

©Коллектив авторов

АСТРОЦИТ-ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОГЕНЕЗА В МОДЕЛИ НЕЙРОГЕННОЙ НИШИ *IN VITRO* ПРИ ДЕЙСТВИИ $A\beta_{1-42}$

А.В. Морзун, Е.Д. Осипова*, Е.Б. Бойцова, А.Н. Шубаев,
Ю.К. Комлева, Л.В. Труфанова, Е.Ф. Вайс, А.Б. Салмина

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

Нейрогенез – сложный процесс, который определяет развитие головного мозга в эмбриональном периоде; он важен для процессов нейропластичности на протяжении всей жизни организма. Постнатальный нейрогенез происходит в нейрогенных нишах, которые обеспечивают регуляцию процессов пролиферации и дифференцировки стволовых и прогениторных клеток при действии стимулов, запускающих механизмы пластичности головного мозга. Клетки глиальной и эндотелиальной природы в нейрогенных нишах являются ключевыми регуляторами механизмов нейрогенеза. Известно, что в физиологических условиях нейрогенез важен для процессов запоминания, а репаративный нейрогенез обеспечивает, как правило, частичное восстановление поврежденных структур мозга и компенсацию неврологических дефицитов, обусловленных таким повреждением. Дизрегуляция нейрогенеза характерна для многих нарушений развития головного мозга и нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера, являющейся актуальной медико-социальной проблемой. В модели нейрогенной ниши *in vitro* с использованием гиппокампальных нейросфер нами показаны эффекты активации астроцитов на экспрессию маркеров разных стадий пролиферации и дифференцировки клеток-участников нейрогенеза. Установлено, что аберранные механизмы развития стволовых и прогениторных клеток, вызванные действием бета-амилоидного пептида ($A\beta_{1-42}$), могут быть частично восстановлены при адресной активации GFAP-экспрессирующих клеток нейрогенной ниши.

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

DOI: 10.18097/PBMC20196505366

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной формой деменции и представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, в патогенезе которого важную роль играют растворимые олигомеры бета-амилоидного пептида ($A\beta$); изменения в головном мозге, индуцированные токсичным действием $A\beta$, затрагивают в первую очередь гиппокамп, приводя к прогрессирующему снижению когнитивных функций [1]. Зубчатая извилина гиппокампа представляет собой пластичную структуру, в которой происходит нейрогенез в эмбриональном и постнатальном периодах. Поэтому неудивительно, что одним из ключевых проявлений токсичности $A\beta$ является нарушение нейрогенеза [2, 3].

Формирование микроокружения, способствующего эффективному нейрогенезу в пределах субгранулярной зоны гиппокампа (SGZ), определяется большим спектром механизмов, в числе которых активность клеток нейрональной, астроглиальной, микроглиальной и эндотелиальной природы [4]. В частности, клетки эндотелия церебральных микрососудов, которые тесно контактируют с нейрональными стволовыми клетками (NSCs) и нейрональными прогениторными клетками (NPCs), обеспечивают селективную проницаемость гематоэнцефалического барьера для молекул, участвующих в регуляции нейрогенного потенциала клеток нейрогенных ниш [5-7]. Клетки астроглии являются продуцентами различных нейромедиаторов,

нейротрофических факторов и метаболитов, оказывающих влияние на процессы поддержания пула NSCs/NPCs, индукцию пролиферации, миграции и дифференцировки, причём это справедливо и в отношении экзогенных (трансплантированных в ткань мозга) стволовых клеток [7, 8].

Развитие новых технологий биоинженерии и клеточной биологии позволяет моделировать нейроваскулярную единицу и нейрогенную нишу *in vitro* [9-11], что открывает новые перспективы в исследовании клеточно-молекулярных механизмов нарушения нейрогенного потенциала при развитии нейродегенерации. Описанная нами ранее модель нейрогенной ниши [12] является информативным инструментом оценки эффектов $A\beta$ и иных факторов (например, мультистимульного окружения) в отношении пролиферирующих клеток нейрогенной ниши. В данной модели ключевым компонентом являются гиппокампальные нейросферы, обладающие высоким нейрогенным потенциалом и способностью к дифференцировке в клетки нейрональной и глиальной природы *in vitro* [13]. Вспомогательную роль в модели выполняют клетки эндотелия церебральных микрососудов и астроглии, восполняющие естественное микроокружение для NSCs/NPCs.

Известно, что астроциты, как и другие клетки нейрогенных ниш (эндотелиальные клетки, перициты), усиливают пролиферацию клеток-предшественников и формирование нейросфер. Данные литературы свидетельствуют о том, что выживаемость нейрональных клеток-предшественников можно

улучшить за счёт привнесения в культуру астроглии и клеток эндотелия [14]. Принимая во внимание тот факт, что клетки астроглии контролируют развитие стволовых клеток и клеток-предшественников [15-17], стимулируют формирование нейросфер, но, как считают некоторые авторы, не имеют влияния на дифференцировку нейросфер [14], астроциты нейрогенных ниш являются перспективной мишенью для управления процессами нейрогенеза. Такое управление можно обеспечить не только использованием фармакологических подходов, но и за счёт применения протоколов оптогенетики, широко используемой для решения различных задач нейробиологии. Оптогенетические подходы позволяют обеспечить адресную активацию клеток (нейронов, астроцитов) и изменение их функциональной активности, сопряжённой с определенными биологическими эффектами [18]. С учётом многообразия клеток, входящих в состав нейрогенной ниши, оптогенетические протоколы, подразумевающие специфическую экспрессию фоточувствительного белка в какой-либо популяции клеток, являются перспективными для изучения процессов формирования локального микроокружения, способствующего нейрогенезу, а также влияния факторов, нарушающих процессы пролиферации, дифференцировки и миграции клеток. Это достижимо с использованием экспрессии каналородопсина ChR2 в клетках, фотоактивация которого инициирует сигнальные механизмы, связанные с трансмембранным током ионов, высвобождением сигнальных молекул во внеклеточное пространство, что, в свою очередь, имеет результатом активацию межклеточных взаимодействий, актуальных для развития клеток в нейрогенном микроокружении [19]. Применительно к астроцитам (экспрессия ChR2 в которых обеспечивается за счёт GFAP промотора и визуализируется флуоресцентными белками, например, Katushka или mKate) это означает, например, увеличение концентрации кальция в цитозоле и секрецию АТР, реализующего паракринные эффекты через активацию пуринергических рецепторов [18, 19].

