

**ЭФФЕКТ КОНВЕРСИОННОГО КОКТЕЙЛЯ НА СОСТОЯНИЕ
АСТРОЦИТОВ И НЕЙРОНОВ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ
ГИППОКАМПА 5xFAD МЫШЕЙ НА ФОНЕ ИНГИБИРОВАНИЯ
АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА 2**

© 2025 г. А. В. Чаплыгина^{1,*}, Д. Ю. Жданова¹, Р. А. Полтавцева², Н. В. Бобкова¹

¹Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

*²Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии
и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия*

**E-mail: shadowhao@yandex.ru*

Поступила в редакцию 28.08.2024 г.

После доработки 16.10.2024 г.

Принята к публикации 02.11.2024 г.

Нейродегенеративные заболевания – это сложные патологические состояния, при которых наблюдается прогрессирующая гибель нейронов. В связи с этим внимание специалистов привлекают подходы, основанные на использовании комбинаций биоактивных химических соединений для трансформации других, относительно устойчивых типов клеток в полноценные нейроны. Химическая конверсия является перспективным методом, который демонстрирует высокую эффективность в моделях, состоящих исключительно из астроцитов, однако в более реальных модельных системах присутствуют различные типы клеток, и их взаимодействие может изменять ответ на химическую конверсию. В данной работе был исследован эффект действия многокомпонентного химического коктейля на клетки в смешанных астро-нейрональных культурах из гиппокампа трансгенных мышей линии 5xFAD, моделирующих генетически обусловленную форму болезни Альцгеймера. Также в данном исследовании было смоделировано состояние, имитирующее возможное снижение активности ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2) вследствие его интернализации внутрь клетки после связывания с коронавирусом SARS-CoV2 с целью изучения эффективности химической конверсии при нарушении активности этого фермента в мозге. Полученные данные свидетельствуют, что увеличение нейрональной плотности и появление новых нейронов после действия конверсионного коктейля на сложные многокомпонентные клеточные системы проявляется только на поздних сроках культивирования клеток гиппокампа нетрансгенных животных, а также при использовании культур из гиппокампа мышей линии 5xFAD, когда наблюдается увеличение уровня астроглии. Ингибирование ACE2 оказывало существенное влияние на морфологию отдельных астроцитов и нейронов в культурах клеток гиппокампа. При исследовании действия химического коктейля была обнаружена зависимость эффекта от трансгенности культуры и времени введения конверсионного коктейля относительно ингибирования ACE2. Культуры клеток, полученные из трансгенных животных, более восприимчивы как к действию ингибитора ACE2, так и к воздействию факторов химической конверсии.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, мыши линии 5xFAD, ангиотензин-превращающий фермент 2, химические конверсионные коктейли, MLN-4760

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на многочисленные исследования, поиск эффективных методов лечения болезни Альцгеймера (БА) по-прежнему остается актуальной задачей. Главной причиной нейродегенеративных заболеваний является гибель нейронов, поэтому способ предотвращения их утраты является одним из основных направлений современных исследований. Известно, что способность к нейрогенезу в мозге взрослых млекопитающих чрезвычайно мала и ограничена несколькими областями, что затрудняет регенерацию нейронов и функциональное восстановление после их потери.

Астроциты являются одним из ключевых клеточных типов, способных к активации, пролиферации и миграции, что делает их привлекательными мишенями для перепрограммирования в новые нейроны взамен утраченных [1]. Поэтому в последние годы все чаще рассматривают подход прямого преобразования не-нейрональных клеток в нейрональные под влиянием различных нейрогенных факторов [2–4]. Большинство экспериментов по перепрограммированию астроцитов в функциональные нейроны проводятся с помощью вирус-опосредованной экспрессии фактора транскрипции нейрогенной дифференцировки 1 (NEUROD1) или других факторов транскрипции, таких как нейрогенин 2 (NGN2), ASCL1 и SOX2, которые способны перепрограммировать глиальные клетки в нейроны как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [5, 6]. Такой подход требует использование вирусов и инвазивных внутричерепных или внутриспинальных инъекций. Поэтому особый интерес представляет химическое перепрограммирование малыми молекулами, позволяющее осуществлять превращение клеток без применения вирусов. Такие химические конверсионные коктейли состоят из нескольких веществ, необходимых для превращения клеток глии в нейроны [3, 7]. Полученные таким образом нейроны способны потенциально интегрироваться в функциональные цепи на место утраченных нейронов [5].

Так, было показано, что при использовании химического коктейля, содержащего VPA, CHIR99021 и Repsox, астроциты, выделенные из мозга 1-дневных мышей, были способны трансформироваться в нейроны *in vitro* (> 20%) [8]. Обработка этим коктейлем приводила к изменению морфологии клеток с астроцитарной на нейронную, при этом полученные нейроны были способны генерировать повторяющиеся последовательности потенциалов действия и постсинаптический ток [8]. В другом исследовании [7] было показано, что модуляции ряда сигнальных путей, таких как Notch, киназы гликогенсинтазы 3 (GSK-3), трансформирующего фактора роста β (TGF- β) и костного морфогенетического белка (BMP), достаточно для превращения астроцитов в нейроны, которые не только выживают в культуре более 7 месяцев, но и способны генерировать повторяющиеся потенциалы действия и демонстрировать устойчивую активность синаптических импульсов. Эффективно перепрограммировать человеческие астроциты в нейроны может и химический коктейль, состоящий из нескольких небольших молекул (DAPT, CHIR99021, SB431542 и LDN193189), действие которых направлено на ингибирование глиальных и активацию нейрональных сигнальных путей. Путь TGF- β индуцирует эпителиально-мезенхимный переход, а его ингибирование с помощью SB431542 может усилить процесс перепрограммирования клеток. DAPT является ингибитором γ -секретазы и ингибирует сигнальный путь Notch, способствуя дифференцировке нейронов [9]. CHIR99021 является ингибитором GSK-3 β и участвует в активации Wnt-сигнального пути, вовлеченного в регуляцию самообновления плюрипотентных стволовых клеток. Ингибирование передачи сигналов GSK3 способствует гомеостазу нейропрогениторов (NPC) и нейральной индукции [10].

Химическая клеточная конверсия является перспективным подходом, хотя и сопряжена с некоторыми сложностями. В моделях, состоящих исключительно из астроцитов, эта технология проявляет высокую эффективность, однако при переходе к многокомпонентным моделям вызывает затруднения. В смешанных культурах присутствуют различ-

ные типы клеток, чье взаимодействие может изменять ответ на химическую конверсию. Важными факторами, влияющими на успешность этого процесса, являются микросреда окружающих клеток, эпигенетические регуляторы, факторы роста, а также многочисленные сигнальные пути, активируемые в ответ на химические стимулы.

