМУ. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении и температуре окружающего воздуха 22±2°C, с постоянным доступом к комбинированному корму и воде. Исследование было одобрено 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=4); 2) «Alz» - APP/PS1 мыши (n=4); 3) «Alz-EGFP» - APP/PS1 мыши после трансплантации МКПК, экспрессирующих репортерный белок EGFP (n=4); 4) «Alz-GDNF» - APP/PS1 мыши после трансплантации МКПК, экспрессирующих GDNF (n=4). 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 12 месяцев.

Иммунофлуоресцентное окрашивание криостатных срезов. На 9-й день после трансплантации генно-клеточных конструкций мышам усыпляли и извлекали головной мозг. Изготавливали фронтальные срезы головного мозга на уровне от -1.5 до -2.5 мм от брегмы с применением микротом-криостата HM560 Cryo-Star (Carl Zeiss). Перед окрашиванием криостатные срезы промывали в 0.1%-ном растворе Triton-X100 на фосфатно-солевом буфере (PBST) и инкубировали в 5%-ном 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). Миелоидные клетки метили антителами к ионизированной кальций-связывающей адапторной молекуле 1 (Iba1, ionized calcium binding adaptor molecule 1), астроциты - антителами к глиальному фибриллярному белку (GFAP, glial fibrillary acidic protein). Iba1 - специфичный для макрофагов и микроглии кальций-связывающий белок. При наличии в мозге воспалительных процессов Iba1-позитивные клетки увеличиваются в количестве, а их активированные формы отличаются повышенной экспрессией Iba1. GFAP 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. Применяли следующие первичные и вторичные антитела: rabbit anti-Iba1 (1:200, Abcam), rabbit anti-GFAP (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, теменную кору больших полушарий головного мозга. Экспрес-

сию GFAP, а также количество GFAP-позитивных клеток оценивали только в теменной коре, в CA1 и CA3 зонах гиппокампа (GFAP экспрессируется в субгранулярной зоне гиппокампа недифференцированными клетками, в связи с этим зубчатая извилина была исключена из анализа). 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). Провели подсчет клеток глии, ядра которых находились в проекции среза, на площади 228.6×228.6 мкм. Количество клеток в группе мышей дикого типа приняли за 100%. Результаты, полученные в остальных группах, нормализовали относительно контроля. Результаты морфометрии обрабатывали с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Бонферрони или U-критерия Манна-Уитни, отличия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Влияние трансплантации генно-клеточных конструкций на иммуноэкспрессию Iba1.

У Alz мышей по сравнению с WT мышами количество Iba1-позитивных клеток было досто-

верно увеличено в теменной коре и зубчатой извилине гиппокампа и составило $261.5 \pm 31.1\%$ и $250.8 \pm 22.7\%$ от значений, полученных у WT мышей, соответственно (рис. 1А-Б, рис. 2). Средняя плотность свечения у Alz мышей была повышена и составила $189.4 \pm 10.5\%$, $122.2 \pm 7.3\%$, $132.1 \pm 8.2\%$ и $148.4 \pm 15.3\%$ в теменной коре, зубчатой извилине, CA1 и CA3 зонах гиппокампа соответственно, относительно показателей WT мышей (рис. 1Д-З, рис. 2). Таким образом, у мышей с моделью БА в теменной коре и зубчатой извилине гиппокампа было увеличено как количество миелоидных клеток, так и экспрессия Iba1. В CA1 и CA3 зонах гиппокампа, очевидно, воспалительная реакция со стороны миелоидных клеток проявилась в большей степени увеличением количества их активированных форм, нежели общего числа. У Alz-EGFP мышей не наблюдалось достоверных изменений количества Iba1-позитивных клеток в сравнении с Alz мышами в исследованных областях мозга (рис. 1А-Г, рис. 2). Средняя плотность свечения Iba1 в гиппокампе достоверно не отличалась от таковой у Alz мышей (рис. 1Е-З, рис. 2), однако в теменной коре была достоверно снижена в сравнении с Alz мышами (Рис. 1Д, Рис. 2).

