

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИОННОГО ПРОФИЛЯ КЛЕТОК В МОДЕЛИ НЕЙРОГЕННОЙ НИШИ ГИППОКАМПА *IN VITRO* ПРИ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

Е.Д. Хилажева*, А.В. Морзун, Е.Б. Бойцова, А.И. Мосягина, А.Н. Шувалов,
Н.А. Малиновская, Ю.А. Успенская, Е.А. Пожиленкова, А.Б. Салмина

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого,
660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; *эл. почта: elena.hilazheva@mail.ru

В центральной нервной системе млекопитающих имеются специализированные области — нейрогенные ниши, в которых в постнатальном периоде наблюдается нейрогенез. В составе нейрогенных ниш значительная роль в регуляции процессов нейрогенеза отводится астроцитам, в связи с чем они рассматриваются в качестве перспективной “мишени” для возможного управления процессами нейрогенеза, в том числе с применением методов оптогенетики. В рамках данной работы нами была сформирована модель нейрогенной ниши *in vitro*, состоящая из клеток церебрального эндотелия, астроцитов и нейросфер. Астроциты в модели нейрогенной ниши экспрессировали каналородопсин ChR2 и подвергались фотоактивации. Воздействие фотоактивированных астроцитов на экспрессионный профиль клеток нейрогенной ниши оценивали с помощью методов иммуноцитохимического анализа. Было установлено, что интактные астроциты в составе нейрогенной ниши способствуют нейрональной дифференцировке стволовых клеток, а также активация астроглии, экспрессирующей фоточувствительные белки, изменяет экспрессию молекул, характеризующих межклеточные взаимодействия пулов покоящихся и пролиферирующих клеток в составе нейрогенной ниши с участием NAD⁺ (Cx43, CD38, CD157), лактата (MCT1). Зарегистрированные изменения отражают: (а) нарушение паракринных межклеточных взаимодействий двух субпопуляций клеток, одна из которых выступает в качестве источника NAD⁺, а вторая — в качестве потребителя NAD⁺ для обеспечения процессов внутриклеточной сигнальной трансдукции; (б) изменение механизмов транспорта лактата за счёт абберрантной экспрессии лактатного транспортера MCT1 в клетках, образующих пул клеток, развивающихся по нейрональному пути дифференцировки. В целом, при фотостимуляции нишевых астроцитов суммарная пролиферативная активность возрастает преимущественно за счёт нейрональных прогениторных клеток, но не нейрональных стволовых клеток. Таким образом, оптогенетическая активация астроцитов может стать перспективным инструментом управления активностью процессов нейрогенеза и формирования локального пронеурогенного микроокружения в модели нейрогенной ниши *in vitro*.

Ключевые слова: нейрогенез; оптогенетика; астроциты; нейрогенная ниша; нейрональные стволовые клетки

DOI: 10.18097/PBMC20216701034

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно, что в головном мозге млекопитающих имеются уникальные структуры — нейрогенные ниши — в которых в постнатальном периоде происходит активный нейрогенез. Эти регионы головного мозга представлены латеральными стенками боковых желудочков (субвентрикулярная зона) и зернистым слоем зубчатой извилины гиппокампа (субгранулярная зона). К основным клеточным компонентам нейрогенной ниши головного мозга относятся эндотелиальные клетки, астроциты, эпендимоциты, микроглия, зрелые и незрелые нейроны [1, 2].

Известно, что в нейрогенных нишах головного мозга формируется локальное микроокружение, способствующее пролиферации и дифференцировке нейрональных стволовых и прогениторных клеток (НСК и НПК) в ответ на действие стимулов. Однако

молекулярный механизм, лежащий в основе активации нейрогенеза в нейрогенных нишах, до конца не изучен. Изучение экспрессионного профиля клеточных пулов в составе нейрогенных ниш (в том числе с использованием гиппокампальных нейросфер, культивируемых совместно с так называемыми нишевыми астроцитами и церебральными эндотелиоцитами) позволяет оценивать влияние различных факторов на формирование микроокружения и нейрогенез. В частности, особенности экспрессии GFAP и Nestin, а также маркера пролиферации, например, PCNA, дают много информации об изменениях в субпопуляционном составе клеток нейрогенной ниши (табл. 1).

Предполагается, что астроцитам в пределах нейрогенных ниш принадлежит важная роль в контроле состояния пула стволовых клеток и клеток на разных стадиях дифференцировки. В частности, было показано, что периваскулярные

Принятые сокращения: AVV — аденовирусный вектор; ChR2 — каналородопсин 2 типа; GFAP — глиальный кислый фибриллярный белок; GPR81 — рецептор лактата; MCT1 — монокарбоксилатный транспортер 1; Nestin — маркер стволовых клеток; PCNA — маркер пролиферирующих клеток; ГЭБ — гематоэнцефалический барьер; НКП — нейрональные клетки-предшественники; НСК — нейрональные стволовые клетки; Cx43 — коннексин 43; ЦПЭ — цитопатический эффект.