Целью данной работы было изучение астроцит-опосредованных механизмов регуляции развития клеток нейрогенной ниши в модели *in vitro* в физиологических условиях и при действии нейротоксического $A\beta_{1-42}$.

МЕТОДИКА

Моделирование нейрогенной ниши *in vitro*

Эндотелиальные клетки получали из микрососудов головного мозга мышей линии C56Bl/6 в возрасте 10-14 суток. Выделение и получение первичной культуры проводили в соответствии с протоколом Liu и соавт. [20]. Полученные клетки фенотипировали моноклональными антителами к эндотелиальному маркеру (белок ZO1) по стандартному протоколу иммуноцитохимического исследования с использованием первичных анти-ZO1-антител ("Abcam", Великобритания) и вторичных антител, меченных Alexa Fluor 488 ("Abcam"), с последующей

регистрацией на флуоресцентном микроскопе ZOE ("Bio-Rad", США).

Источником нейросфер служили мыши C56Bl/6 в возрасте 10-14 суток. Животных декапитировали, после охлаждения на льду производили забор головного мозга. Мозг помещали в ледяной раствор 2% глюкозы в PBS. Выделяли интересующие регионы (гиппокамп, стенки боковых желудочков) и иссекали их до размеров 1 мм³. После окончания диссекции выделенную ткань переносили в свежий раствор 2% глюкозы в PBS (в конической пробирке 14 мл) на 1 мин для осаждения. После осаждения ткани удаляли супернатант. Оставшуюся ткань ресуспендировали в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation ("StemCell", США). Проводили тритурацию (25-30 раз) ткани стерильным пластиковым наконечником до получения однородной суспензии клеток. К полученной суспензии добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation. Через 2 мин, после осаждения неразделённых фрагментов 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 сеяли в культуральные флаконы T-75 см² с 25 мл "конечной" среды NeuroCult NS-A Proliferation. Инкубацию осуществляли в CO₂-инкубаторе CB 53 ("Binder", Германия) при 5% CO₂ и 37°C. Через 24-48 ч наблюдали образование нейросфер.

Часть выделенных нейросфер была использована для получения монокультуры астроцитов путём направленной дифференцировки клеток нейросфер в дифференцировочной культуральной среде Astrocyte Medium ("ScienCell", США). Среда Astrocyte Medium состояла из Basal Medium, FBS, AGS, P/S solution (все "ScienCell"). Через 7 дней наблюдали формирование монослоя астроцитов, фенотипирование которых осуществляли морфологически и при помощи иммуноокрашивания (экспрессия GFAP, антитела "Abcam").

Модель нейрогенной ниши (НН) воспроизводили в 24-х луночных культуральных планшетах со вставками ("Corning-Costar", США): на дно лунки засевались клетки церебрального эндотелия в количестве 2×10^5 клеток, на вставку – клетки астроглии в количестве 1×10^5 , в объём лунки – нейросферы в количестве 5×10^4 (рис. 1А).

Были сформированы 4 экспериментальные группы:

- 1) контроль – сокультура нейросфер/эндотелиоцитов (НН) с астроцитами (n=7);
- 2) контроль* – сокультура нейросфер/эндотелиоцитов (НН) с астроцитами, которые подверглись фотоактивации (n=7);
- 3) $A\beta_{1-42}$ – сокультура нейросфер (предварительно подвергнутых действию $A\beta$)/эндотелиоцитов (НН) с интактными астроцитами (n=7);

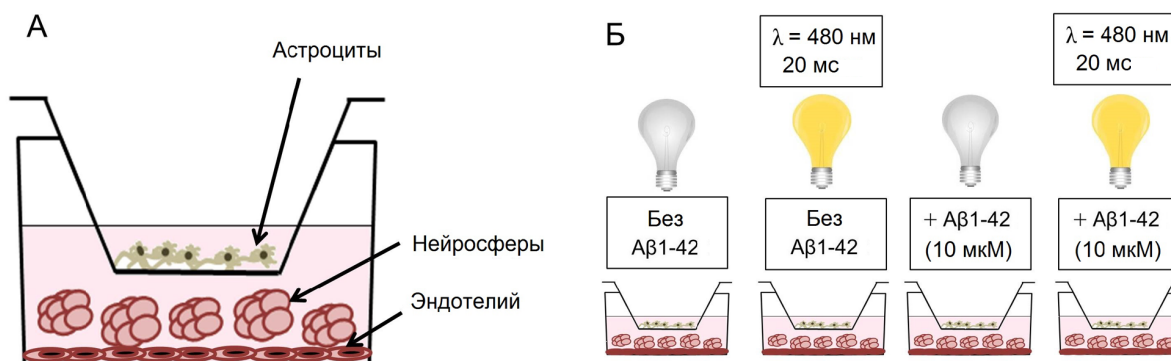


Рисунок 1. Дизайн исследования. А. Схема модели нейрогенной ниши *in vitro*. Б. Экспериментальные группы.