В последние годы существенно вырос интерес к ангиотензин-превращающему ферменту 2 (ACE2), поскольку помимо его важной роли в регуляции ренин-ангиотензиновой системы, он также является рецептором, обеспечивающим проникновение в клетку трех видов коронавируса [11, 12]. Проникновение SARS-CoV2 в клетки через связывание и последующую интернализацию ACE2 приводит к значительному снижению активности ACE2 во внеклеточном пространстве, в результате чего наблюдаются изменения в активности ренин-ангиотензиновой системы. В итоге снижается или полностью блокируется ключевая защитная функция ACE2 – деградация ангиотензина II до ангиотензина 1–7. Поскольку SARS-CoV-2 проникает в клетки, связываясь с ACE2, можно предположить, что ингибирование ACE2 подходящим селективным ингибитором может воспроизводить патофизиологические эффекты, вызванные инфекцией SARS-CoV2. Предполагается, что изменения в уровнях лигандов рецепторов ангиотензина II (AT1 и AT2) вследствие ингибирования ACE2 могут модулировать рецепторные сигнальные пути, включенные в процесс астро-нейрональной конверсии [13]. Хотя прямые взаимодействия составляющих конверсионного коктейля с ACE2 не установлены, это не исключает их влияния на экспрессию и функцию ACE2 опосредованно, через воздействие на сигнальные пути TGF- β , BMP, Wnt и Notch.

В данной работе была исследована возможность использования конверсионного коктейля с целью предотвращения развития патологических изменений в астро-нейрональной культуре трансгенных мышей 5xFAD, подвергнутых действию ингибитора ACE2, что может отражать процессы, происходящие в клетках мозга при дефиците его активности у больных БА, инфицированных коронавирусом. Также стоит отметить, что в клетках мышей 5xFAD присутствуют две мутации в гене *PSEN1*, что делает их особенно уязвимыми к изменениям в активности γ -секретазы. Следовательно, ингибирование γ -секретазы с помощью DAPT – одного из соединений, входящих в состав конверсионного коктейля, – может обуславливать возможные изменения в процессе химической конверсии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Трансгенные мыши 5XFAD (TG6799) были выбраны для создания клеточных культур с молекулярными признаками патогенеза БА. Мыши линии 5xFAD получены на конгенном фоне SJL/C57B16, чтобы свести к минимуму опасения, связанные с сегрегацией аллелей и высокой изменчивостью исходного гибридного фона. Трансгенные мыши 5xFAD сверх-экспрессируют пять мутаций FAD: трансген APP (695) содержит шведскую (K670N, M671L), флоридскую (I716V) и лондонскую (V717I) мутации, а трансген PSEN1 содержит мутации M146L и L286V. Экспрессия обоих трансгенов регулируется элементами мышинового *Thy1*. промотора, чтобы управлять их сверх-экспрессией только в нейронах. Трансгены вставлены в один локус Chr3:6297836, где они не оказывают влияния на другие гены.

Содержание животных осуществлялось в специально оборудованном помещении с естественной освещенностью при 21 – 23 °C, соответствующем санитарным нормам, в клетках по 5 особей со свободным доступом к воде и стандартизированному корму. Трансгенность животных определялась с помощью классической ПЦР с использованием ДНК, выделенной из биоптатов уха. Для генотипирования мы использовали минимальный объем ткани ушной раковины, что не наносит вреда животным в последу-

ющей их жизни. Наличие Tg кассеты длиной 377 пн выявляли с помощью праймеров 5'-AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG-3' и 5'-CGG GGG TCT AGT TCT GCA T-3' с последующим электрофоретическим визуализированием. В качестве контроля использовались особи, не содержащие трансгенов. Для минимизации страданий животных и сохранения жизни рожающей самки мыши мы не использовали полостные операции и инвазивные хирургические вмешательства. Вместо этого использовался подход, основанный на естественном родоразрешении животных без проведения оперативных манипуляций.

Первичная смешанная астро-нейрональная культура клеток гиппокампа

Дальнейшая работа требовала получения первичных клеточных культур гиппокампа новорожденных животных (0–1 день). С этой целью использовался метод быстрой гильотинации в лабораторных условиях для эвтаназии экспериментальных субъектов. Данный подход обеспечивает быстрое и гуманное умерщвление животных, минимизируя риск причинения им дополнительных страданий. Далее производилось вскрытие черепной коробки и изъятие мозга. Извлечение гиппокампа осуществлялось механическим способом с использованием бинокля. После извлечения из мозга гиппокампы механически измельчали и обрабатывали раствором Trypsin-EDTA (Gibco, США). Полученную путем ферментативной и механической диссоциации суспензию клеток вносили в лунки 12-луночного планшета, покрытые опорным субстратом Poly-D-Lysine (Gibco, США), или на стекла, покрытые тем же опорным субстратом, дожидались прикрепления клеток к планшету и добавляли соответственно по 2 или 1 мл среды Neurobasal Medium (Gibco, США), содержащей 2% B-27 Supplement (Gibco, США) и 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Gibco, США). Каждые пять дней осуществляли замену половины среды на новую. Культивирование клеток до необходимого срока осуществляли в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO₂. Аналогичным образом получали культуры клеток из гиппокампа трансгенных животных линии 5xFAD (Tg) и нетрансгенных животных-одноплетников (nTg). В экспериментах использовались культуры в возрасте 14 дней для модели ингибирования ACE2 и 45 дней для химической конверсии.

Конверсионный коктейль

Для химической нейрональной конверсии клеток первичной культуры использовали смесь SB431542, LDN193189, CHIR99021 и DAPT. Каждое из вышеперечисленных соединений является блокатором или обладает ингибирующим действием по отношению к одному из рецепторов или ферментов, играющих ключевую роль в процессах дифференцировки или репрограммирования клеток. Так, SB431542 – блокатор TGFβ рецепторов; LDN193189 – блокатор BMP рецепторов; CHIR99021 – блокатор GSK3; DAPT – ингибитор γ-секретазы, тормозящий Notch 1-сигнальный путь.

Концентрация соединений, входящих в состав конверсионного коктейля, в лунках на протяжении всего эксперимента составляла SB431542 (5 мкМ), LDN193189 (0.25 мкМ), CHIR99021 (1.5 мкМ) и DAPT (5 мкМ).

Ингибирование ACE2

Для ингибирования ACE2 использовался MLN-4760, который является эффективным специфическим ингибитором ACE2 мышей и человека [14]. Концентрация MLN-4760 на протяжении всего эксперимента в каждой отдельной лунке составляла 0.2 нМ в соответствии с рекомендациями производителя. Проводились две серии экспериментов. В первом случае культуры клеток из трансгенных и нетрансгенных мышей обрабатывались ингибитором ACE2 в течение суток, после чего проводилось введение конверсионного коктейля (группа Treatment). Во втором случае клетки культуры предварительно обрабатывались конверсионным коктейлем за четыре часа до ингибирования ACE2 (группа Priming).