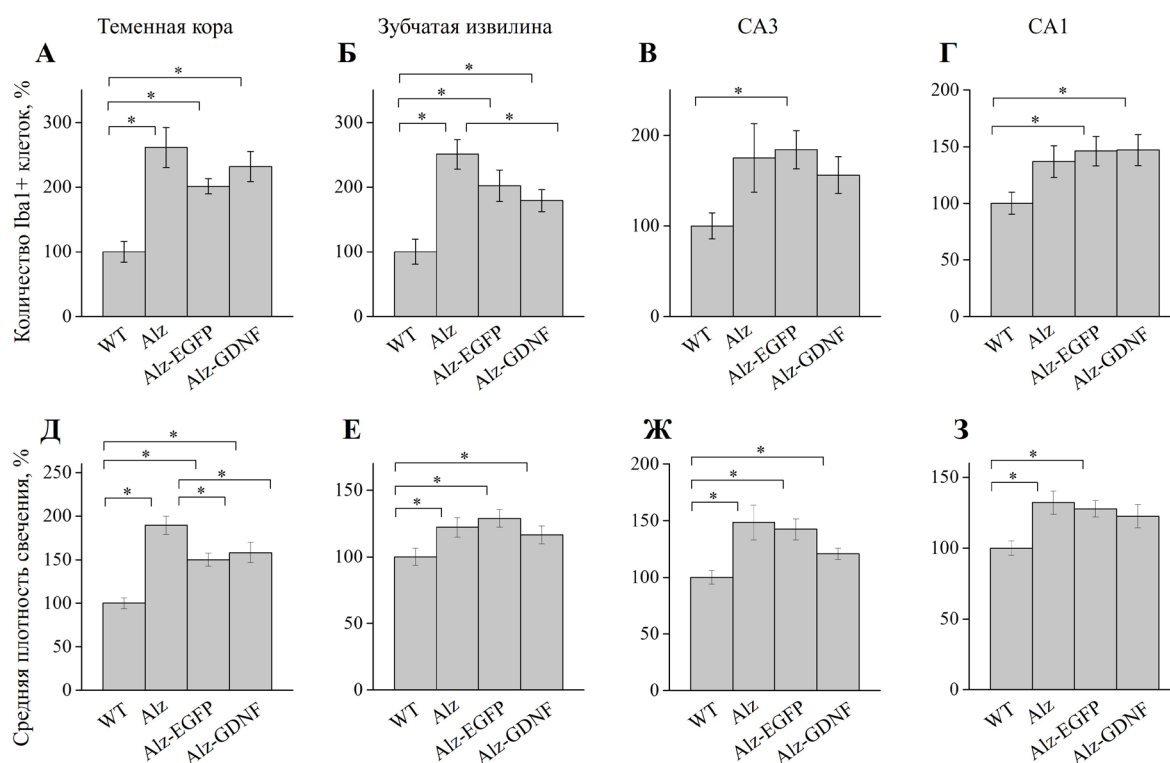


Рисунок 1. Показатели иммуноэкспрессии Iba1 в срезах мозга

На рисунке представлены количество Iba1-позитивных (Iba1+) клеток и средняя плотность свечения Iba1 в теменной коре (А, Д), зубчатой извилине (Б, Е), СА3 (В, Ж) и СА1 (Г, З) зонах гиппокампа экспериментальных групп мышей WT, Alz, Alz-EGFP, Alz-GDNF. *Статистически значимое отличие по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0.05$.

Figure 1. Parameters of Iba1 immunorexpression in brain slices

The figure shows the number of Iba1-positive (Iba1+) cells and the average density of Iba1 fluorescence in the parietal cortex (А, Е), dentate gyrus (Б, F), CA3 (C, G) and CA1 (D, H) areas of the hippocampus in the following experimental groups of mice: WT, Alz, Alz-EGFP, Alz-GDNF. *Significant difference according to the Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$.