Таблица 1. Экспрессионный профиль клеток в модели нейрогенной ниши

Клетки	Экспрессионный профиль				
	GFAP	Nestin	PCNA	Pax6	NeuroD1
НСК (покоящаяся радиальная глия)	+	+	-	+	-
НСК (тип 1, медленно пролиферирующие клетки)	+/-	+	+	+	-
НПК (тип 2 амплифицирующиеся прогениторные клетки)	-	+	+	+	+
Астроглия	+	-	-	-	-

астроциты регулируют структурно-функциональную целостность ГЭБ в участках нейрогенной активности, а также процессы ангиогенеза в норме и при нейродегенерации [3, 4]. Также известно, что радиальная астроглия оказывает регулирующее влияние на различные этапы нейрогенеза. При этом радиальная астроглия берёт своё начало от тех же популяций прогениторных клеток, что и нейроны. Кроме того, GFAP⁺-клетки радиальной глии экспрессируют глутамат-аспартатный транспортер GLAST, что указывает на роль этих клеток в регуляции метаболических событий на ранних этапах развития клеток центральной нервной системы. Наряду с этим они экспрессируют также Sx43, нестин и виментин, причём мультипотентные GFAP/Nestin/Pax6/Glast⁺ стволовые клетки радиальной глии являются источником мультипотентных и делящихся Pax6/Mash1⁺ предшественников. Кроме того, показано, что наличие радиальной глии необходимо для направленной миграции клеток в процессе нейрогенеза. Таким образом, можно сделать вывод, что часть клеток, которые имеют фенотип радиальной глии, наиболее активной на этапах эмбрионального нейрогенеза, сохраняется в нейрогенных нишах в зрелом головном мозге и не дифференцируется в астроциты, обеспечивая репаративный нейрогенез в постнатальный период жизни [5].

Исходя из рассмотренного выше, астроциты, входящие в состав нейрогенных ниш, могут служить в качестве перспективной “мишени” для возможного управления процессом нейрогенеза. В настоящее время активно разрабатывается возможность управления нейрогенезом не только путём модуляции активности астроцитов с помощью фармакологических препаратов, но и путём использования методов оптогенетики. Оптогенетические протоколы используются для решения многих задач нейробиологии, так как позволяют произвести активацию и управление функциональной активностью определённого типа клеток [6]. В частности, этого можно добиться путём экспрессии в клетках каналородопсина ChR2, фотоактивация которого инициирует сигнальные механизмы, связанные с трансмембранным током ионов, высвобождением сигнальных молекул во внеклеточное пространство. В астроцитах это приводит к увеличению концентрации кальция в цитозоле и секреции АТР, реализующего паракринные эффекты через активацию пуринергических рецепторов [7, 8].

Целью данной работы было изучение особенностей астроцит-опосредованных механизмов регуляции экспрессионного профиля клеток нейрогенной ниши гиппокампа *in vitro* при оптогенетическом воздействии.

МЕТОДИКА

Выделение и культивирование нейросфер

Для выделения нейросфер использовали головной мозг мышей линии C56Bl/6 в возрасте 10-14 суток. Животных декапитировали, извлекали головной мозг и помещали в ледяной раствор 2% глюкозы в PBS. Выделяли гиппокамп и иссекали до размеров 1 мм³. После окончания диссекции выделенную ткань переносили в коническую центрифужную пробирку 14 мл в свежий раствор 2% глюкозы в PBS (“ПанЭко”, Россия). После осаждения кусочков ткани супернатант удаляли. Оставшуюся ткань ресуспензировали в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (“StemCell”, США). Тритурацию ткани (25-30 раз) проводили стерильным пластиковым наконечником до получения однородной суспензии клеток. К полученной суспензии добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation, перемешивали и оставляли на 2 мин для осаждения крупных кусочков ткани. Через 2 мин после осаждения под силой тяжести неразделенных кусочков ткани собирали супернатант и переносили его в новую стерильную 14 мл пробирку. Собранный супернатант центрифугировали при 150 g в течение 5 мин, после чего удаляли супернатант и добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation с последующей тритурацией.

Подсчёт количества клеток осуществляли с помощью цитометра Scepter Cell Counter (“Millipore”, США). Полученные клетки в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток/мл засеивали в культуральные флаконы T-75 см² с 40 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation. Инкубацию осуществляли в условиях инкубатора при 5% CO₂ и 37°C. Через 24-48 ч наблюдали образование нейросфер.

Получение и культивирование нишевых астроцитов

Получение культуры астроцитов проводили путём направленной дифференцировки нейросфер в среде Astrocyte Medium (“ScienCell”, США). Среда Astrocyte Medium состояла из базальной среды (Basal Medium, “ScienCell”), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, “ScienCell”), AGS (“ScienCell”), раствора пенициллина-стрептомицина (“ScienCell”) в конечной концентрации 50 ЕД/мл [9]. Через 7-9 дней наблюдали образование монослоя астроцитов.

Выделение церебральных эндотелиоцитов

Выделение церебральных эндотелиоцитов проводили по модифицированному протоколу Liu и соавт., 2013 [10]. Выделяли кору головного мозга, удаляли мозговые оболочки и крупные сосуды в холодном растворе Хенкса (“ПанЭко”).

Кору измельчали скальпелем, после чего помещали в 14 мл пробирку, содержащую раствор Хенкса, и центрифугировали в течение 3 мин при 150 g. К осадку добавляли в двукратном объёме 25% FBS ("HyClone", США), тритурировали 25 раз 5 мл пипеткой с последующим центрифугированием гомогената в течение 10 мин при 600 g при комнатной температуре и забором самого нижнего слоя осадка в новую пробирку. Данные манипуляции повторяли трижды, после чего осадок обрабатывали 0,1% раствором коллагеназы II ("ПанЭко") в течение 35 мин при 37°C с периодическим перемешиванием. Далее осадок ресуспендировали, центрифугировали при 150 g в течение 5 мин. Полученные клетки засевали во флаконы T-75 см², предварительно покрытые желатином ("Biological Industries", США), и культивировали в условиях инкубатора при 37°C, 5% CO₂. Ростовая среда состояла из DMEM ("ПанЭко"), 20% FBS ("HyClone"), 3 мг/мл глюкозы ("Sigma-Aldrich", США), 0,58 мг/мл глутамина ("Sigma-Aldrich"), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина ("ПанЭко"). Смену среды осуществляли каждые 3 дня.

