

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из ключевых научных достижений последних десятилетий стала технология репрограммирования соматических клеток животных и человека в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), сходные по морфологии и ключевым свойствам с эмбриональными стволовыми клетками. Впервые ИПСК были получены в 2006 году японскими исследователями К. Такахаши и Ш. Яманака из фибробластов мыши, а в 2007 году – из фибробластов человека. Чрезвычайная важность этих работ уже в 2012 году была отмечена Нобелевской премией.



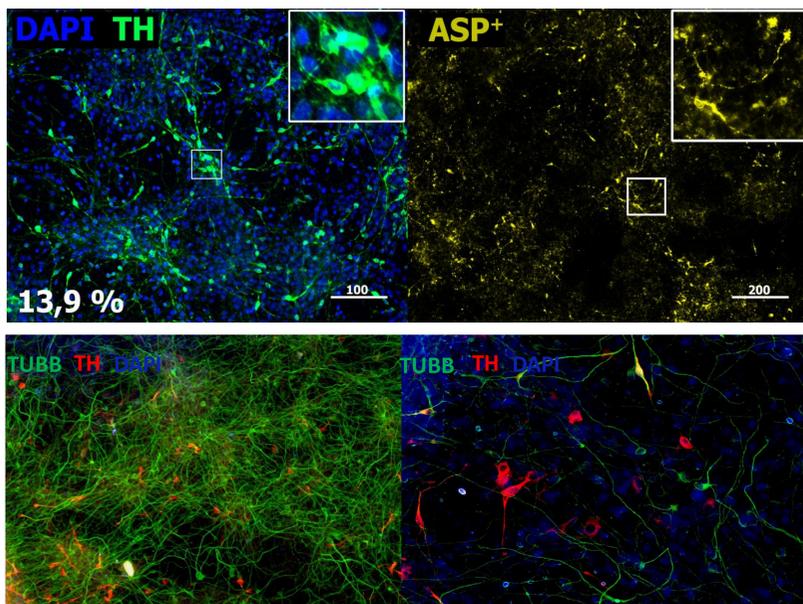
Технология репрограммирования соматических клеток человека с целью получения ИПСК с последующей направленной дифференцировкой в любые соматические клетки, в том числе нейроны, представляет собой огромный научно-теоретический и терапевтический потенциал. Возможность получения из ИПСК нейронов различной медиаторной природы позволяет изучать клеточные и молекулярные механизмы нейродегенеративных заболеваний, в том числе, болезни Паркинсона, осуществлять скрининг новых фармацевтических препаратов, а также создает основу для трансплантационной персонализированной клеточной терапии. Успешное применение для этих целей ИПСК, полученных как от здоровых индивидов, так и от пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, возможно только после тщательного динамического анализа их морфофункциональных свойств, в том числе способности к пластическим перестройкам и установлению синаптических контактов. Одним из методических подходов к такому анализу является электронно-микроскопическое исследование ИПСК на разных стадиях их дифференцировки *in vitro*.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ -

- охарактеризовать ультраструктуру вентральных мезенцефалических нейронов, дифференцированных из ИПСК здорового донора, на различных сроках культивирования *in vitro*.

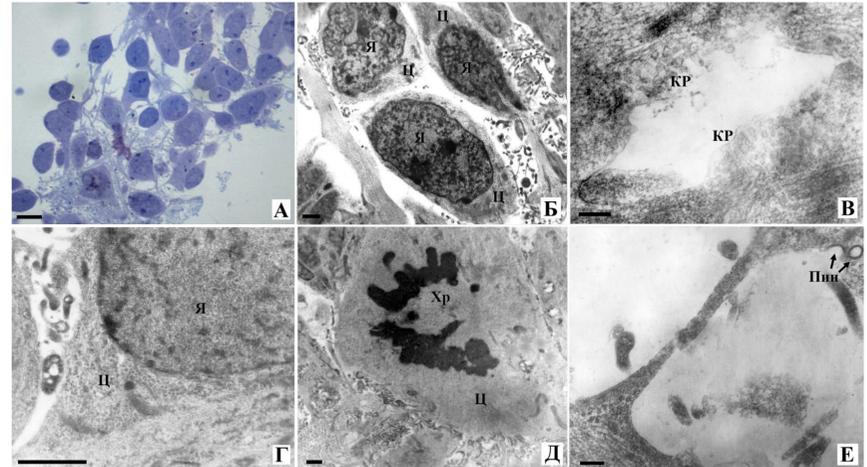
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе была использована полученная ранее клеточная линия ИПСК от здорового донора [Novosadova et al., 2016]. Дифференцировку ИПСК в нейрональном направлении проводили в 3 этапа: нейрональная индукция, региональная спецификация и терминальная дифференцировка. К 7-8 дню терминальной дифференцировки в культурах обнаруживались клетки, иммунопозитивные к b-III-тубулину (Tubb), тирозингидроксилазе (TH) и транспортеру дофамина (ASP+), что подтверждает успешность дифференцировки нейрональных предшественников в направлении дофаминовых мезенцефалических нейронов. Для электронно-микроскопического исследования использовали монослойные культуры клеток на стеклах на 7-й, 14-й и 19-й день терминальной дифференцировки (DIV). Клетки фиксировали 2% глутаральдегидом, постфиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub>, дегидратировали в этаноле восходящей концентрации и заключали в смолу Epon. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе.