4) $A\beta_{1-42}$ * – сокультура нейросфер (предварительно подвергнутых действию $A\beta$)/эндотелиоцитов (НШ) с фотоактивированными астроцитами ($n=7$).

Предварительно нейросферы из 3 и 4 групп инкубировали в течение суток в присутствии $A\beta_{1-42}$ ("Sigma-Aldrich", США) в конечной концентрации 10 мкМ в питательной среде. Дизайн эксперимента представлен на рисунке 1Б.

Инфицирование и фотоактивация астроцитов, экспрессирующих GFAP-ChR2-mKate

Для активации экспрессии астроглиальными клетками белка ChR2 использовали аденовирусный вектор (AVV) со специфичным для астроцитов усиленным промотором GFAP – sGFAP-ChR2-mKate [19] (предоставлен профессором С. Каспаровым, Великобритания). После посадки астроцитов в чашку Петри, они были инфицированы, концентрация AVV достигала $3,4 \times 10^7$ ед./мл. Далее астроциты анализировали ежедневно на наличие mKate-флуоресценции. Культура астроцитов подвергалась фотоактивации на 4 сутки после инфицирования во временных точках 6 ч, 12 ч и 18 ч (78 ч, 84 ч, 90 ч после инфицирования соответственно). Фотоактивация достигалась путём воздействия светом ($\lambda=480$ нм) от светодиода короткими импульсами (20 мс) с последующим перерывом (20 мс) в течение 1 мин.

С учётом того, что ранние этапы дифференцировки клеток (мультипотентные клетки и радиальная глия) сопровождаются экспрессией гена GFAP, мы использовали экспрессию GFAP-ChR2-mKate в астроцитах, дифференцированных из нейросфер, в рамках отдельного этапа эксперимента.

Иммуноцитохимическая регистрация экспрессии молекул-маркеров нейрогенеза и пролиферации

Регистрацию экспрессии молекул-маркеров проводили методом двойного непрямого иммуноцитохимического окрашивания согласно протоколу фирмы-изготовителя антител. Первичные антитела к белкам Pax6 (ab5790, "Abcam"); NeuroD1 (ab16503, "Abcam"), Nestin (sc-20978, "Santa Cruz Biotechnology", США), PCNA (ab29, "Abcam") использовали в рабочем разведении 1:300. Время инкубации с первичными антителами составляло 18 ч при 4°C. Вторичные антитела,

меченные флуорохромами Alexa 488, использовали в разведении 1:500; время инкубации составляло 2 ч при 37°C. Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE. Выполняли подсчёт относительного количества клеток, экспрессирующих каждый из видов антигена при анализе не менее 5 полей зрения.

Регистрация пролиферативной активности нейросфер

Для оценки нейротоксического влияния амилоида, а также фотоактивированных астроцитов на пролиферативный потенциал нейросфер (стволовых и прогениторных клеток) использовали систему для проведения анализа пролиферативной активности клеток "xCelligence" ("Roche", Швейцария) [21], а также специальные 16-ти луночные планшеты E-plate и вставки к ним (E-plate insert).

Нейросферы помещали в планшеты анализатора ($1,3 \times 10^4$ клеток в каждой лунке). Астроциты вносили в специальные вставки для планшет (1×10^4 клеток в каждой лунке), для исключения их физического контакта с электродами анализатора. Вставки с астроцитами помещали внутрь лунок планшет. Таким образом, непосредственный контакт электродов был только с нейросферами.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов непараметрической статистики (критерий Уилкоксона). Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Анализ изображений проводили с применением пакета программного обеспечения ImageJ (1.47 v).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Адресная активация GFAP-экспрессирующих клеток в модели нейрогенной ниши *in vitro* достигалась использованием протокола, позволяющего стимулировать активность каналородопсина (ChR2) в GFAP-иммунопозитивных (GFAP⁺) клетках (в наших условиях эксперимента – астроцитах). При возбуждении ChR2 в астроцитах возникают увеличение уровня кальция в цитозоле этих клеток и высвобождение во внеклеточное пространство

молекул АТР, что ведёт к возникновению аутокринных и паракринных эффектов [22]. Вполне вероятно, что в этих ситуациях происходит секреция и многих других нейротрофических факторов, синтезируемых астроцитами, и активация экспрессии Ca^{2+} -зависимых генов.

Жизнеспособность клеток после фотоактивации контролировали путём окрашивания трипановым синим.

К 48 ч в модели нейрогенной ниши *in vitro* было зафиксировано достоверное увеличение количества клеток нейросфер, экспрессирующих NeuroD1 и Pax6 ($p < 0,01$) (рис. 2А,Б), причём этот эффект был инвертирован предварительной инкубацией нейросфер с $\text{A}\beta_{1-42}$ (рис. 2А,Б). Микрофотографии клеток представлены на рисунке 3. Интересно, что результатом экспозиции $\text{A}\beta$ стало первоначальное увеличение экспрессии Pax6 (к 24 ч) (рис. 2Б), но не NeuroD1 (рис. 2А) (его экспрессия увеличивается лишь к 48 ч культивирования), в клетках нейросфер, что соответствует ранее опубликованным данным о стимулирующем эффекте $\text{A}\beta_{1-42}$ в отношении экспрессии Pax6 в NSCs [23]. Экспрессия Nestin в контрольных условиях не менялась в ходе развития нейросфер и была не чувствительна к токсическому действию $\text{A}\beta$ (рис. 2В).