Иммуноцитохимия

По окончании экспериментов клеточные культуры фиксировали в течение 10 мин 4%-ным параформальдегидом, после чего увеличивали проницаемость мембран с помощью 0.2%-ного раствора Triton X-100 и в течение часа при комнатной температуре блокировали неспецифическое связывание с антигенами в растворе PBST (PBS + 0.1% Tween 20) + 1% BSA с применением нормализованной 10%-ной сыворотки осла (Abcam, ab7475) и нормализованной 5%-ной сыворотки козла (Invitrogen, 31872). Культуры оставляли на ночь при 4°C для инкубирования с первичными антителами. После инкубации с первичными антителами проводили связывание с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными метками в течение 2 ч при комнатной температуре. После каждой процедуры клетки отмывали 3 раза раствором PBS (pH 7.4) по 5 мин. Для иммуноцитохимической окраски астроцитов использовались первичные антитела к GFAP: Chicken anti GFAP (ab4674, Abcam, США, Lot:GR3393187-1, 1 : 800) с соответствующими вторичными антителами Goat anti Chicken Alexa488nm (ab150169, Abcam, США, Lot:GR3371470-1, 1 : 1000). Для иммуноцитохимической окраски нейронов использовались первичные антитела к MAP2: Rabbit anti MAP2 (ab32454, Abcam, США, 1 : 200) с соответствующими вторичными антителами Goat anti Rabbit Alexa594nm (ab150080, Abcam, США, Lot:3232361-3, 1 : 400) или Donkey anti Rabbit Alexa405nm (ab175649, Abcam, США, Lot:GR3361021-4, 1 : 400). Для оценки плотности культуры проводили stitching-съемку каждой лунки культурального планшета с помощью автоматизированной системы JuLI Stage (NanoEnTek Inc., Южная Корея). Съемка производилась на площади 6.7 x 9 мм, состоящей из 121 снимка, площадь одного снимка составляла 2818816 пикселей. Далее в программе ImageJ изображение с помощью внутренних алгоритмов превращалось в бинарное черно-белое, и в пикселях оценивалась площадь, которую занимали иммунопозитивные структуры – нейроны и астроциты. Площадь одного снимка принималась за 100%, площадь иммунопозитивных структур – процент от общей площади. В случае перекрывающихся окрасок (двойная иммунопозитивность астроглии и нейронов) производилась сегментация изображения методом водораздела по пороговому уровню серого с помощью внутренних алгоритмов Watershed в ImageJ. Сначала изображение также превращалось в бинарное черно-белое, разбивалось на различные области, каждая из которых обладает свойствами однородности распределения уровня серого. Границы между этими областями определялись по самым резким изменениям яркости, которые обозначались как линии водораздела. Так, объекты с двойной иммунопозитивностью, обладающие наибольшей величиной градиента яркости, отсекаются от исследуемой площади при дальнейшем анализе изображения.

Статистический анализ

В данном исследовании использовались животные из различных пометов с целью минимизации влияния внутрипометной вариации на результаты эксперимента. Один новорожденный организм использовался для получения клеточных культур, высеваемых в две лунки культурального планшета. Всего было использовано 36 животных. Статистический анализ результатов проводился с помощью программного обеспечения Sigma Plot 15.0. Данные по каждому эксперименту воспроизводились в шести повторях (обособленных культуральных лунках) и представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего, результаты дополнительно представлены на графиках в виде вертикальных диаграмм рассеяния по 200 или 100 точек на диаграмму (анализ примерно 30–15 изображений с каждой лунки). Проверка гипотезы о нормальном распределении осуществлялась с применением теста Шапиро–Уилка. Для сравнения различий между группами и определения статистической значимости использовались однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным сравнением групп

по методу Данна (ненормальное распределение) и по методу Бонферрони (нормальное распределение) в случае множественных сравнений, а также тест Манна–Уитни и *t*-тест для сравнений между двумя группами, $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Действие конверсионного коктейля на многокомпонентные культуры клеток

Мы обнаружили, что добавление конверсионного коктейля в культуры клеток в возрасте 14 и 28 дней как трансгенных, так и нетрансгенных животных не только не вызвало химической конверсии, но приводило к быстрой гибели культур (данные не показаны). Однако при использовании старых (1.5 месяца) гиппокампальных культур (рис. 1) наблюдались выраженные изменения. Так, в старых культурах, полученных на нетрансгенных животных, конверсионный коктейль оказывал минимальный эффект на нейрональную ($26 \pm 0.3\%$ в нативных культурах, $29.6 \pm 0.3\%$ после действия коктейля) и астроцитарную ($43.4 \pm 0.4\%$ в нативных культурах, $45.5 \pm 0.5\%$ после действия коктейля) плотности. При этом в культурах трансгенных животных происходило достоверное увеличение нейрональной плотности ($16.6 \pm 0.3\%$ в нативных культурах, $31.7 \pm 0.4\%$ после действия коктейля, $p \leq 0.001$) с одновременным падением плотности астроцитов ($69.3 \pm 0.3\%$ в нативных культурах, $56.7 \pm 0.5\%$ после действия коктейля, $p \leq 0.001$). Клеточные культуры, проходя свой естественный процесс старения, теряют нейроны и становятся более глиальными по своей структуре. При этом стареющие культуры трансгенных животных наиболее близки к монокультуре.

Действие конверсионного коктейля на культуры с ингибированием ACE2

В данном исследовании мы воспроизвели снижение активности этого фермента в первичных гиппокампальных культурах nTg и Tg 5xFAD мышей с помощью специфического ингибитора ACE2 – MLN-4760. Схема эксперимента представлена на рис. 2, j. Ингибитор ACE2 оказал существенное влияние на морфологию отдельных астроцитов и нейронов. В условиях нормального функционирования клеточных культур MAP2 выполняет роль специфического маркера нейрональных микротрубочек, тогда как GFAP служит маркером глиальных клеток, в частности астроцитов. В нормальных условиях каждый из этих маркеров проявляет свою экспрессию в соответствующих клеточных типах, что позволяет четко различать нейроны и астроциты в гистологических препаратах или клеточных культурах. Двойная иммунопозитивность, наблюдаемая в экспериментальных условиях, подразумевает одновременно положительное окрашивание как для MAP2, так и для GFAP в одной и той же клетке. Двойная иммунопозитивность не является нормальной реакцией и может указывать на патологические изменения в клетках. Под действием ингибитора ACE2 астроциты изменяли свою звездчатую форму в сторону с выраженной дисморфией клеточных отростков (рис. 2, a1–b1) и начинали проявлять двойную иммунопозитивность к маркерам GFAP/MAP2, что, как мы полагаем, отражает выраженные резкие деформационные воздействия на цитоскелет астроцитов [15]. На ранних стадиях действия ингибитора происходило снижение плотности астроцитов и разрушение нейрональных отростков нейронов вплоть до полного исчезновения клеток.

При исследовании действия химического конверсионного коктейля была обнаружена зависимость эффекта от трансгенности культуры и времени введения конверсионного коктейля относительно ингибирования ACE2. В культуре нетрансгенных животных (рис. 2) ингибитор ACE2 вызывал снижение плотности астроцитов с $50.6 \pm 0.5\%$ до $20.3 \pm 0.4\%$ и нейронов с $46 \pm 0.5\%$ до $12 \pm 0.2\%$.