Аmplификация векторов и трансфекция нишевых астроцитов

Для достижения высокого уровня экспрессии белка ChR2 в астроцитах был использован аденовирусный вектор (AVV) с сильным промотором GFAP, который любезно предоставил профессор С. Каспаров (Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Университет Бристоля, Великобритания). Для амплификации GFAP-ChR2-mKate аденовируса (AVV) использовали клеточную линию HEK 293 (Adeno-X 293 Cell Line, "Clontech", США). HEK 293 клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 2-3 дней до окончания развития цитопатического эффекта (ЦПЭ). После этого клетки собирали пипетированием и подвергали ультразвуковой обработке для их разрушения при 45% мощности, в течение 1 мин с последующим быстрым охлаждением на льду (Ultrasonic Processor CPX500, "Cole-Parmer Instruments", США). Дебрис осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин. Очистку AVV производили с помощью ультрацентрифугирования при 55000 об/мин в градиенте CsCl в течение 17 ч (центрифуга Optima X, "Beckmann Coulter", США). AVV раскапывали по 2 мкл и хранили при -80°C.

После посадки астроцитов в чашку Петри, они были инфицированы GFAP-ChR2-mKate (концентрация AVV $3,4 \times 10^7$ U/мл). Инфицированные астроциты анализировали ежедневно на наличие mKate флуоресценции, которая обычно начиналась через 24 ч после заражения. Для достижения более выраженного эффекта мы использовали культуры астроцитов спустя 4 дня после заражения.

Фотоактивация нишевых астроцитов, экспрессирующих GFAP-ChR2-mKate

Клетки, экспрессирующие GFAP-ChR2-mKate, обнаруживали по аутофлуоресценции белка mKate.

Активация оптогенетической конструкции достигалась при подаче средней интенсивности голубого света от светодиода (480 нм). Стимуляцию проводили короткими импульсами (20 мс) с последующим перерывом (20 мс) в течение 60 с. Активацию астроцитов производили через 4 дня после заражения.

Формирование нейрогенной ниши

Модель нейрогенной ниши (НН) формировали в 24-луночных культуральных планшетах со вставками ("Corning-Costar", США): на дно лунки засеивались клетки церебрального эндотелия (2×10^5 клеток), на вставку — клетки астроглии (1×10^5), в объём лунки — нейросферы (5×10^4).

Иммуноцитохимическая регистрация экспрессии целевых молекул

Для регистрации целевых молекул-маркеров использовали метод двойного или тройного непрямого иммуноцитохимического окрашивания согласно протоколу фирмы-изготовителя антител с применением слепого метода: экспериментатор не владел информацией об экспериментальных группах во время окрашивания и подсчёта клеток. Были использованы первичные антитела к PCNA (ab29, "Abcam", Великобритания), GFAP (sc-58766, "Santa Cruz Biotechnology", США), Nestin (ab22035, "Abcam"); GPR81 (orb183872, "Biorbyt", Великобритания), MCT1 (ab5790, "Abcam"), CD38 (sc-15362, "Santa Cruz Biotechnology"), CD157 (ab71301, "Abcam"), Cx43 (ab29, "Abcam").

Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1:300. Время инкубации с первичными антителами составляло 18 ч при 4°C. Вторичные антитела, меченые Alexa 488 (ab150113, "Abcam"), Alexa 555 (ab150078, "Abcam"), Alexa 647 (ab150171, "Abcam"), Alexa 647 (ab150155, "Abcam"), использовали в разведении 1:500, время инкубации составляло 2 ч при 37°C.

Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE ("Bio-Rad", США), выполняя подсчёт относительного количества клеток, экспрессирующих каждый вид антигена, а также процент клеток, коэкспрессирующих одновременно целевую метку и GFAP, а также целевую метку и Nestin. При обработке результатов учитывали относительное количество клеток, несущих интересующую метку, выраженное в процентах от общего количества клеток.

Определение уровня лактата и NAD⁺ в культуральной среде

Определение лактата (набор L-Lactate Assay Kit, ab65330, "Abcam") и NAD⁺ (концентрация окисленного NAD⁺ и соотношения NAD⁺/NADH, набор NAD/NADH Quantitation Kit, MAK037, "Sigma-Aldrich", США) в среде культивирования нейросфер в составе нейрогенной ниши с фотостимуляцией астроцитов и без проводили по стандартным протоколам фирм-изготовителей. Определение концентрации проводили с применением

слепого метода: экспериментатор не владел информацией об экспериментальных группах во время измерений и подсчёта данных. Оптическую плотность в планшете определяли при длинах волн 492 нм (лактат) и 450 нм (NAD^+/NADH). Полученные результаты выражали в нмоль/лунка (для лактата) и пмоль/лунка (для NAD^+/NADH) по данным калибровочных кривых, построенных по протоколам фирм-изготовителей.

Использованные животные

Для проведения исследования было использовано 10 мышей линии C56Bl/6 в возрасте 10-14 суток. Умерщвление животных проводили путём дислокации шейных позвонков с последующей декапитацией. Анестетики не использовали, поскольку они потенциально могут вызвать изменение активности клеток головного мозга [11].