В контрольной группе фотоактивированные астроциты вызвали увеличение экспрессии Nestin, но не NeuroD1 или Pax6 к 24 ч (рис. 4А) и к 48 ч (рис. 4Б). Фотоактивация ChR2, экспрессируемого астроцитами, обеспечила восстановление подавленной

к 48 ч экспрессии NeuroD1, но не Pax6 в клетках нейросфер, подвергнутых действию $\text{A}\beta_{1-42}$. Причём активация астроцитов привела к дополнительному увеличению экспрессии Pax6 в клетках нейросфер, подвергнутых действию $\text{A}\beta_{1-42}$. Аналогичным образом отреагировал и Nestin: оптическая активация астроцитов увеличила экспрессию этого белка в нейросферах, обработанных $\text{A}\beta$ в условиях совместного культивирования (рис. 4). Микрофотографии экспрессии маркера NeuroD1 на нейросферах, культивируемых в присутствии $\text{A}\beta_{1-42}$ представлены на рисунке 5.

Известно, что транскрипционный фактор Pax6 (маркер клеток 1-го и 2а подтипов в динамике нейрогенеза) является регулятором пролиферации и поддержания пула NSCs. Высокий уровень его экспрессии в клетках нейросфер способствует их нейрональной дифференцировке [24], подавляя пролиферацию клеток астроглии [25]. Аналогичным образом NeuroD1 (маркер клеток 2b и 3-го подтипов, зрелых нейронов) является фактором нейрональной дифференцировки, способствует созреванию нейронов, и его экспрессия знаменует эффективный нейрогенез [26, 27]. Экспрессия NeuroD1, как и Nestin (маркер ранних этапов нейрогенеза), находится под контролем Pax6 в NPCс [28, 29], и он экспрессируется в более “поздних” (по стадиям развития) клетках в динамике нейрогенеза, поэтому объясним определённый лаг-период в изменении экспрессии Pax6, Nestin и NeuroD1 в нейрогенной нише *in vitro* при нейротоксическом действии $\text{A}\beta$.

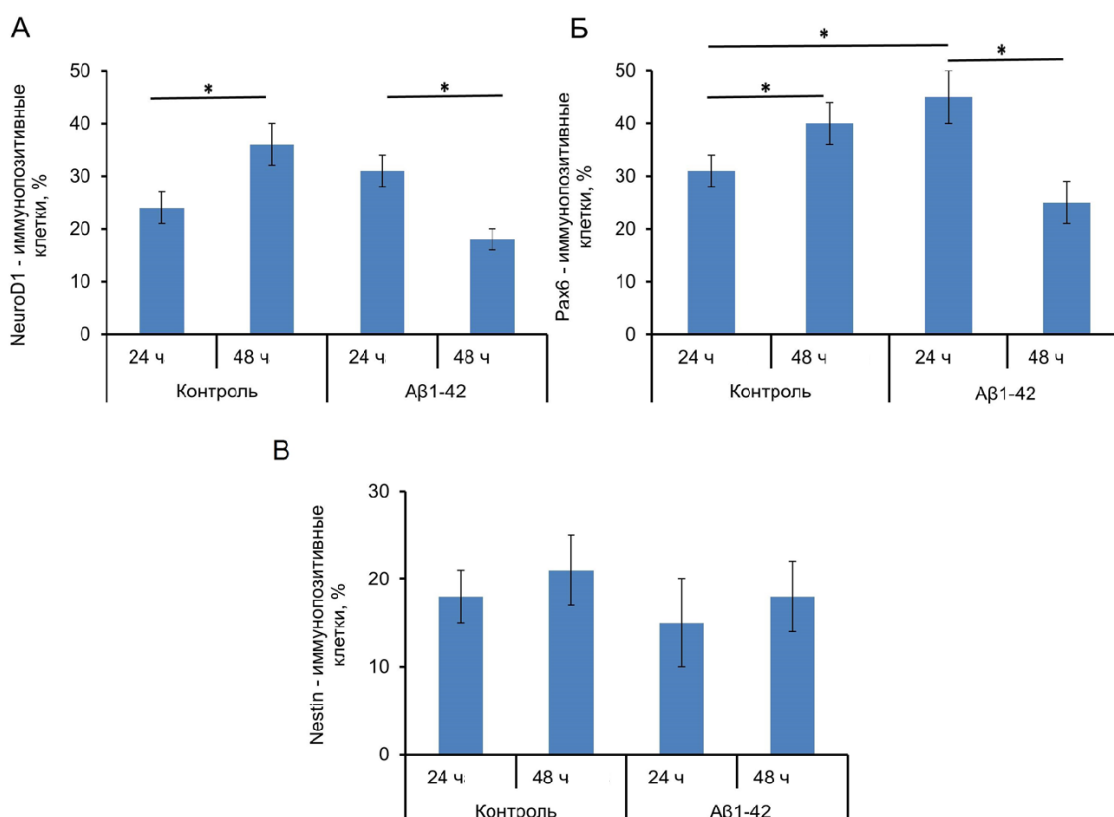


Рисунок 2. Особенности экспрессии маркеров нейрогенеза в опытной и контрольной группах без фотоактивации. А – Экспрессия маркера NeuroD1; Б – экспрессия маркера Nestin; В – экспрессия маркера Pax6. * – уровень статистической значимости $p < 0,05$.