В группе «Treatment» улучшалась общая морфология культуры, восстанавливалась астроцитарная плотность ($34.4 \pm 0.3\%$ астроцитарная плотность в группе «Treatment»),

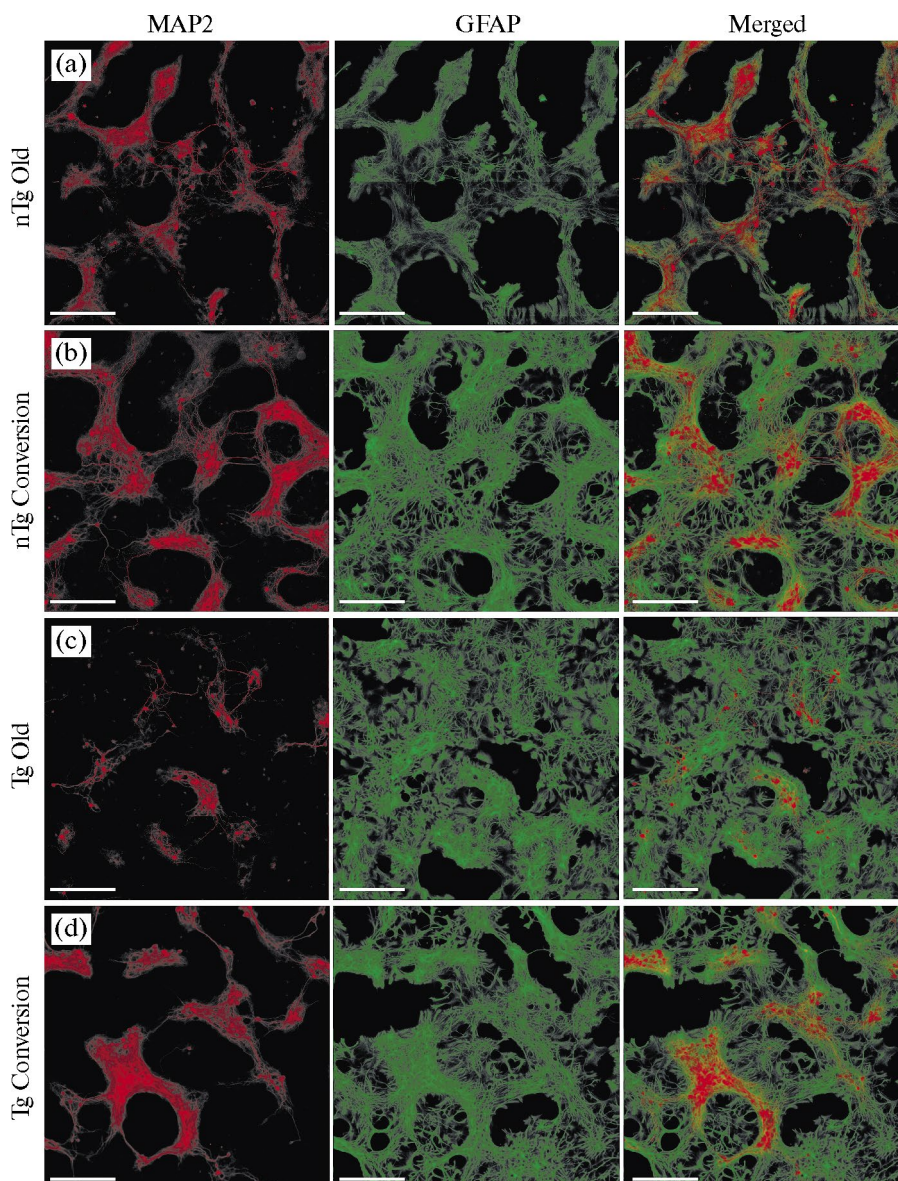


Рис. 1. Эффект химического конверсионного коктейля на старые первичные клеточные культуры гиппокампа нетрансгенных и трансгенных 5xFAD мышей.

Иммунопозитивность к маркеру астроцитов (GFAP – зеленый) и маркеру нейронов (MAP2 – красный). Масштаб – 250 мкм. (a) – Нативная старая первичная культура клеток из гиппокампа нетрансгенных животных (nTg). (b) – Влияние конверсионного коктейля на старую первичную культуру клеток гиппокампа нетрансгенных животных (nTg conversion). (c) – Нативная старая первичная культура клеток гиппокампа трансгенных животных (Tg). (d) – Влияние конверсионного коктейля на старую первичную культуру клеток гиппокампа трансгенных животных (Tg conversion). (e) – Нейрональная и астроцитарная плотности (%) в первичных культурах клеток гиппокампа нетрансгенных животных до и после химической конверсии. (f) – Нейрональная и астроцитарная плотности (%) в первичных культурах клеток гиппокампа трансгенных животных до и после химической конверсии. * – $p \leq 0.001$, U-тест Манна-Уитни, ** – $p \leq 0.001$, t-тест. →

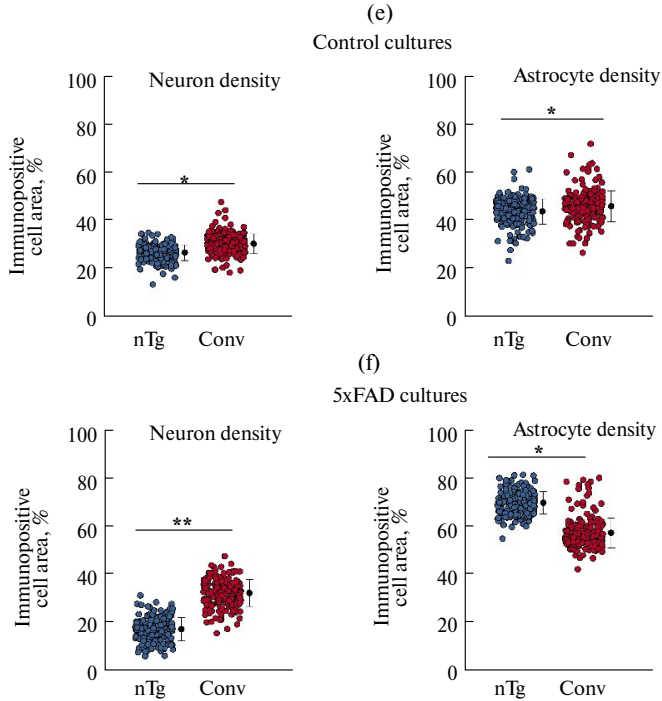


Рис. 1. Продолжение.

хотя часть астроцитов все равно продолжала экспрессировать MAP2 (снижение двойной иммунопозитивности астроцитов с $89.2 \pm 0.4\%$ до $63 \pm 0.5\%$ в группе «Treatment»). При этом наблюдалось возникновение тел нейронов и формирование нейритов, хотя общая нейрональная плотность оставалась низкой ($10.7 \pm 0.2\%$). В группе «Priming» все астроциты продолжали экспрессировать MAP2 ($90.6 \pm 0.5\%$), при этом их плотность не снижалась ($50 \pm 0.4\%$ плотность астроцитов по иммунопозитивности к GFAP), хотя общая морфология культуры все равно оставалась нарушенной. В редких местах были обнаружены тела нейронов.

При аналогичной постановке опытов с культурами из трансгенных животных (рис. 3) действие ингибитора приводило к нарушению астроцитарной плотности и изменению морфологии астроцитов, гораздо более выраженному, чем при постановке опытов с культурами нетрансгенных мышей ($66.5 \pm 0.5\%$ нативный уровень, $14.6 \pm 0.4\%$ ACE2-блокада). При действии ингибитора происходило полное исчезновение нейронов ($35.3 \pm 0.4\%$ – нативный уровень, $9 \pm 0.3\%$ – ингибитор ACE2), при этом астроциты также демонстрировали двойную иммунопозитивность к GFAP/MAP2.