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов непараметрической статистики (критерий Манна-Уитни) для выборок после проверки на нормальность распределения с использованием критерия асимметрии и эксцесса. Размер выборки не рассчитывали. Тест на выбросы не проводили, точки данных не исключали. Результаты представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее значение, SD — стандартное отклонение. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Все расчёты проводили в программе Statistica 10. Анализ изображений проводили с применением пакета программного обеспечения ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В используемой нами модели нейрогенной ниши *in vitro* совместно культивировались несколько видов клеток: 1) астроциты, в том числе экспрессирующие ChR2 и являющиеся мишенью для оптогенетической регуляции; 2) церебральные эндотелициты, формирующие так называемый “фидерный” (питательный) слой для развивающихся НСК и НПК; 3) гиппокампальные нейросферы, представленные

разными видами клеток: покоящиеся и медленно пролиферирующие НСК, амплифицирующиеся НПК, астроциты, дифференцирующиеся из НСК (рис. 1).

После фотостимуляции астроцитов в составе нейрогенной ниши *in vitro* через 24 ч после воздействия зарегистрированы значимое уменьшение числа GFAP-позитивных клеток в группе с фотоактивацией и тенденция к увеличению относительного количества Nestin-позитивных клеток (рис. 2).

Так как в нейрогенной нише GFAP экспрессируют астроциты и/или клетки радиальной глии, которые находятся в состоянии покоя или медленно пролиферируют, а Nestin-иммунопозитивными клетками являются НПК и радиальная глия, то можно констатировать, что следствием действия активированных нишевых астроцитов является уменьшение пула GFAP-иммунопозитивных клеток.

Известно, что и стволовые, и прогениторные нейрональные клетки экспрессируют белки-коннексины, в частности, Cx43. Мы обнаружили, что при фотоактивации нишевых астроцитов наблюдалось значимое снижение Cx43-иммунопозитивных медленно пролиферирующих и амплифицирующихся клеток пула [НСК+НПК] (табл. 2), но сохранялось практически неизменным относительное количество Cx43-экспрессирующих GFAP-иммунопозитивных медленно пролиферирующих или покоящихся клеток пула [НСК+астроглия] к 24 ч совместного культивирования (табл. 2).

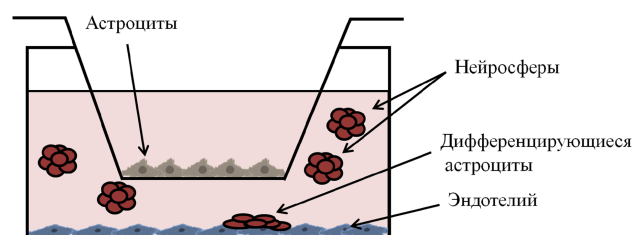


Рисунок 1. Модель нейрогенной ниши *in vitro*. На рисунке представлена лунка 24х-луночного культурального планшета с культуральной вставкой, имеющей полупроницаемую мембрану. Расположение клеток указано на рисунке. Собранную модель культивировали в стандартных условиях CO_2 -инкубатора при 37°C .

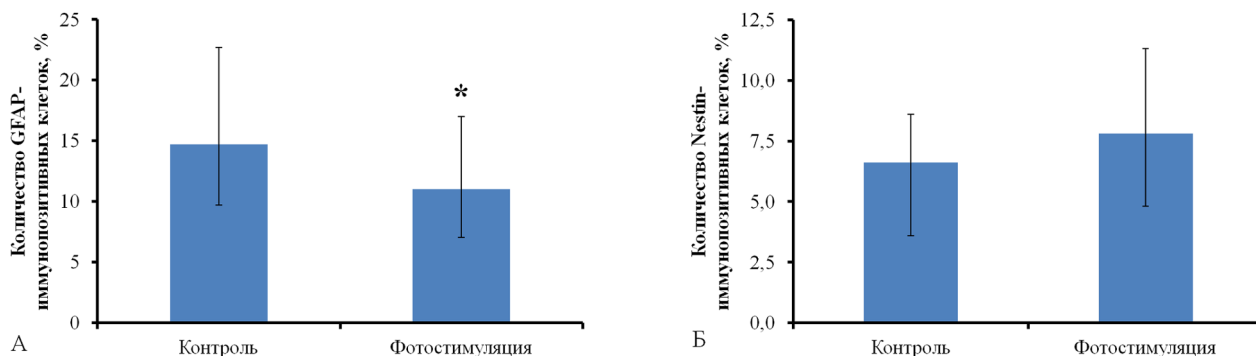


Рисунок 2. Изменение экспрессии GFAP и Nestin при культивировании нейросфер в модели нейрогенной ниши без воздействия фотостимуляции нишевых астроцитов и с фотостимуляцией (А — НСК+астроглия, Б — НСК+НПК). * — статистически значимые отличия, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни ($n=30$, n — число полей зрения). Данные представлены в виде $M \pm \min/\max$, где M — среднее, \min — минимальное наблюдаемое значение, \max — максимальное наблюдаемое значение.