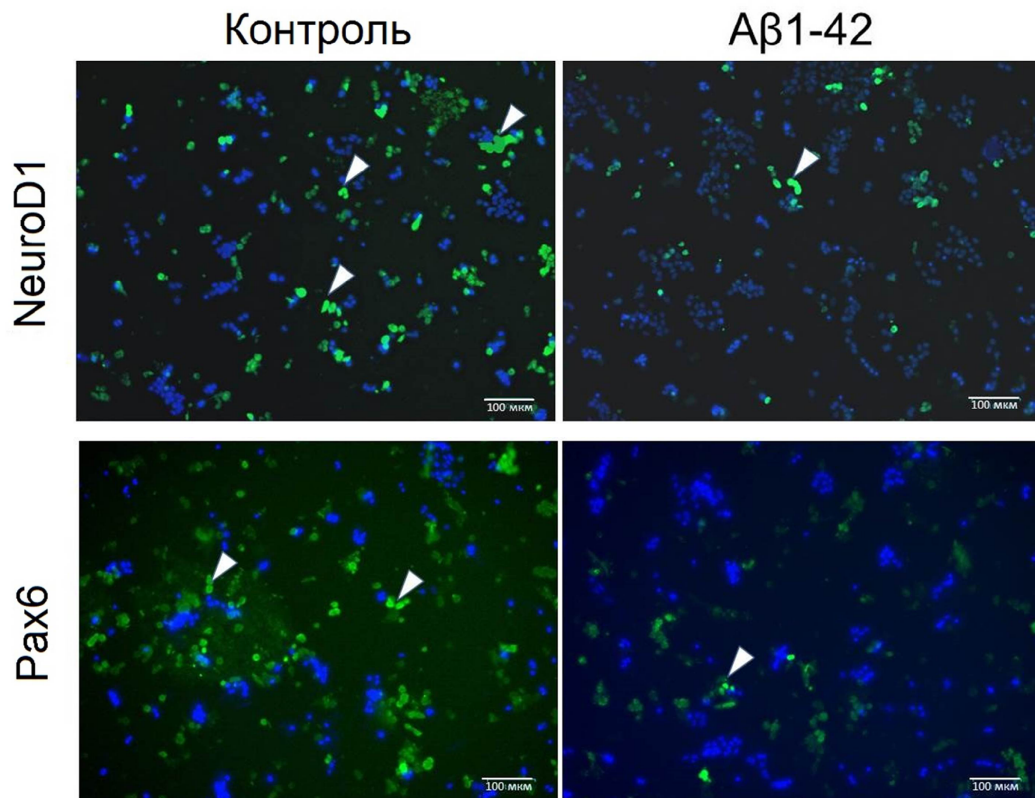


Рисунок 3. Микрофотографии экспрессии NeuroD1 и Pax6 в опытной и контрольной группах без фотоактивации астроцитов через 48 ч.

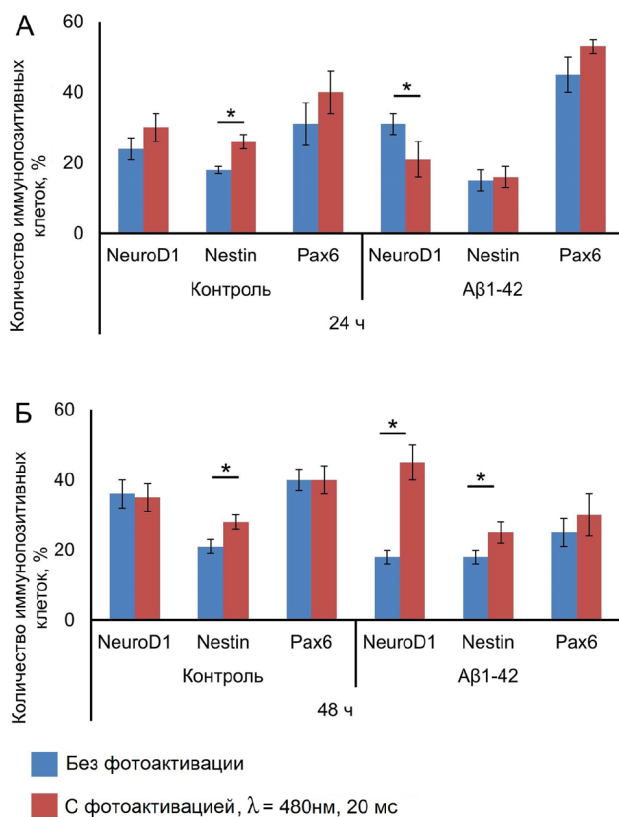


Рисунок 4. Особенности экспрессии маркеров нейрогенеза в опытной и контрольной группах при фотоактивации астроцитов. А – результаты через 24 ч инкубации; Б – результаты через 48 ч инкубации. * – уровень статистической значимости $p < 0,05$.

Регистрацию и изучение особенностей пролиферативной активности нейросфер *in vitro* проводили в режиме реального времени с использованием технологии xCELLigence, в течение 72 ч с интервалом 15 мин. Динамические изменения показателей клеточного индекса нейросфер, культивируемых в различных экспериментальных условиях, представлены на рисунке 6. Присутствие активированных астроцитов в модели нейрогенной ниши привело к статистически значимому ($p < 0,01$) увеличению пролиферативной активности (показатель клеточного индекса) нейросфер по сравнению с группой контроля: клеточный индекс составил $1,1435 \pm 0,006$ условных единиц (у.е.), а в клетках контрольной группы – $1,0919 \pm 0,007$ у.е.

В нейросферах, которые культивировали в присутствии A β , мы отметили снижение пролиферативной активности клеток: коэффициент пролиферации клеток составил $0,6256 \pm 0,006$ у.е., что статистически значимо ниже, чем в клетках контрольной группы ($p < 0,01$). Таким образом, несмотря на то, что экспозиция A β вызывала увеличение экспрессии Pax6 уже к 24 ч культивирования, это не сопровождалось увеличением пролиферации клеток нейросфер, в отличие от данных, приведённых в [23].