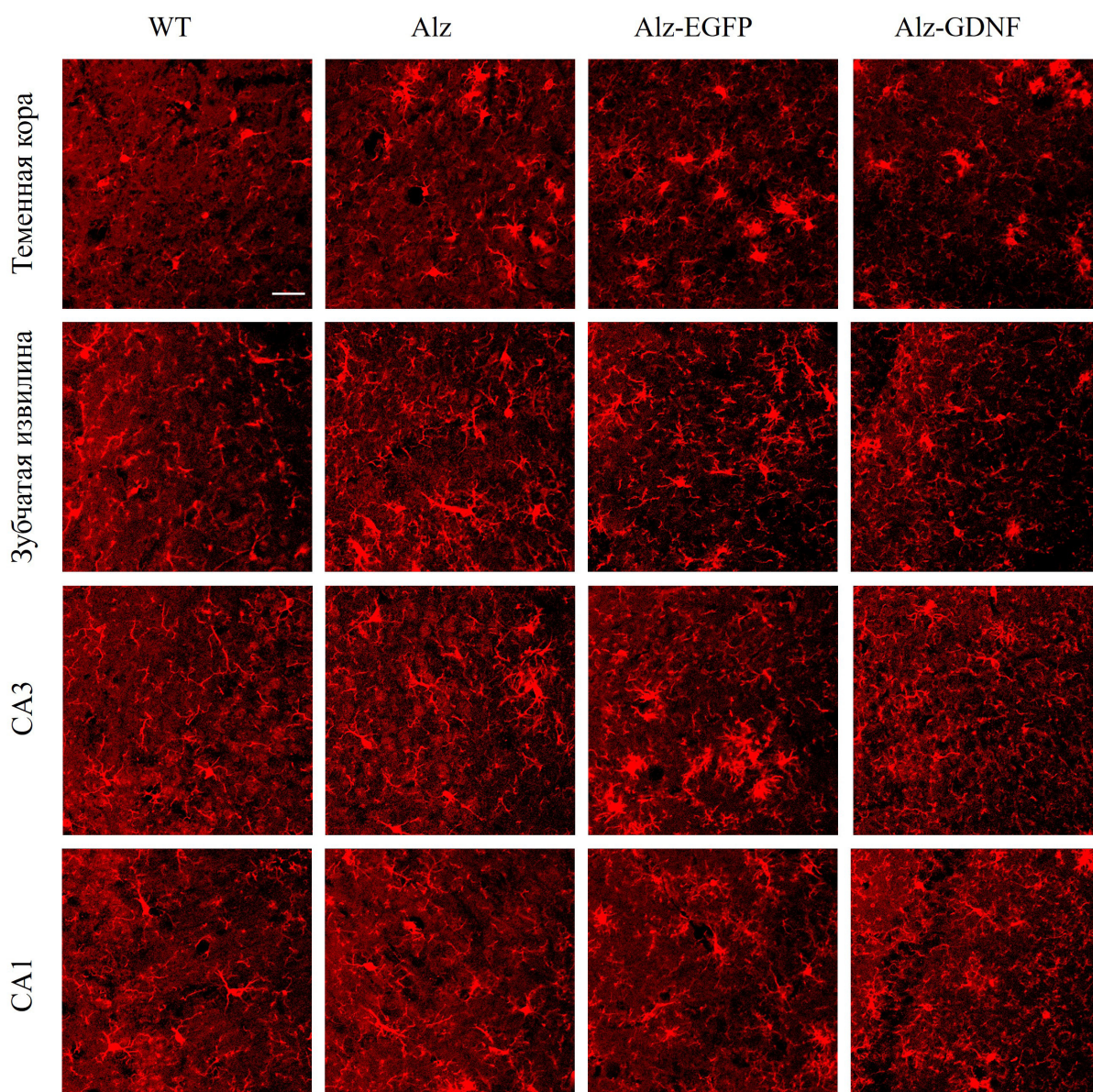


Рисунок 2. Иммуноэкспрессия Iba1 в срезах мозга

На рисунке представлены микрофотографии иммунофлуоресценции Iba1 в срезах теменной коры, зубчатой извилины, CA3, CA1 зон гиппокампа экспериментальных групп мышей WT, Alz, Alz-EGFP, Alz-GDNF. Масштабная линейка: 30 мкм.

Figure 2. Iba1 immunorexpression in brain slices

The figure shows microphotographs of Iba1 immunofluorescence in sections of the parietal cortex, dentate gyrus, CA3, CA1 areas of the hippocampus in the following experimental groups of mice: WT, Alz, Alz-EGFP, Alz-GDNF. Scale bar: 30 mkm.