СТИМУЛЯЦИЯ НЕЙРОГЕНЕЗА В МОДЕЛИ НЕЙРОГЕННОЙ НИШИ *IN VITRO*

Таблица 2. Изменение экспрессии Сх43, CD38, CD157 при культивировании нейросфер в модели нейрогенной ниши без воздействия фотостимуляции астроцитов и с фотостимуляцией

Маркер	Процент от общего числа клеток		НСК + астроглия		НСК + НПК	
	Контроль	Фотостимуляция	Контроль	Фотостимуляция	Контроль	Фотостимуляция
Сх43	8,33±2,07	3,41±0,27*	55,00±0,96	54,27±3,70	74,83±3,38	52,42±1,89*
CD38	5,78±0,86	2,66±0,27*	62,93±2,85	42,29±3,73*	56,42±6,30	47,94±3,21
CD157	3,79±0,41	2,06±0,25*	46,41±5,12	28,83±4,48*	57,91±3,82	44,44±5,03*

Примечание: * — статистически значимые отличия, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни ($n=25$, n — число полей зрения).

Таблица 3. Изменение концентрации NAD^+ (пмоль/в лунке) и лактата (нмоль/в лунке) при культивировании нейросфер в модели нейрогенной ниши без воздействия фотостимуляции астроцитов и с фотостимуляцией

	Контроль	Фотостимуляция
Концентрация NAD^+	2,48±0,69	2,74±0,61
$NAD^+/NADH$	0,52±0,19	0,60±0,16
Концентрация лактата	6,74±0,51	7,51±0,42*

Примечание: * — статистически значимые отличия, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни ($n=20$, n — число полей зрения).

Сх43, в силу особенностей своей функциональной активности, выступает в качестве регулятора биодоступности NAD^+ для NAD^+ метаболизирующих эктоферментов (экспрессирующихся на мембране клеток), в частности, CD38 и CD157, которые обладают NAD^+ -гликогидролазной активностью и превращают NAD^+ в соединения с внутриклеточной кальций-мобилизующей активностью [12]. Логично предположить, что подавление экспрессии Сх43 на клетках может иметь своим результатом изменение экспрессии CD38 и/или CD157.

Действительно, мы обнаружили, что в результате фотостимуляции астроцитов в нейрогенной нише *in vitro* достоверно снижается экспрессия CD38, CD157 к 24 ч совместного культивирования (табл. 2), но это было характерно для GFAP-иммунопозитивных клеток.

Вместе с тем, нами не было зарегистрировано значимых изменений уровня NAD^+ в среде культивирования нейросфер (табл. 3).

Другим метаболитом, высвобождение которого во внеклеточное пространство может обеспечиваться активностью Сх43, является лактат. Так как экспрессия Сх43 при фотоактивации нишевых астроцитов снижалась в Nestin-иммунопозитивных клетках, мы предположили, что подавление высвобождения лактата во внеклеточную среду может привести к изменению экспрессии рецепторов лактата (GPR81) на клетках ниши. Однако значимых изменений в экспрессии GPR81 мы не зарегистрировали (рис. 3).

Культивирование нейросфер в присутствии фотоактивированных астроцитов приводит к увеличению концентрации лактата в среде к 24 ч культивирования (табл. 3), следовательно, другие (не Сх43-опосредованные) механизмы транспорта лактата доминируют в нашей модели.

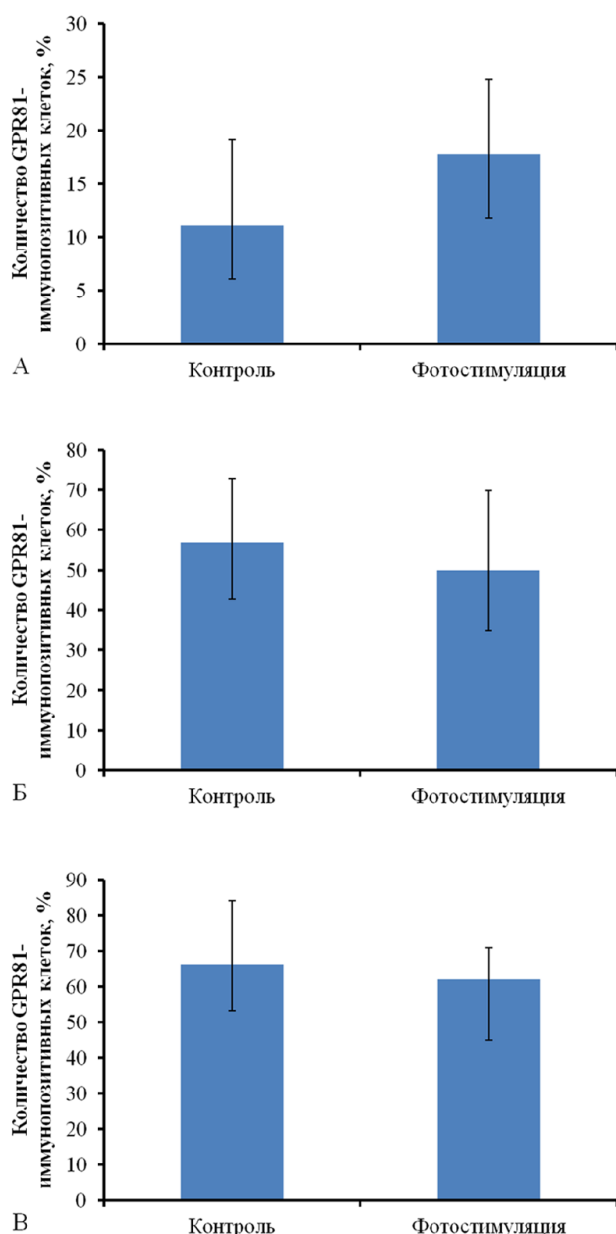


Рисунок 3. Изменение экспрессии GPR81 при культивировании нейросфер в модели нейрогенной ниши без воздействия фотостимуляции астроцитов и с фотостимуляцией (А — процент от общего числа клеток, Б — НСК+астроглия, В — НСК+НПК). $n=15$, n — число полей зрения. Данные представлены в виде $M \pm \min/\max$, где M — среднее, \min — минимальное наблюдаемое значение, \max — максимальное наблюдаемое значение.