Активация астроцитов, культивируемых в составе нейрогенной ниши, после экспозиции A β привела к увеличению клеточного индекса до $0,6644 \pm 0,006$ у.е., что было статистически значимо выше, чем в группе без активации клеток астроглии, но не достигало уровня контроля ($p < 0,01$) (рис. 6)

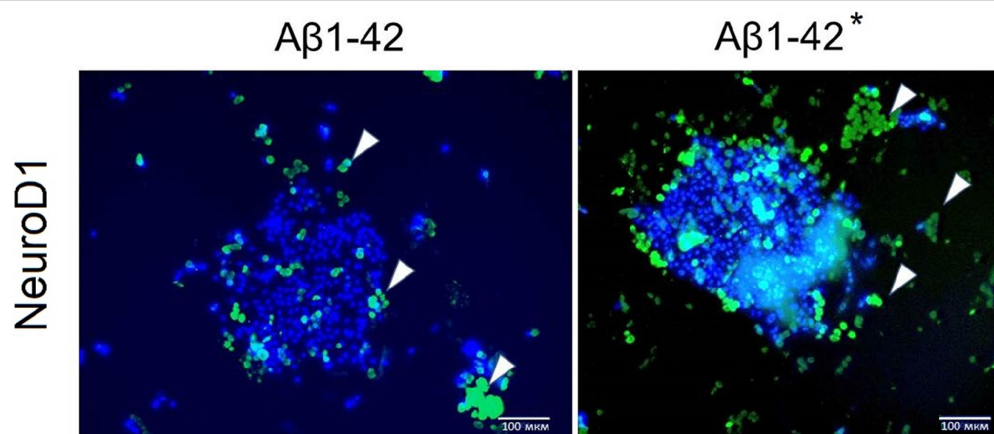


Рисунок 5. Микрофотографии экспрессии NeuroD1 в опытных группах без фотоактивации астроцитов и после фотоактивации астроцитов через 48 ч.

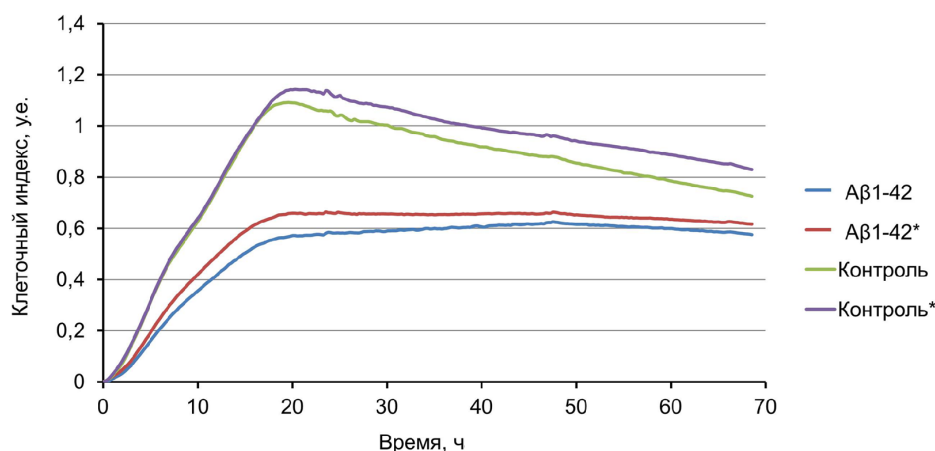


Рисунок 6. Динамические изменения клеточного индекса (пролиферативной активности) в опытной и контрольной группах. * – группы, которые подверглись фотоактивации ($\lambda=480$ нм, 20 мс).

Оценка экспрессии маркера пролиферации клеток (PCNA) продемонстрировала, что в интактной нейрогенной нише пролиферация клеток закономерно возрастает от 24 ч (рис. 7А) к 48 ч культивирования (рис. 7Б), а предварительное воздействие Аβ угнетает пролиферативную активность к 48 ч практически в 2 раза (рис. 7Б). Значительный стимулирующий эффект был достигнут при культивировании нейросфер в присутствии фотоактивированных астроцитов: экспрессия PCNA увеличилась четырёхкратно уже к 24 ч инкубации и сохранилась на таком уровне к 48 ч наблюдения. Аналогичным образом, экспрессия PCNA, драматически сниженная в результате предшествующей инкубации с Аβ, была не только полностью восстановлена, но и значительно увеличена за счёт активации ChR2 в GFAP-иммунопозитивных клетках астроглии в составе нейрогенной ниши (рис. 7). Таким образом, активация астроцитов в составе нейрогенной ниши вызвала быструю мобилизацию клеток с высоким пролиферативным потенциалом как в контрольной серии, так и в присутствии Аβ₁₋₄₂.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Мы обнаружили, что начало пролиферации нейросфер в модели нейрогенной ниши *in vitro* сопровождается увеличением экспрессии маркеров

нейрональной дифференцировки, и этот процесс чувствителен к токсическому действию Аβ как на начальных этапах нейрональной дифференцировки, так и на этапе созревания нейробластов. ChR2-опосредованная активация астроцитов, находящихся в составе нейрогенной ниши, обеспечивает мобилизацию клеток с высоким пролиферативным потенциалом (вероятно, пул нейрональных стволовых и прогениторных клеток), частичное восстановление нейрогенного потенциала пролиферирующих клеток, подвергшихся токсическому действию Аβ *in vitro*, но только на более позднем этапе нейрогенеза (вероятно, пул клеток 2b и 3-го подтипов). На начальных этапах дифференцировки активация астроцитов имеет противоположно направленное действие и усиливает Аβ-опосредованную стимуляцию экспрессии Pax6 в клетках. Эти данные соответствуют результатам, полученным в других экспериментальных условиях, где было продемонстрировано положительное влияние гиппокампальных астроцитов крыс на скорость пролиферации и дифференцировку клеток в направлении нейронов [30].