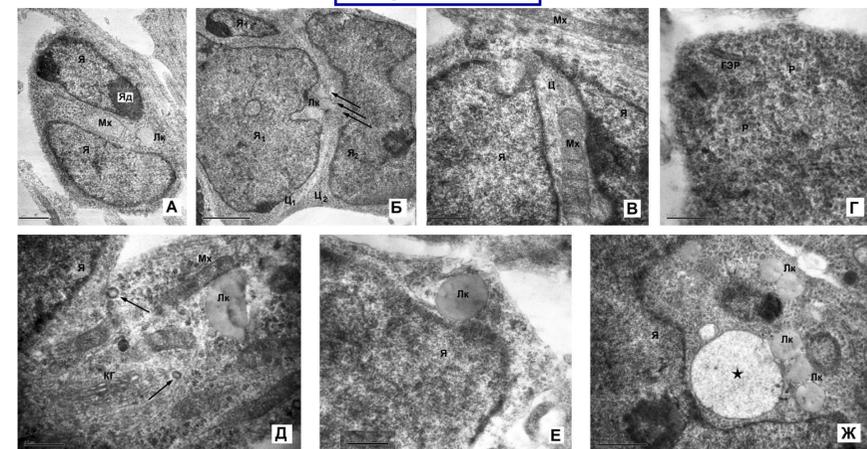


## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

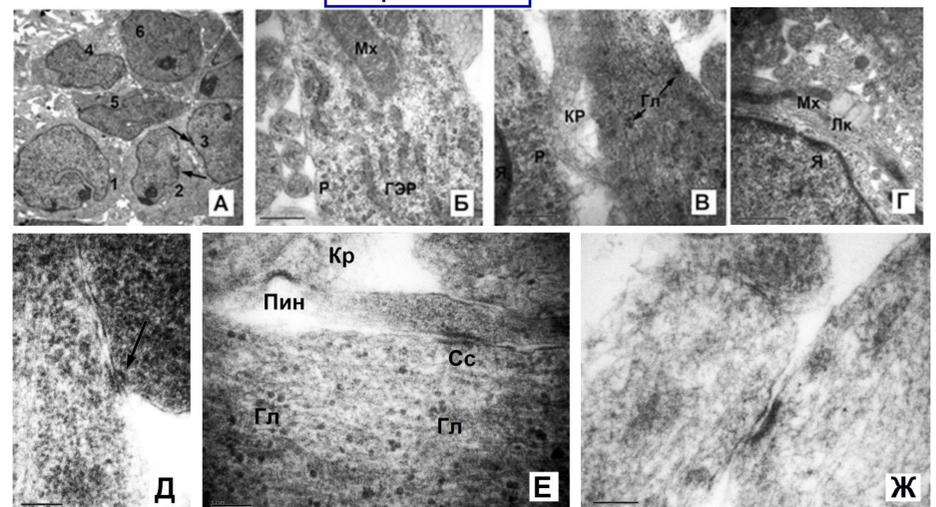
### Нейроны 7 DIV



### Нейроны 14 DIV



### Нейроны 19 DIV



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ультраструктурные изменения в клетках, дифференцированных из ИПСК в нейрональном направлении, происходят по общим закономерностям нейрогенеза и синаптогенеза *in vivo* и *in vitro*. Основного признака функционально зрелых нейронов – химических синапсов с синаптическими пузырьками – к 19 DIV нам обнаружить не удалось. Однако выявленные нами симметричные, асимметричные и смешанные авезикулярные соединения являются ультраструктурным критерием развития и созревания химических синапсов.