Таблица 4. Соотношение типов клеток при культивировании нейросфер в модели нейрогенной ниши без воздействия фотостимуляции астроцитов и с фотостимуляцией

	Относительное количество покоящихся NSCs (GFAP+Nestin+PCNA-), %	Относительное количество активированных NSCs/NPCs (GFAP+(-)+Nestin+PCNA++), %
Контроль	12,7±4,6	4,3±0,9
Фотостимуляция	31,7±4,0*	14,9±5,6*

Примечание: * — отличие от группы контроля, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни ($n=25$, n — число полей зрения).

Монокарбоксилатные транспортеры MCT1 обеспечивают трансмембранный перенос молекул молочной кислоты во многих типах клеток нейроваскулярной единицы головного мозга [13]. Мы оценили, насколько может быть значим вклад этих транспортеров в реализацию биологического эффекта активированных нишевых астроцитов. Нами обнаружено, что в GFAP-иммунопозитивных клетках экспрессия MCT1 не изменялась, однако Nestin-иммунопозитивные клетки характеризовались существенно сниженной экспрессией MCT1 после фотоактивации нишевой астроглии (рис. 4).

При оценке соотношения так называемых покоящихся и активированных НСК и НПК в составе нейрогенной ниши как в контроле, так и после фотостимуляции нишевых астроцитов мы обнаружили достоверно значимое увеличение количества обеих категорий клеток (табл. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В работе мы использовали оригинальную модель нейрогенной ниши *in vitro*, которая состоит из клеток церебрального эндотелия, так называемых зрелых нишевых астроцитов и клеток гиппокампальных нейросфер. Несмотря на то, что в модели нейрогенной ниши *in vitro* не воспроизводится в полной мере локальное микроокружение, соответствующее нейрогенной нише *in vivo*, данная модель позволила оценить эффекты избирательной активации нишевых астроцитов (экспрессирующих фоточувствительный белок ChR2, активируемый в рамках оптогенетического протокола) в отношении клеток, формирующих пулы покоящихся стволовых клеток, медленно пролиферирующих стволовых клеток и амплифицирующихся прогениторных клеток, а также астроцитов, дифференцирующихся из НСК.

Впервые установлено, что адресная активация астроцитов сокращает пул GFAP-иммунопозитивных клеток, характеризующих субпопуляцию покоящихся НСК, медленно пролиферирующих НСК и астроглии, дифференцирующейся из НСК. Вместе с тем, именно этот пул [НСК+астроглия] демонстрирует изменения экспрессии эктоферментов, катализирующих внеклеточное превращение NAD^+ (CD38 и CD157), тогда как клетки пула [НСК+НПК] характеризуются подавлением экспрессии коннексина Cx43.

Известно, что Cx43 необходим для поддержания жизнеспособности и пролиферативной активности незрелых клеток, он обеспечивает межклеточный перенос низкомолекулярных соединений (NAD^+ , АТФ,

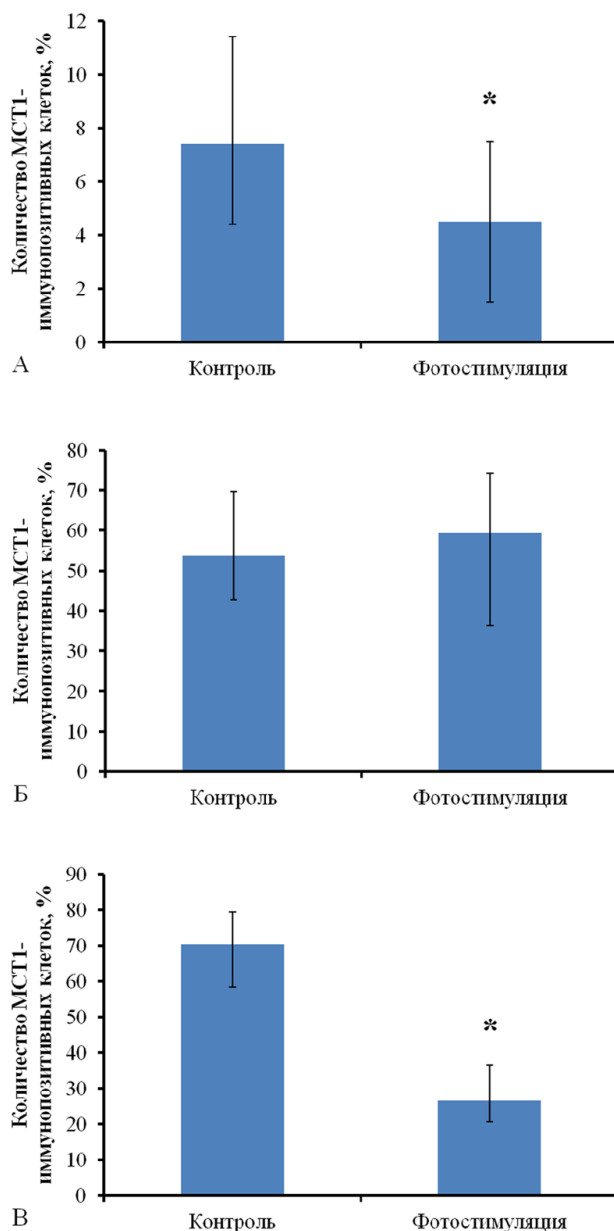


Рисунок 4. Изменение экспрессии MCT1 при культивировании нейросфер в модели нейрогенной ниши без воздействия фотостимуляции астроцитов и с фотостимуляцией (А — процент от общего числа клеток, Б — НСК+астроглия, В — НСК+НПК). * — статистически значимые отличия, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни ($n=15$, n — число полей зрения). Данные представлены в виде $M \pm \min/\max$, где M — среднее, \min — минимальное наблюдаемое значение, \max — максимальное наблюдаемое значение.