При воздействии на культуры конверсионным коктейлем было обнаружено сохранение астро-нейрональных плотностей и клеточных морфологий в обеих исследуемых группах. Так, в группе «Treatment» было обнаружено повышение астроцитарной плотности ($37.4 \pm 0.4\%$) и нейрональной плотности ($23 \pm 0.4\%$), а в группе «Priming» аналогичное сохранение плотностей культуры ($49 \pm 0.2\%$ астроцитарная плотность, $25 \pm 0.2\%$ нейрональная плотность). Важно отметить, что при этом в обеих группах не проявлялось явного патологического нарушения общей морфологии культуры. Астроциты под действием конверсионного коктейля сохраняли свою звездчатую форму, было показано снижение количества астроцитов с двойной иммунопозитивностью к маркерам GFAP/ MAP2 с $88.4 \pm 0.5\%$ до $67.6 \pm 0.6\%$ в группе «Treatment» и до $77.9 \pm 0.5\%$ в группе «Priming».

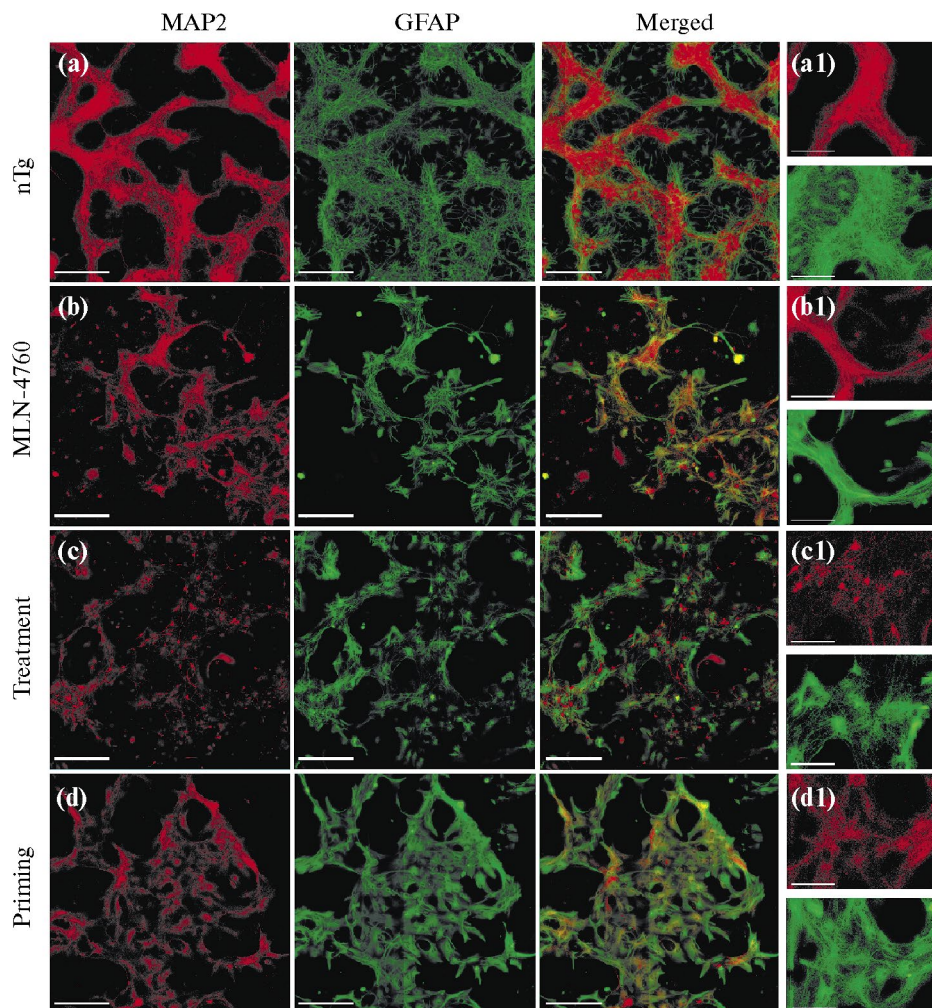


Рис. 2. Эффект химического конверсионного коктейля на первичные клеточные культуры гиппокампа нетрансгенных животных при ингибировании ACE2. Иммунопозитивность к маркеру астроцитов (GFAP – зеленый) и маркеру нейронов (MAP2 – красный). Масштаб – 250 мкм для рисунков группы a–d, масштаб 125 мкм для рисунков группы a1–d1. (a–a1) – Нативная первичная культура клеток гиппокампа нетрансгенных мышей (nTg). (b–b1) – Ингибирование ACE2 с помощью MLN-4760. (c–c1) – Введение конверсионного коктейля после ингибирования ACE2 (Treatment). (d–d1) – Введение конверсионного коктейля до ингибирования ACE2 (Priming). (e) – Нейрональная и астроцитарная плотности (%) в первичных культурах клеток гиппокампа нетрансгенных мышей. * – $p < 0.05$, односторонний ANOVA, пост-хок тест Данна. (f) – Площадь астроцитов (%), проявляющих двойную иммунопозитивность к маркерам GFAP/MAP2. * – $p < 0.001$, односторонний ANOVA, пост-хок тест Бонферрони. (j) – Схема эксперимента с определением групп. →

В результате анализа изменений плотности астроцитов и нейронов, а также количественного определения клеток с двойной иммунопозитивностью мы установили, что группа Treatment, в которой терапевтические мероприятия проводились после ингибирования ACE2, продемонстрировала значительно лучшие результаты по сравнению с группой Priming, в которой введение конверсионного коктейля осуществлялось до воздействия на ACE2.

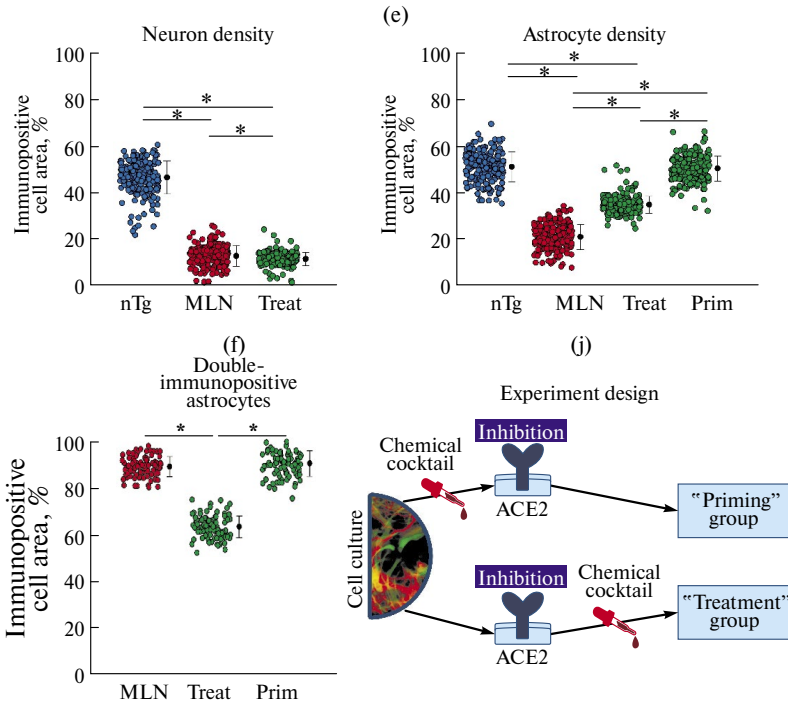


Рис. 2. Продолжение.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основные работы по перепрограммированию клеток успешно проводились другими исследователями на более простых моделях чистых астроцитарных культур [8]. В таких условиях наблюдается перепрограммирование астроцитов непосредственно в нейроны. В нашей работе был изучен эффект химического конверсионного коктейля в условиях сложной смешанной первичной культуры клеток гиппокампа, что позволяет исследовать клеточные взаимодействия в более сложной и физиологически релевантной среде по сравнению с монокультурами.