Эти данные предполагают снижение активации микроглии в теменной коре. У Alz-GDNF мышей наблюдалось достоверное снижение количества Iba1-позитивных клеток в зубчатой извилине в сравнении с данным показателем у Alz мышей (рис. 1Б, рис.2). Средняя плотность свечения Iba1 у Alz-GDNF мышей была достоверно снижена в теменной коре в сравнении с Alz мышами (рис. 1Д, рис.2).

Таким образом, трансплантация МКПК, сверхэкспрессирующих GDNF, снижала выраженность микроглиоза в теменной коре и зубчатой извилине гиппокампа головного мозга APP/PS1 мышей. Трансплантация МКПК, сверхэкспрессирующих EGFP, снижала выраженность микроглиоза только в теменной коре APP/PS1 мышей.

Влияние трансплантации генно-клеточных конструкций на иммуноэкспрессию GFAP.

У Alz мышей количество GFAP-позитивных клеток и средняя плотность свечения GFAP были достоверно выше в теменной коре ($380 \pm 50.7\%$ и $245.8 \pm 43.5\%$ соответственно от значений у WT мышей) и CA3 зоне гиппокампа ($184.7 \pm 10.2\%$ и $183.6 \pm 30.7\%$ соответственно от значений у WT мышей) в сравнении с показателями у WT мышей (рис. 3, 4). У Alz-EGFP мышей не было выявлено достоверных изменений количества GFAP-позитивных клеток и средней плотности свечения GFAP в теменной коре и CA3 зоне гиппокампа в сравнении с Alz мышами. В CA1

зоне гиппокампа у Alz-EGFP мышей количество GFAP-позитивных клеток и средняя плотность свечения GFAP были достоверно ниже в сравнении с Alz мышами ($102.4 \pm 4.2\%$ и $95.3 \pm 9.6\%$, соответственно, от значений WT мышей) (рис. 3, 4). У Alz-GDNF мышей было выявлено достоверное снижение количества GFAP-позитивных клеток в теменной коре ($124.4 \pm 13.2\%$ от значений WT мышей) в сравнении с Alz мышами; других отличий в показателях иммуноэкспрессии GFAP у Alz-GDNF мышей в сравнении с Alz мышами не было выявлено (рис. 3, 4).

Таким образом, трансплантация МКПК, сверхэкспрессирующих GDNF, снижала выраженность астроглиоза в CA3 зоне гиппокампа

трансгенных мышей с моделью БА. Трансплантация МКПК, сверхэкспрессирующих EGFP, снижала иммуноэкспрессию GFAP в CA1 зоне гиппокампа трансгенных мышей с моделью БА (необходимо отметить, что в данной области головного мозга у APP/PS1 мышей нами не было выявлено достоверных признаков астроглиоза).

Выводы. Нами было выявлено, что трансплантация генно-клеточных конструкций на основе МКПК, сверхэкспрессирующих EGFP или GDNF, может модулировать процессы активации микроглии и астроцитов в головном мозге APP/PS1 мышей. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что трансплантация МКПК, сверхэкспрессирующих GDNF,