лактат) и некоторых ионов, а также, будучи экспрессированным в формате “полуканалов”, важен для экструзии из клеток NAD^+ , лактата, АТФ [14, 15]. Поэтому вероятной причиной того, что активация нишевых астроцитов приводит к снижению экспрессии CD38, CD157 в GFAP-иммунопозитивных клетках, является подавление экспрессии Sx43 в Nestin-иммунопозитивных клетках и снижение уровня NAD^+ во внеклеточном пространстве, что снижает экспрессию и активность NAD^+ -гликогидролаз на GFAP-иммунопозитивных клетках. Таким образом, зарегистрированные изменения, индуцированные фотоактивацией нишевых астроцитов, с большой долей вероятности отражают нарушение паракринных межклеточных взаимодействий двух субпопуляций клеток, одна из которых выступает в качестве источника NAD^+ , а вторая — в качестве потребителя NAD^+ для обеспечения процессов внутриклеточной сигнальной трансдукции. Отсутствие значимых изменений суммарной концентрации NAD^+ в среде культивирования нейросфер свидетельствует о том, что описанные межклеточные события носят сугубо локальный характер и, вероятно, сопровождаются изменениями уровня NAD^+ в непосредственной близости от плазматической мембраны контактирующих клеток, но не дистантно в модели ниши *in vitro*.

Известно, что лактат — это один из глиотрансмиттеров, продукт метаболизма активированных астроцитов, важный локальный регулятор развития клеток нейрогенных ниш и церебральной микроциркуляции [13]. Мы обнаружили, что изменение экспрессии Sx43 не сказывается на представленности рецепторов лактата GPR81 в стволовых и прогениторных клетках нейрогенной ниши *in vitro*, тогда как механизмы транспорта лактата в пределах клеток нейрогенной ниши оказались изменёнными: результатом активации нишевых астроцитов явилось снижение экспрессии лактатного транспортера MCT1 в клетках, образующих пул НСК и НПК.

MCT1 транспортеры могут функционировать в обоих направлениях (транспорт лактата внутрь и наружу клетки) в зависимости от метаболического статуса и соотношения NADH/NAD^+ [13]. С учётом того, что в модели нейрогенной ниши *in vitro* мы регистрируем увеличение уровня лактата на фоне подавления суммарной экспрессии MCT1 преимущественно на Nestin-иммунопозитивных клетках, логично предположить, что MCT1 транспортеры изначально ориентированы на транспорт лактата внутрь клеток, а когда активация нишевых астроцитов приводит к снижению экспрессии MCT1 в клетках пула НСК+НПК, концентрация лактата в среде культивирования возрастает. Это, в определённом смысле, напоминает реверсивный эффект Варбурга: влияние нишевых астроцитов на пул НСК+НПК может иметь своим результатом увеличение доступности лактата для активно пролиферирующих клеток в нейрогенной нише.

Действительно, зарегистрированный нами факт увеличения относительного представительства так называемых покоящихся и активно пролиферирующих пулов [НСК+радиальная глия] и [НСК+НПК], соответственно, подтверждает наше предположение. Необходимо отметить, что увеличение количества покоящихся НСК может быть интерпретировано как подавление процесса их рекрутинга, что, казалось бы, свидетельствует о торможении процесса нейрогенеза. Но, с другой стороны, увеличение количества пролиферирующих НСК+НПК позволяет сделать вывод о том, что при фотостимуляции нишевых астроцитов суммарная пролиферативная активность возрастает преимущественно за счёт НПК, но не НСК.

В целом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что оптогенетическая активация астроцитов является новым инструментом управления активностью процессов нейрогенеза и формирования локального пронеурогенного микроокружения в модели нейрогенной ниши *in vitro*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России (2018-2020 гг.) “Новые технологии управления нейрогенезом и ангиогенезом в головном мозге”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных проведены в соответствии с общепринятыми этическими международными нормами с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС), и требованиями приказа Минздрава России № 267 от 19.06.2003 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”. Исследование было одобрено на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол №4 от 16 мая 2016 года).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Butti E., Cusimano M., Bacigaluppi M., Martino G. (2014) Front. Neurosci., **8**, 1-11.
- Zhao C., Deng W., Gage F.H. (2008) Cell, **132**(4), 645-660.
- Osipova E.D., Semyachkina-Glushkovskaya O.V., Morgun A.V., Pisareva N.V., Malinovskaya N.A., Boytsova E.B., Pozhilenkova E.A., Belova O.A., Salmin V.V., Taranushenko T.E., Noda M., Salmina A.B. (2018) Rev. Neurosci., **29**(5), 567-591.