Различия в реакции на конверсионный коктейль между молодыми и старыми культурами, а также культурами трансгенных и нетрансгенных животных свидетельствуют о влиянии возраста и генетических модификаций на эффективность действия химического коктейля. В первую очередь мы отметили, что добавление коктейля приводило к гибели молодой первичной нейро-астроцитарной культуры. Такой результат может свидетельствовать о неспособности культур переносить факторы перепрограммирования в силу их стадии развития или, возможно, о наличии на определенных стадиях развития культуры клеточных компонентов, чувствительных к агентам, входящим в состав коктейля. Кроме того, одно из возможных объяснений заключается в том, что «здоровые» нейроны регулируют количество астроцитов. В молодой культуре, где нейроны еще активны и функционально полноценны, они могут посылать сигналы, которые сдерживают пролиферацию астроцитов и поддерживают гомеостаз клеточной среды. Это означает, что количество астроцитов в культуре ограничено и стабилизировано. Здоровые нейроны могут реагировать на изменение метаболических путей стрессорной реакцией, что приводит к нарушению их функции и к гибели. Это согласуется со способностью нейронов регулировать астроцитарный транскриптом и вызывать экспрессию молекул, связан-

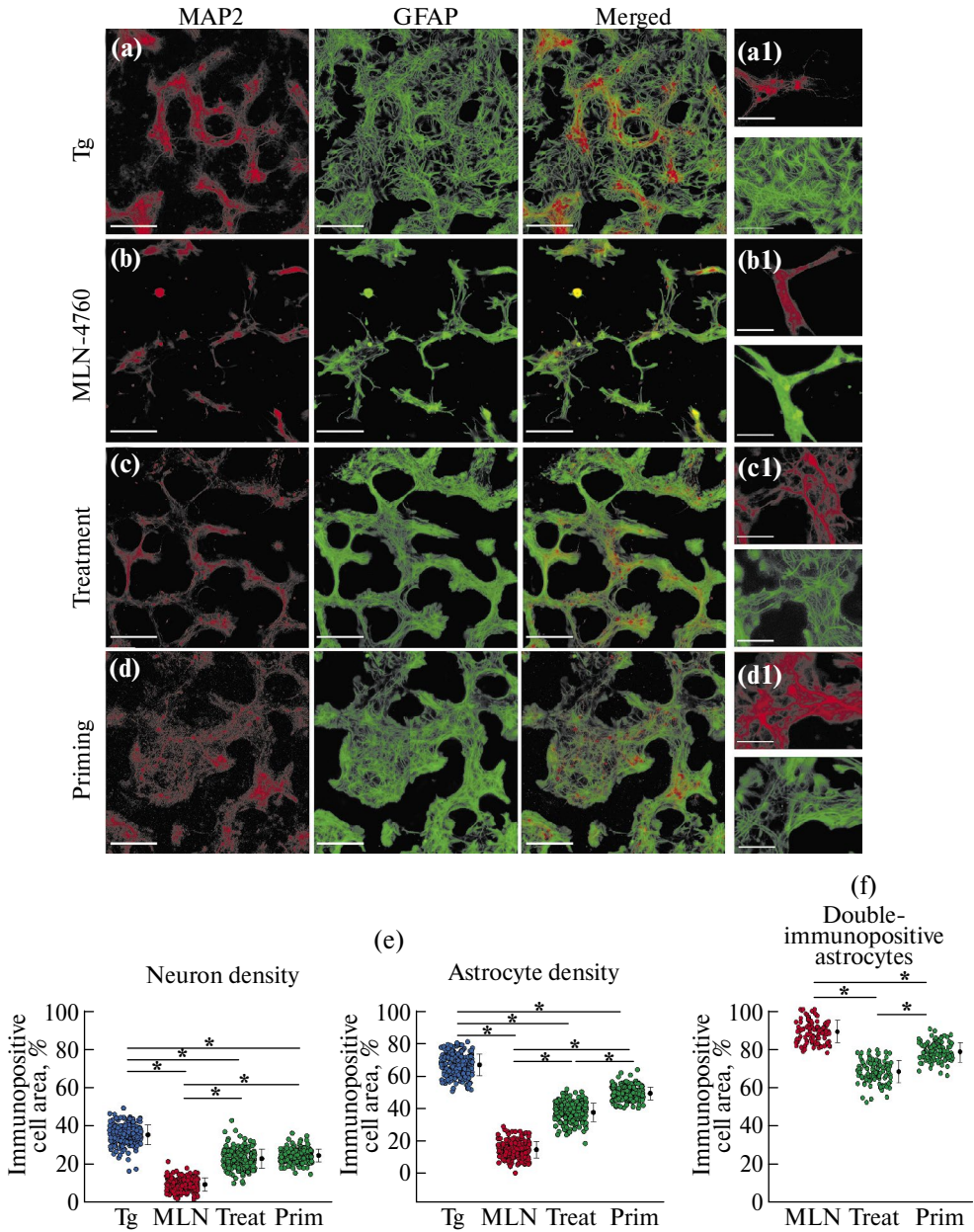


Рис. 3. Эффект химического конверсионного коктейля на первичные клеточные культуры гиппокампа трансгенных 5xFAD мышей при ингибировании ACE2.

Иммунопозитивность к маркеру астроцитов (GFAP – зеленый) и маркеру нейронов (MAP2 – красный). Масштаб – 250 мкм для рисунков группы а–d, масштаб 125 мкм для рисунков группы а1–d1. (а–а1) – Нативная первичная культура клеток гиппокампа трансгенных мышей (Tg). (b–b1) – Ингибирование ACE2 с помощью MLN-4760. (c–c1) – Введение конверсионного коктейля после ингибирования ACE2 (Treatment). (d–d1) – Введение конверсионного коктейля до ингибитора ACE2 (Priming). (e) – Нейрональная и астроцитарная плотности (%) в первичных культурах клеток гиппокампа трансгенных мышей. * – $p < 0.05$, односторонний ANOVA, пост-хок тест Данна. (f) – Площадь астроцитов (%), проявляющих двойную иммунопозитивность к маркерам GFAP/MAP2. * – $p < 0.001$, односторонний ANOVA, пост-хок тест Бонферрони.