Коль скоро мы не обнаружили однонаправленных изменений пролиферативной активности и экспрессии маркеров нейрональной дифференцировки, вероятно, применённый протокол фотостимуляции астроцитов

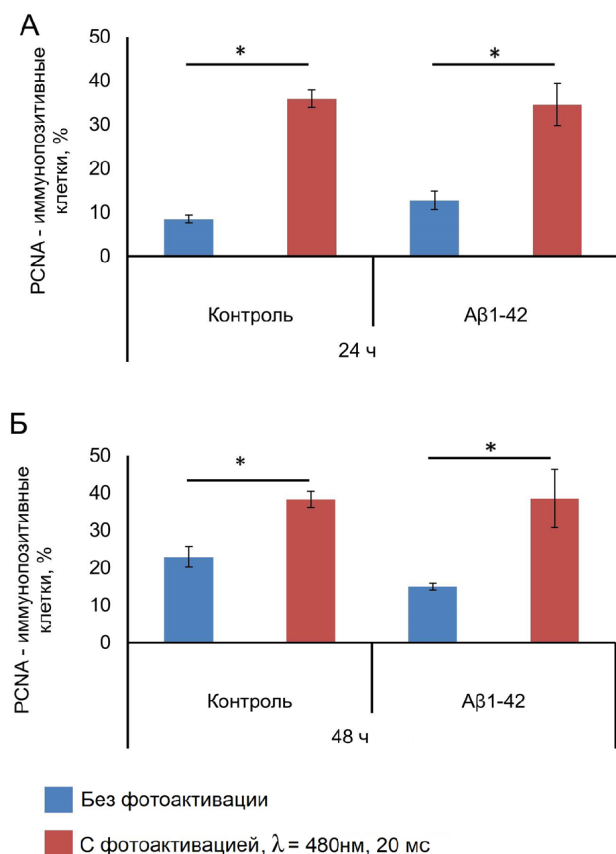


Рисунок 7. Особенности экспрессии маркера пролиферативной активности (PCNA) в опытной и контрольной группах при фотоактивации астроцитов. А – результаты через 24 ч инкубации; Б – результаты через 48 ч инкубации. * – уровень статистической значимости $p < 0,05$.

в составе нейрогенной ниши *in vitro* меняет соотношение покоящихся и активированных NSCs, которые характеризуются в SGZ разным фенотипом: молчащие NSCs (Nestin+PCNA-); активированные NSCs (Nestin+PCNA+).

Один из возможных механизмов может быть связан с высвобождением из фотоактивированных астроцитов АТР с последующей реализацией аутокринных и паракринных эффектов. Это предположение согласуется с данными о том, что высвобождение астроцитарного АТР вызывает пролиферацию клеток-предшественников во взрослом гиппокампе *in vitro* [31]. Вполне вероятно, что наряду с АТР высвобождается и ряд молекул, обладающих паракринными эффектами и влияющими на дифференцировку нейросфер, что требует дополнительного изучения.

Необходимо отметить, что при совместной инкубации с фотоактивированными астроцитами, экспрессия Pax6 и NeuroD1 в клетках нейросфер, не подвергнутых действию A β , значимо не менялась, несмотря на увеличение пролиферативной активности нейросфер. Это, вероятнее всего, свидетельствует о том, что применённый режим активации астроглии был недостаточен для индукции механизмов нейрональной дифференцировки NSCs/NPCs. Однако

такой же режим воздействия оказался эффективным в плане восстановления процессов нейрогенеза, нарушенных действием A β . Ранее было показано, что воздействие олигомеров A β на NSCs снижает потенциал деления в результате “старения” клеток, что сопровождается подавлением нейрогенеза и активацией глиогенеза [32]. В этом контексте активация астроцитов в пределах нейрогенной ниши может, вероятно, восстанавливать физиологический баланс процессов нейрогенеза и глиогенеза. Молекулярные механизмы такого регуляторного воздействия ещё предстоит изучить.

В целом, очевидно, что оптогенетический протокол стимуляции GFAP⁺-астроцитов в составе нейрогенной ниши *in vitro* продемонстрировал свою эффективность в снижении повреждающего действия токсической концентрации A β ₁₋₄₂ в отношении стволовых и прогениторных клеток гиппокампальной нейрогенной ниши.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы работы благодарят профессора Каспарова С. (университет Бристоля, Великобритания) за предоставление аденовирусных векторов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке 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/EC) и требованиями приказа Минздрава России № 267 от 19.06.2003 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lane C.A., Hardy J., Schott J.M. (2018) Eur. J. Neurol., **25**(1), 59-70.
2. Rodríguez J.J., Verkhatsky A. (2011) J. Anat., **219**(1), 78-89.
3. Hollands C., Bartolotti N., Lazarov O. (2016) Front. Neurosci., **10**, 178.
4. Komleva Y.K., Kuvacheva N.V., Malinocskaya N.A., Gorina Ya.V., Lopatina O.L., Teplyashina E.A., Pozhilenkova E.A., Zamay A.S., Morgun A.V., Salmina A.B. (2016) Hum. Physiol., **42**(8), 865-873.
5. Lin R., Cai J., Nathan C., Wei X., Schleidt S., Rosenwasser R., Iacovitti L. (2015) Neurobiol. Dis., **74**, 229-239.
6. Kerr A.L., Steuer E.L., Pochtarev V., Swain R.A. (2010) Neuroscience, **171**(1), 214-226.
7. Pozhilenkova E.A., Lopatina O.L., Komleva Y.K., Salmin V.V., Salmina A.B. (2017) Rev. Neurosci., **28**(4), 397-415.
8. Luo L., Guo K., Fan W., Lu Y., Chen L., Wang Y., Shao Y., Wu G., Xu J., Lu L. (2017) Exp. Ther. Med., **13**(2), 645-650.