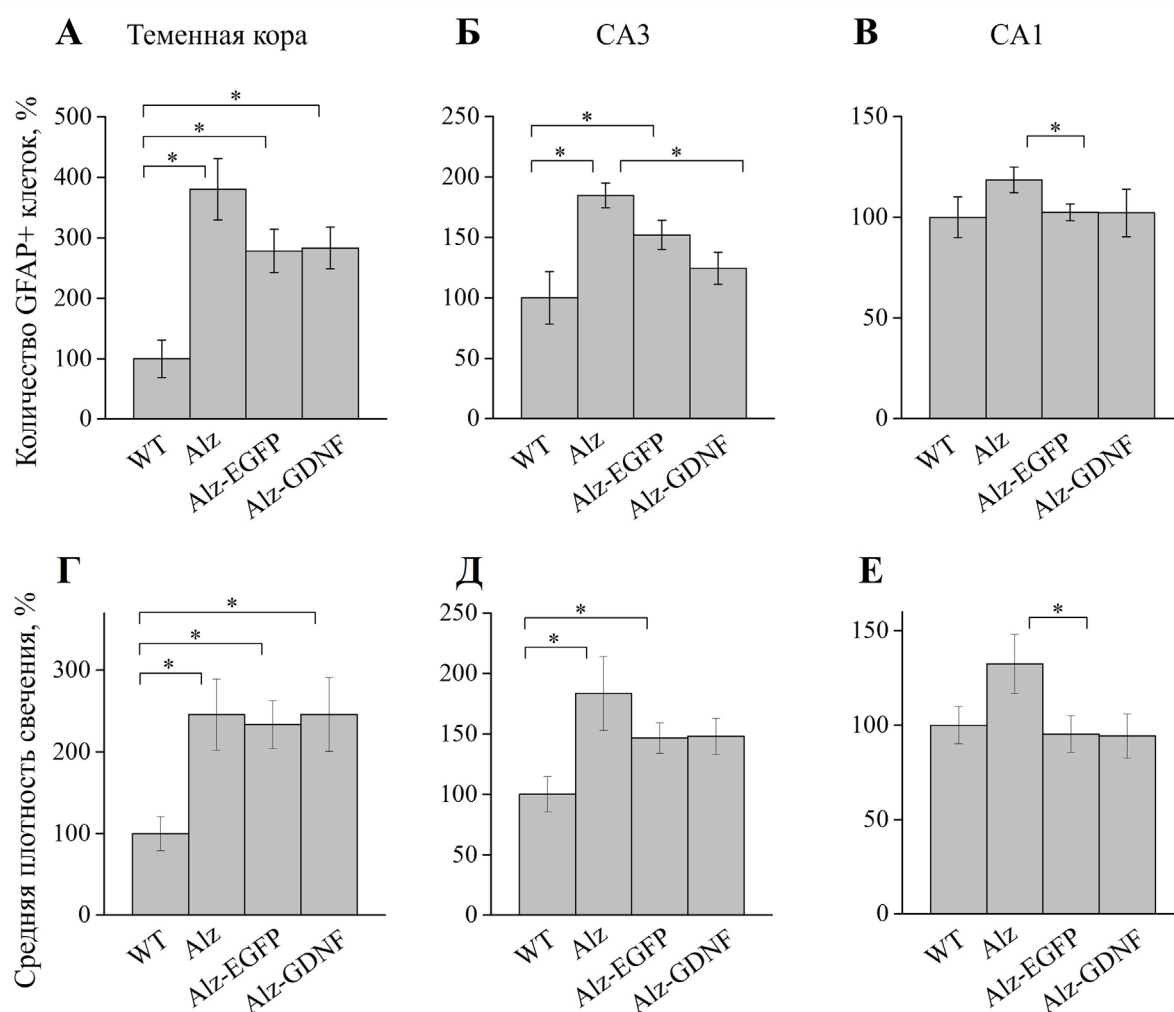


Рисунок 3. Показатели иммуноэкспрессии GFAP в срезах мозга.

На рисунке представлены количество GFAP-позитивных (GFAP+) клеток и средняя плотность свечения GFAP в теменной коре (А, Г), CA3 (Б, Д) и CA1 (В, Е) зонах гиппокампа экспериментальных групп мышей WT, Alz, Alz-EGFP, Alz-GDNF. *Статистически значимое отличие по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0.05$.

Figure 3. Parameters of GFAP immunoexpression in brain slices.

The figure shows the number of GFAP-positive (GFAP+) cells and the average density of GFAP fluorescence in the parietal cortex (A, D), CA3 (B, E) and CA1 (C, F) areas of the hippocampus in the following experimental groups of mice: WT, Alz, Alz-EGFP, Alz-GDNF.

*Significant difference according to the Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$.