ных с функциональным созреванием астроцитов [16]. Присутствие нейронов изменяет транскриптом астроцитов, формируя метаболическое взаимодействие между клетками в культуре. Сигналы, получаемые от нейронов, могут быть необходимы для постоянного поддержания астроцитарного фенотипа *in vivo* [17], и фактически связь между нейронами и глией является двунаправленной, формируя такое понятие как «функциональная нейроастроглиальная единица» [18]. Нейронная активность может вызывать изменения в уровнях глиального кальция, тогда как выделяемые астроцитами нейротрансмиттеры могут модулировать синаптическую передачу. Когда эта взаимосвязь ослабевает в случае преимущественной гибели нейронов, характерной для нейродегенеративных заболеваний и старения, происходит активация пролиферации глии и повышается ее восприимчивость к факторам конверсии, что также подтверждается данными об эффективной работе конверсионных коктейлей именно в астроцитарной монокультуре.

При действии химического конверсионного коктейля на старые первичные астро-нейрональные культуры было обнаружено, что культуры клеток, проходя свой естественный процесс старения, теряют нейроны и становятся более глиальными по своей структуре, а в случае культур трансгенных 5xFAD мышей дополнительно проявляется астроглиоз – разрастание астроглии при одновременной потере нейронов. Именно старые культуры из гиппокампа трансгенных животных продемонстрировали значительное увеличение плотности нейронов и одновременное уменьшение плотности астроцитов (рис. 1, а, с).

Подход к манипулированию ферментативной активностью ACE2 в клеточных культурах мышей 5xFAD (рис. 3) и клеточных культурах здоровых животных (рис. 2) с помощью специфического ингибитора MLN-4760 и последующей обработки химическим коктейлем дает интригующее представление о возможных клеточных механизмах, вовлеченных в патогенез БА. Хотя прямые взаимодействия между использованными в данной работе соединениями (SB431542, LDN193189, SHIR99021, DAPT) и активностью ACE2 не установлены и требуют дальнейших исследований, возможно, что Notch-сигнальный путь, модифицированный под действием химического коктейля, связан с регуляцией экспрессии ACE2 [19], поскольку ингибирование Notch-сигнализации с помощью DAPT может модулировать уровень ACE2 и влиять на связанные с активностью этого фермента физиологические или патофизиологические процессы в нейронах и астроцитах. Компоненты коктейля могут синергически снижать токсичность и воспаление, опосредованное их соответствующими путями, тем самым создавая благоприятную среду для выживания и функционирования нейронов. Влияние на сигнальные пути клеточного развития (в частности, SHIR99021 и DAPT) может изменять пластичность или приводить к сдвигам в фенотипе клеток, приводя к наблюдаемым морфологическим изменениям.

Так, различная реакция между культурами клеток гиппокампа, выделенных из трансгенных (5xFAD) и нетрансгенных животных (рис. 2, е, рис. 3, е), показывает, что одновременное сочетание генетических изменений и фармакологического воздействия приводит к довольно сложной, неоднозначной ответной реакции на уровне клеток. В действительности принципиальная разница между культурами клеток из мозга 5xFAD и нетрансгенных животных заключается в том, что в культуре нейронов 5xFAD мышей может постепенно накапливаться нейротоксичный β -амилоидный пептид (A β), вызывающий нейродегенерацию. Это, в свою очередь, может отражаться и на взаимодействии между клетками в культуре. Имеются данные о том, что нейронально-астроцитарная регуляция у 5xFAD мышей значительно отличается от здоровых животных [20]. Фенотипические изменения, подобные старению, демонстрируют астроциты вокруг бляшек A β и NFT в мозге пациентов с БА, а также у мышей – при моделировании этого заболевания [21]. Астроцитарные культуры, полученные от трансгенных животных, также демонстрируют нарушения метаболизма [22].

У мышей 5xFAD наличие амилоидопатии, обуславливающей каскад изменений в астро-нейрональной регуляции, может предрасполагать нейроны и астроциты к защитному и стабилизирующему влиянию коктейля (рис. 3). Так, мыши 5xFAD характеризуются

выраженной активацией в Notch 1-сигнальном пути [23], который ингибируется DAPT в составе конверсионного коктейля. Также в этой модели одним из трансгенов является ген, кодирующий пресенилин-1 (*PSEN1*), который играет центральную роль в процессе протеолиза белка-предшественника амилоидного пептида (APP) через γ -секретазный путь с образованием А β , что является ключевым моментом в патогенезе БА. DAPT – одно из веществ, входящее в состав конверсионного коктейля, блокирует активность пресенилина-1, тем самым предотвращая дальнейшее расщепление APP и образование А β , что может способствовать изменению чувствительности клеток к химической конверсии. В частности, применение конверсионного коктейля на старых культурах животных 5xFAD приводит к более выраженной клеточной конверсии (рис. 1, e-f) а применение коктейля при ингибировании ACE2 в культурах животных 5xFAD (рис. 3) восстанавливает астроцитарную и нейрональную плотность с одновременным восстановлением нормальной формы астроцитов и нейронов, тогда как в группах культур нетрансгенных животных культура оставалась преимущественно глиальной (рис. 2, c-e). Это может указывать на то, что в здоровой клеточной среде, где отсутствуют патологические стрессоры, сигнальные изменения, индуцированные коктейлем, подталкивают клетки к глиальному фенотипу (рис. 2, a, c, d). Клетки нетрансгенных животных, лишённые патологических факторов, могут реагировать на те же химические стимулы, принимая более пластичное, менее дифференцированное состояние, что может приводить к непреднамеренному побочному эффекту широкой сигнальной модуляции.

Различные эффекты конверсионного коктейля без и при ингибировании ACE2 подчеркивают важность контекстно-зависимых терапевтических стратегий при лечении как БА, так и ковидной инфекции. То, что приносит пользу видоизменённым больным клеткам, может не быть универсально полезным для клеток всего организма.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Р. А. П. и Н. В. Б.), работа на клеточных культурах (А. В. Ч. и Д. Ю. Ж.), обработка данных (А. В. Ч.), написание и редактирование манускрипта (А. В. Ч., Д. Ю. Ж., Р. А. П. и Н. В. Б.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-00465.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биобезопасности и биоэтике Института биофизики клетки РАН (идентификатор: № 6/062020 от 12.06.2020).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee C, Robinson M, Willerth S (2018) Direct Reprogramming of Glioblastoma Cells into Neurons Using Small Molecules. ACS Chem Neurosci 9. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00365>
2. Ma Y, Xie H, Du X, Wang L, Jin X, Zhang Q, Han Y, Sun S, Wang L, Li X, Zhang C, Wang M, Li C, Xu J, Huang Z, Wang X, Zhen C, Deng H (2021) In vivo chemical reprogramming of astrocytes into neurons. Cell Discov 7: 12. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00243-8>