9. Boitsova E.B., Morgun A.V., Osipova E.D., Pozhilenkova E.A., Martinova G.P., Frolova O.V., Olovannikova R.Y., Tohidpour A., Gorina Y.V., Panina Y.A., Salmina A.B. (2018) *J. Neuroinflammation*, **15**(1), 196.
10. Хилазьева Е.Д., Бойцова Е.Б., Пожиленкова Е.А., Солончук Ю.Р., Салмина А.Б. (2015) *Цитология*, **57**(10), 710-713. [Khilazheva E.D., Boytsova E.B., Pozhilenkova E.A., Solonchuk Yu.R., Salmina A.B. (2015) *Tsitologiya*, **57**(10), 710-713.]
11. Ehret F., Vogler S., Kempermann G. (2015) *Stem Cell Res.*, **15**(3), 514-521.
12. Salmin V.V., Komleva Y.K., Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Khilazheva E.D., Lopatina O.L., Pozhilenkova E.A., Shapovalov K.A., Uspenskaya Y.A., Salmina A.B. (2017) *Front. Aging Neurosci.*, **9**, 245.
13. Khan J., Das G., Gupta V., Mohapatra S., Ghosh S., Ghosh S. (2018) *ACS Chem. Neurosci.*, **9**(11), 2870-2878.
14. Beccari S., Valero J., Maletic-Savatic M., Sierra A. (2017) *Sci. Rep.*, **7**(1), 16528.
15. Falk S., Götz M. (2017) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **47**, 188-195.
16. Wilhelmsson U., Faiz M., de Pablo Y., Sjöqvist M., Andersson D., Widestrand A., Potokar M., Stenovec M., Smith P.L., Shinjo N., Pekny T., Zorec R., Ståhlberg A., Pekna M., Sahlgren C., Pekny M. (2012) *Stem Cells*, **30**(10), 2320-2329.
17. Robinson C., Apgar C., Shapiro L.A. (2017) *Neural Plasticity*, **26**(7), 1314-1318.
18. 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.
19. Figueiredo M.F., Lane S., Stout R.F., Liu B., Parpura V., Teschemacher A.G., Kasparov S. (2014) *Cell Calcium*, **56**(3), 208-214.
20. 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.
21. Scrase S., O'Neill E., Hammond E.M., Pires I.M. (2013) *Methods Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **1046**, 295-306.
22. Figueiredo M., Figueiredo M., Lane S., Stout R.F. Jr., Liu B., Parpura V., Teschemacher A.G., Kasparov S. (2014) *Cell Calcium*, **56**(3), 208-214.
23. Itokazu Y., Yu R.K. (2014) *Mol. Neurobiol.*, **50**(1), 186-196.
24. Hack M., Sugimori M., Lundberg C., Nakafuku M., Götz M. (2004) *Mol. Cell. Neurosci.*, **25**(4), 664-678.
25. Sakurai K., Osumi N. (2008) *J. Neurosci.*, **28**(18), 4604-4612.
26. Gao Z., Ure K., Ables J.L., Lagace D.C., Nave K.A., Goebbels S., Eisch A.J., Hsieh J. (2009) *Nat. Neurosci.*, **12**(9), 1090-1092.
27. Boutin C., Hardt O., de Chevigny A., Coré N., Goebbels S., Seidenfaden R., Bosio A., Cremeret H. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**(3), 1201-1206.
28. Roybon L., Hjalt T., Stott S., Guillemot F., Li J.Y., Brundin P. (2009) *PLoS One*, **4**(3), e4779.
29. Thakurela S., Tiwari N., Schick S., Garding A., Ivanek R., Berninger B., Tiwari V.K. (2016) *Cell Discov.*, **9**(2), 15045.
30. Song H., Stevens C.F., Gage F.H. (2002) *Nature*, **417**(6884), 39-44.
31. Cao X., Li L.P., Qin X.H., Li S.J., Zhang M., Wang Q., Hu H.H., Fang Y.Y., Gao Y.B., Li X.W., Sun L.R., Xiong W.C., Gao T.M., Zhu X.H. (2013) *Stem Cells*, **31**(8), 1633-1643.
32. Mohn T.C., Koob A.O. (2015) *J. Exp. Neurosci.*, **9**(2), 25-34.

Поступила в редакцию: 15. 07. 2019.
После доработки: 25. 09. 2019.
Принята к печати: 27. 09. 2019.

ASTROGLIA-MEDIATED REGULATION OF CELL DEVELOPMENT IN THE MODEL OF NEUROGENIC NICHE IN VITRO TREATED WITH A β ₁₋₄₂

A.V. Morgun, E.D. Osipova*, E.B. Boytsova, A.N. Shuvaev, Yu.K. Komleva, L.V. Trufanova, E.F. Vais, A.B. Salmina

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

Neurogenesis is a complex process which governs embryonic brain development and is important for brain plasticity throughout the whole life. Postnatal neurogenesis occurs in neurogenic niches that regulate the processes of proliferation and differentiation of stem and progenitor cells under the action of stimuli that trigger the mechanisms of neuroplasticity. Cells of glial and endothelial origin are the key regulators of neurogenesis. It is known that physiological neurogenesis is crucial for memory formation, whereas reparative neurogenesis provides partial repair of altered brain structure and compensation of neurological deficits caused by brain injury. Dysregulation of neurogenesis is a characteristic of various neurodevelopmental and neurodegenerative diseases, particularly, Alzheimer's disease which is a very important medical and social problem. In the *in vitro* model of the neurogenic niche using hippocampal neurospheres as a source of stem/progenitor cells and astrocytes, we studied effects of astrocyte activation on the expression of markers of different stages of cell proliferation and differentiation. We found that aberrant mechanisms of development of stem and progenitor cells, caused by the beta-amyloid (A β ₁₋₄₂), can be partially restored by targeted activation of GFAP-expressing cells in the neurogenic niche.

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

Funding. The authors are supported by the Ministry of Public Health of Russian Federation (State Assignment for Research, 2018-2020).

Received: 15.07.2019, revised: 25.09.2019, accepted: 27.09.2019.