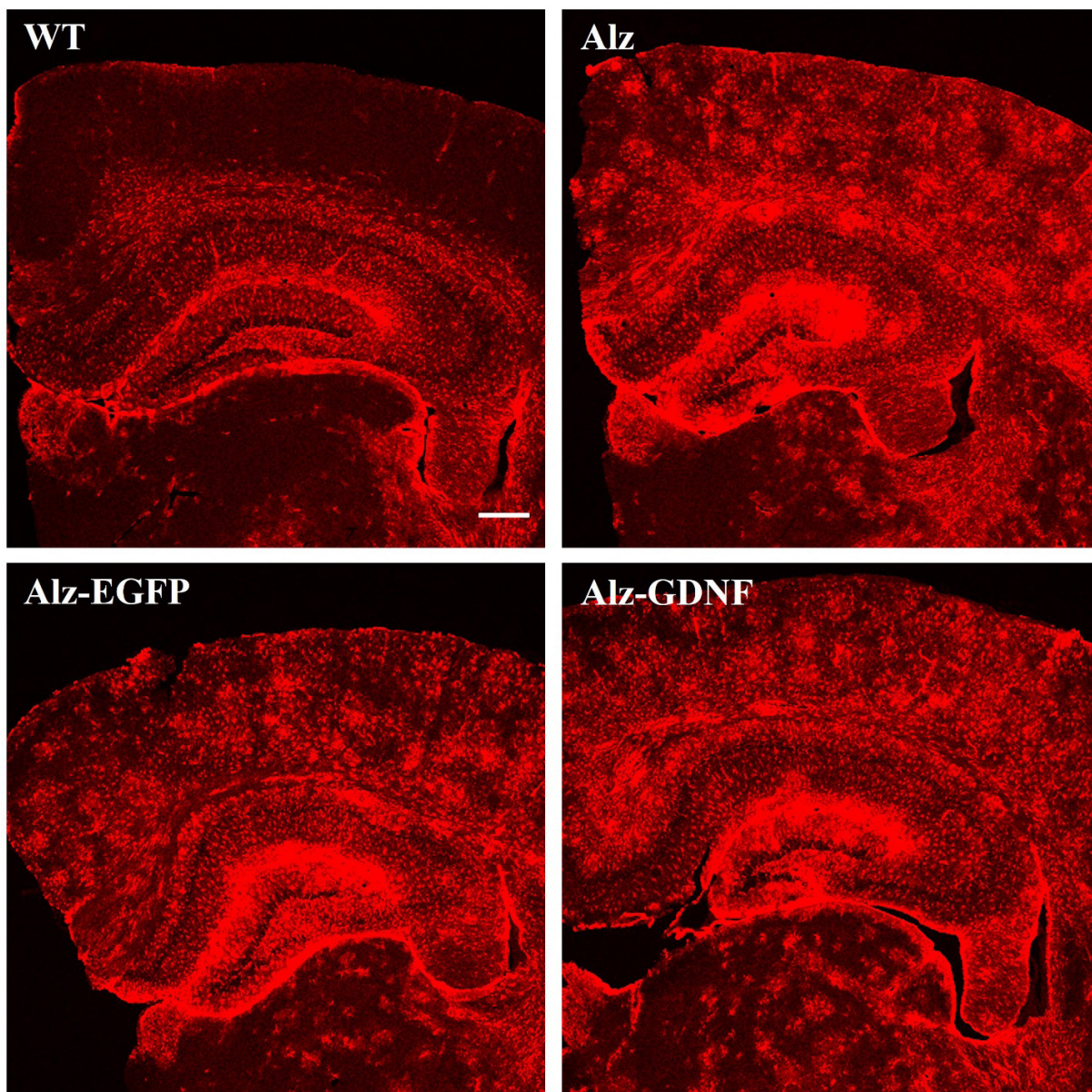


Рисунок 4. Иммуноэкспрессия GFAP в срезах мозга

На рисунке представлены микрофотографии иммунофлуоресценции GFAP в срезах теменной коры и гиппокампа экспериментальных групп мышей WT, Alz, Alz-EGFP, Alz-GDNF. Масштабная линейка: 300 мкм.

Figure 4. GFAP immunoeexpression in brain slices

The figure shows microphotographs of GFAP immunofluorescence in sections of the parietal cortex, dentate gyrus, CA3, CA1 areas of the hippocampus in the following experimental groups of mice: WT, Alz, Alz-EGFP, Alz-GDNF. Scale bar: 300 mkm.