4. Yamazaki Y, Kanekiyo T. (2017) *Int. J. Mol. Sci.*, **9**(18), 1965. DOI: 10.3390/ijms18091965.
5. Gubert F, Zaverucha-do-Valle C., Pimentel-Coelho P.M., Mendez-Otero R., Santiago M.F. (2009) *Brain Res.*, **1258**, 43-52.
6. Cho W.-H., Barcelon E., Lee S.J. (2016) *Exp. Neurobiol.*, **5**(25), 197. DOI: 10.5607/en.2016.25.5.197.
7. Gourine A.V., Kasymov V., Marina N., Tang F., Figueiredo M.F., Lane S., Teschemacher A.G., Spyer K.M., Deisseroth K., Kasparov S. (2010) *Science*, **329**(5991), 571-575.
8. Figueiredo M.F., Lane S., Stout R.F., Liu B., Parpura V., Teschemacher A.G., Kasparov S. (2014) *Cell Calcium*, **56**(3), 208-214.
9. Khilazheva E.D., Boytsova E.B., Pozhilenkova E.A., Solonchuk Yu.R., Salmina A.B. (2015) *Cell Tiss. Biol.*, **9**, 447-451.
10. Liu Y., Xue Q., Tang Q., Hou M., Qi H., Chen G., Chen W., Zhang J., Chen Y., Xu X. (2013) *Microvasc. Res.*, **90**, 199-205.
11. Bai X., Bosnjak Z.J. (2013) *Int. J. Clin. Anesthesiol.*, **1**, 1002. PMID: 24971394.
12. Салмина А.Б., Инжутова А.И., Моргун А.В., Окунева О.С., Малиновская Н.А., Лопатина О.Л., Петрова М.М., Таранушенко Т.Е., Фурсов А.А., Кувачева Н.В. (2012) *Вестник Российской академии медицинских наук*, **10**, 29-37. [Salmina A.B., Inzhutova A.I., Morgun A.V., Okuneva O.S., Malinovskaya N.A., Lopatina O.L., Petrova M.M., Taranushenko T.E., Fursov A.A., Kuvacheva N.V. (2012) *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*, **10**, 29-37].
13. Salmina A.B., Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Komleva Y.K., Pozhilenkova E.A., Lopatina O.L., Gorina Y.V., Taranushenko T.E., Petrova L.L. (2015) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **64**, 174-184.
14. Salmina A.B., Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Lopatina O.L., Komleva Y.K., Malinovskaya N.A., Pozhilenkova E.A. (2014) *Rev. Neurosci.*, **25**(1), 97-111.
15. Моргун А.В., Кувачева Н.В., Хилажева Е.Д., Салмина А.Б. (2014) *Сибирское медицинское обозрение*, **90**(6), 1-5. [Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Khilazheva E.D., Salmina A.B. (2014) *Sibirskoe Medicinskoe Obozrenie*, **90**(6), 1-5.]

Поступила в редакцию: 07. 08. 2020.
 После доработки: 13. 11. 2020.
 Принята к печати: 16. 11. 2020.

FEATURES OF THE *IN VITRO* EXPRESSION PROFILE OF HIPPOCAMPAL NEUROGENIC NICHE CELLS DURING OPTOGENETIC STIMULATION

E.D. Khilazheva*, A.V. Morgun, E.B. Boytsova, A.I. Mosiagina, A.N. Shuvaev, N.A. Malinovskaya, Yu.A. Uspenskaya, E.A. Pozhilenkova, A.B. Salmina

Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University,
 1 P. Zheleznyka str., Krasnoyarsk, 660022 Russia; * e-mail: elena.hilazheva@mail.ru

In the central nervous system of mammals, there are specialized areas in which neurogenesis — neurogenic niches — is observed in the postnatal period. It is believed that astrocytes in the composition of neurogenic niches play a significant role in the regulation of neurogenesis, and therefore they are considered as a promising “target” for the possible control of neurogenesis, including the use of optogenetics. In the framework of this work, we formed an *in vitro* model of a neurogenic niche, consisting of cerebral endothelial cells, astrocytes and neurospheres. Astrocytes in the neurogenic niche model expressed canalorodopsin ChR2 and underwent photoactivation. The effect of photoactivated astrocytes on the expression profile of neurogenic niche cells was evaluated using immunocytochemical analysis methods. It was found that intact astrocytes in the composition of the neurogenic niche contribute to neuronal differentiation of stem cells, as well as the activation of astroglia expressing photosensitive proteins, changes the expression of molecules characterized by intercellular interactions of pools of resting and proliferating cells in the composition of the neurogenic niche with the participation of NAD⁺ (Cx43, CD38, CD157), lactate (MCT1). In particular, the registered changes reflect a violation of the paracrine intercellular interactions of two subpopulations of cells, one of which acts as a source of NAD⁺, and the second as a consumer of NAD⁺ to ensure the processes of intracellular signal transduction; a change in the mechanisms of lactate transport due to aberrant expression of the lactate transporter MCT1 in cells forming a pool of cells developing along the neuronal path of differentiation. In general, with photostimulation of niche astrocytes, the total proliferative activity increases mainly due to neural progenitor cells, but not neural stem cells. Thus, optogenetic activation of astrocytes can become a promising tool for controlling the activity of neurogenesis processes and the formation of a local proneurogenic microenvironment in an *in vitro* model of a neurogenic niche.

Key words: neurogenesis; optogenetics; astrocytes; neurogenic niche; neural stem cells

Funding. The study was performed within the State Assignment for Research, Ministry of Public Health of Russian Federation (2018-2020) “New technologies for the management of neurogenesis and angiogenesis in the brain”.

Received: 07.08.2020, revised: 13.11.2020, accepted: 16.11.2020.