3. *Liu M-L, Zang T, Zou Y, Chang JC, Gibson JR, Huber KM, Zhang C-L* (2013) Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat Commun* 4: 2183.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3183>
4. *Berninger B, Costa MR, Koch U, Schroeder T, Sutor B, Grothe B, Götz M* (2007) Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. *J Neurosci* 27: 8654–8664.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1615-07.2007>
5. *Liu F, Zhang Y, Chen F, Yuan J, Li S, Han S, Lu D, Geng J, Rao Z, Sun L, Xu J, Shi Y, Wang X, Liu Y* (2021) Neurog2 directly converts astrocytes into functional neurons in midbrain and spinal cord. *Cell Death Dis* 12: 225.
<https://doi.org/10.1038/s41419-021-03498-x>
6. *Heinrich C, Blum R, Gascón S, Masserdotti G, Tripathi P, Sánchez R, Tiedt S, Schroeder T, Götz M, Berninger B* (2010) Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol* 8: e1000373.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000373>
7. *Yin J-C, Zhang L, Ma N-X, Wang Y, Lee G, Hou X-Y, Lei Z-F, Zhang F-Y, Dong F-P, Wu G-Y, Chen G* (2019) Chemical Conversion of Human Fetal Astrocytes into Neurons through Modulation of Multiple Signaling Pathways. *Stem Cell Rep* 12: 488–501.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.01.003>
8. *Cheng L, Gao L, Guan W, Mao J, Hu W, Qiu B, Zhao J, Yu Y, Pei G* (2015) Direct conversion of astrocytes into neuronal cells by drug cocktail. *Cell Res* 25: 1269–1272.
9. *Tan Z, Qin S, Yuan Y, Hu X, Huang X, Liu H, Pu Y, He C, Su Z* (2022) NOTCH1 signaling regulates the latent neurogenic program in adult reactive astrocytes after spinal cord injury. *Theranostics* 12: 4548–4563.
<https://doi.org/10.7150/thno.71378>
10. *Kim YT, Hur E-M, Snider WD, Zhou F-Q* (2011) Role of GSK3 Signaling in Neuronal Morphogenesis. *Front Mol Neurosci* 4: 48.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00048>
11. *Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S* (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181: 271–280.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.CELL.2020.02.052>
12. *Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS* (2020) Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensiv Care Med* 46: 586–590.
<https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>
13. *Gendron L, Payet M, Gallo-Payet N* (2004) The angiotensin type 2 receptor of angiotensin II and neuronal differentiation: from observations to mechanisms. *J Mol Endocrinol* 31: 359–372.
14. *Ye M, Wysocki J, Gonzalez-Pacheco FR, Salem M, Eyora K, Garcia-Halpin L, Poglitsch M, Schuster M, Battle D* (2012) Murine recombinant angiotensin-converting enzyme 2: effect on angiotensin II-dependent hypertension and distinctive angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor characteristics on rodent and human angiotensin-converting enzyme 2. *Hypertension* 60: 730–740.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198622>
15. *Papasozomenos SC, Binder LI* (1986) Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is present in astrocytes of the optic nerve but absent from astrocytes of the optic tract. *J Neurosci* 6: 1748–1756.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-06-01748.1986>
16. *Farhy-Tselnicker I, Boisvert MM, Liu H, Dowling C, Erikson GA, Blanco-Suarez E, Farhy C, Shokhirev MN, Ecker JR, Allen NJ* (2021) Activity-dependent modulation of synapse-regulating genes in astrocytes. *Elife* 10.
<https://doi.org/10.7554/eLife.70514>
17. *Hasel P, Dando O, Jiwaji Z, Baxter P, Todd AC, Heron S, Márkus NM, McQueen J, Hampton DW, Torvell M, Tiwari SS, McKay S, Eraso-Pichot A, Zorzano A, Masgrau R, Galea E, Chandran S, Wylie DJA, Simpson TI, Hardingham GE* (2017) Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism. *Nat Commun* 8: 15132.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15132>
18. *Haydon PG* (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2: 185–193.
<https://doi.org/10.1038/35058528>
19. *Baindara P, Sarker MB, Earhart AP, Mandal SM, Schrum AG* (2022) NOTCH signaling in COVID-19: a central hub controlling genes, proteins, and cells that mediate SARS-CoV-2 entry,

- the inflammatory response, and lung regeneration. *Front Cell Infect Microbiol* 12: 928704. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.928704>
20. Choi M, Lee S-M, Kim D, Im H-I, Kim H-S, Jeong YH (2021) Disruption of the astrocyte-neuron interaction is responsible for the impairments in learning and memory in 5xFAD mice: an Alzheimer's disease animal model. *Mol Brain* 14: 111. <https://doi.org/10.1186/s13041-021-00823-5>
 21. Han X, Zhang T, Liu H, Mi Y, Gou X (2020) Astrocyte Senescence and Alzheimer's Disease: A Review. *Front Aging Neurosci* 12: 148. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00148>
 22. Van Gijssel-Bonnello M, Baranger K, Benech P, Rivera S, Khrestchatisky M, de Reggi M, Gharib B (2017) Metabolic changes and inflammation in cultured astrocytes from the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease: Alleviation by pantethine. *PLoS One* 12: e0175369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175369>
 23. Neff RA, Wang M, Vatanserver S, Guo L, Ming C, Wang Q, Wang E, Horgusluoglu-Moloch E, Song W-M, Li A, Castranio EL, Tew J, Ho L, Goate A, Fossati V, Noggle S, Gandy S, Ehrlich ME, Katsel P, Schadt E, Cai D, Brennand KJ, Haroutunian V, Zhang B (2021) Molecular subtyping of Alzheimer's disease using RNA sequencing data reveals novel mechanisms and targets. *Sci Adv* 7. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb5398>

Effect of Conversion Cocktail on Astrocyte and Neuronal Status in the Primary Hippocampal Culture of 5xFAD Mice with Angiotensin-Converting Enzyme 2 Inhibition

A. V. Chaplygina^{a,*}, D. Y. Zhdanova^a, R. A. Poltavtseva^b, and N. V. Bobkova^a

^a Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

^b Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

*e-mail: shadowhao@yandex.ru

Neurodegenerative diseases are intricate pathological conditions characterized by the progressive degeneration and death of neurons in the nervous system. Consequently, researchers are increasingly focusing on strategies that utilize combinations of bioactive chemical compounds to convert other, more stable cell types into functional neurons. Chemical conversion has shown promise, particularly in models consisting solely of astrocytes; however, more realistic experimental systems include various cell types whose interactions may influence the response to chemical conversion. In this study, we investigated the impact of a multicomponent chemical cocktail on cells in mixed astro-neuronal cultures derived from the hippocampus of transgenic mice from the 5xFAD line, a genetic model of Alzheimer's disease (AD). Additionally, we recreated a model that simulates the reduction in ACE2 receptor activity observed in COVID-19 patients, which occurs due to internalization of the receptor after it binds to the coronavirus in order to study the consequences of chemical conversion upon disruption of this enzyme activity in the brain. Our findings indicate that the increase in neuronal density and the emergence of new neurons following exposure to the conversion cocktail in complex multicomponent cell systems become apparent only at later time points in cultures derived from non-transgenic animals, as well as in cultures from the 5xFAD mouse line. This may be attributed to the natural rise in astroglial levels during culture degradation. Notably, ACE2 inhibition significantly impacts the morphology of individual astrocytes and neurons. When we assessed the effects of the chemical cocktail, we observed that its efficacy was influenced by both the transgenic status of the culture and the timing of the conversion cocktail administration in relation to ACE2 inhibition. Cultures derived from transgenic animals exhibited higher susceptibility to both the ACE2 inhibitor and the chemical conversion agents.

Keywords: Alzheimer's disease, 5xFAD, angiotensin-converting enzyme 2, chemical conversion cocktails