более эффективно подавляет выраженность микроглиоза и астроглиоза в головном мозге APP/PS1 мышей в сравнении с трансплантацией МКПК, сверхэкспрессирующих EGFP. В частности, у Alz-GDNF мышей было выявлено снижение выраженности микроглиоза в теменной коре и зубчатой извилине гиппокампа, а также снижение выраженности астроглиоза в CA3 зоне гиппокампа в сравнении с Alz мышами. У Alz-EGFP мышей было выявлено только снижение выраженности микроглиоза в теменной коре гиппокампа в сравнении с Alz мышами. Мы установили, что трансплантация мононуклеарных клеток

пуховинной крови человека, сверхэкспрессирующих глиальный нейротрофический фактор, снижает выраженность микроглиоза и астроглиоза в головном мозге трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера. Полученные данные свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале данной генно-клеточной конструкции при альцгеймеровской нейропатологии.

Прозрачность исследования. Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях. Все авторы принимали участие в разработке концепции и дизайна исследования, а также в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований и Академии наук Республики Татарстан (проект №18-415-160016).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol.* 2003; 60 (8): 1119-1122. DOI: 10.1001/archneur.60.8.1119.
2. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2015; 16 (6): 358-372. DOI: 10.1038/nrn3880.
3. Krstic D, Madhusudan A, Doehner J, Vogel P, Notter T, Imhof C, Manalastas A, Hilfiker M, Pfister S, Schwerdel C, Riether C, Meyer U, Knuesel I. Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *J Neuroinflammation.* 2012; 9: 151. DOI: 10.1186/1742-2094-9-151.
4. Gisondi P, Sala F, Alessandrini F, Avesani V, Zoccatelli G, Beltramello A, Moretto G, Gambina G, Girolomoni G. Mild cognitive impairment in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis. *Dermatology.* 2014; 228 (1): 78-85. DOI: 10.1159/000357220.
5. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012; 122 (1): 153-162. DOI: 10.1172/JCI59660.
6. Mayeux R, Ottman R, Tang MX, Noboa-Bauza L, Marder K, Gurland B, Stern Y. Genetic susceptibility and head injury as risk factors for Alzheimer's disease among community-dwelling elderly persons and their first-degree relatives. *Ann Neurol.* 1993; 33 (5): 494-501. DOI: 10.1002/ana.410330513.
7. Darlington D, Deng J, Giunta B, Hou H, Sanberg CD, Kuzmin-Nichols N, Zhou HD, Mori T, Erhart J, Sanberg PR, Tan J. Multiple low-dose infusions of human umbilical cord blood cells improve cognitive impairments and reduce amyloid-beta-associated neuropathology in Alzheimer mice. *Stem Cells Dev.* 2013; 22 (3): 412-421. DOI: 10.1089/scd.2012.0345.
8. Nikolic WV, Hou H, Town T, Zhu Y, Giunta B, Sanberg CD, Zeng J, Luo D, Erhart J, Mori T, Sanberg PR, Tan J. Peripherally administered human umbilical cord blood cells reduce parenchymal and vascular beta-amyloid deposits in Alzheimer mice. *Stem Cells Dev.* 2008; 17 (3): 423-439. DOI: 10.1089/scd.2008.0018.
9. Петухова Е.О., Мухамедшина Я.О., Ризванов А.А., и др. Трансплантация мононуклеарных клеток пуповинной крови человека улучшает пространственную память у APP/PS1 трансгенных мышей с моделью болезни Альцгеймера // Гены и клетки. – 2014. – Вып. 9, № 3. – С.40-45. [Petuhova EO, Mukhamedshina YO, Rizvanov AA, Mukhitov AR, Zefirov AL, Islamov RR, Mukhamedyarov MA. Transplantaciya mononuklearnih kletok pupovinoj krovi cheloveka uluchshaet prostranstvennuyu pamyat' u APP/PS1 transgennyh myshej s model'yu bolezni Al'cgejmery [Transplantation of mononuclear cells of human umbilical cord blood improves spatial memory in APP/PS1 transgenic mice with Alzheimer's disease model]. *Geny i kletki* [Genes and Cells]. 2014; 9 (3): 40-45. (In Russ.)].
10. Rocha SM, Cristovao AC, Campos FL, Fonseca CP, Baltazar G. Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation. *Neurobiol Dis.* 2012; 47 (3): 407-415. DOI: 10.1016/j.nbd.2012.04.014.