

УДК 576.5:612.827

DOI: 10.7868/S3034606126010024

**ВЛИЯНИЕ РЕАКТИВНОГО АСТРОГЛИОЗА,
ВЫЗВАННОГО ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИЕЙ,
НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И НЕЙРОГЕНЕЗ В МОЗЖЕЧКЕ МЫШИ**
**О. С. Белозор¹, Е. С. Гринёв^{2, 3}, Е. Д. Хилажева¹, Е. А. Тепляшина¹, Н. В. Писарева¹,
А. Н. Шуваев², А. Н. Шуваев^{1, *}**

¹ Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022, Российская Федерация

² Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск, Российская Федерация

³ Образовательный центр «Сириус», федеральная территория «Сириус», 354340, Российская Федерация

* E-mail: shuvaevan@krasgmu.ru

Аннотация. Обоснование и цель. Реактивный астроглиоз является ключевым компонентом микроокружения при нейродегенеративных заболеваниях, однако его специфическая роль в регуляции пула стволовых клеток и нейрогенеза остается не до конца изученной. Цель работы — изучить влияние (последствия) направленной хронической активации астроцитов *in vivo* и *in vitro* на динамику пролиферации и нейрогенез клеток-предшественников. **Материал и методика.** Для избирательной активации астроцитов использовали оптогенетические подходы. Эксперименты *in vivo*: у мышей с селективной экспрессией аденовирусного вектора (AVV) GFAP-mKate-ChR2 хронически фотостимулировали мозжечок. Эксперименты *in vitro*: из мозжечка мыши выделяли нейросферы, инфицировали их AVV GFAP-mKate-ChR2 и тоже подвергали хронической фотостимуляции с последующей дифференцировкой. Клеточный ответ оценивали с помощью иммуофлуоресцентного анализа маркеров пролиферации (Ki67) и нейрональной дифференцировки (даблкортина, DCX). **Результаты.** Хроническая оптогенетическая стимуляция астроцитов *in vivo* привела к значительному уменьшению количества DCX-позитивных клеток в молекулярном слое мозжечка, в то время как количество Ki67-позитивных клеток существенно не изменилось. Напротив, в модели *in vitro* фотостимуляция индуцировала увеличение пролиферации (Ki67) в нейросферах без значительного влияния на долю DCX-позитивных клеток после дифференцировки. Результаты демонстрируют, что хроническая активация астроцитов *in vivo* создаёт токсическое микроокружение, которое избирательно ингибирует нейрональную дифференцировку клеток-предшественников, не влияя на их пролиферативный потенциал. Различие между результатами на моделях *in vivo* и *in vitro* подчёркивает критическую роль микросреды, опосредованной реактивным астроглиозом, в дисрегуляции нейрогенеза. **Заключение.** Данные предполагают, что стратегии, направленные на модуляцию активности астроцитов, а не просто на стимуляцию пролиферации, могут быть перспективными для восстановления регенеративного потенциала мозжечка при нейродегенеративных состояниях.

Ключевые слова: нейрогенез, астроглиоз, нейродегенерация мозжечка

Принятые сокращения: ГБ — глия Бергмана; ChR2 — каналродопсин 2; DCX — даблкортин (doublecortin), маркер незрелых нейронов, GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок, Ki67 — маркер клеточной пролиферации.

Благодарности. Авторы выражают благодарность С. А. Каспарову и А. А. Васильеву за моделирование и разработку аденовирусного вектора (AVV) на базе Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта (Калининград, Россия) и ЦКП Красноярского государственного медицинского университета (Красноярск, Россия) за использование их оборудования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда и Красноярского краевого фонда науки (проект № 25-15-20029).

Соблюдение этических стандартов. Все процедуры, связанные с содержанием и экспериментами на животных, проводили в соответствии с международными этическими нормами и были одобрены локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (протокол № 2 от 11.02.2025).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ссылка для цитирования: Белозор О. С., Гринёв Е. С., Хилажева Е. Д., Тепляшина Е. А., Писарева Н. В., Шуваев А. Н., Шуваев А. Н. Влияние реактивного астроглиоза, вызванного оптогенетической стимуляцией, на пролиферацию и нейрогенез в мозжечке мыши. Цитология / Cell and Tissue Biology. 2026, том 68, № 1, с. 28. doi: 10.7868/S3034606126010024

Поступила в редакцию 11.09.2025

После доработки 08.10.2025

Принята к публикации 10.10.2025

DOI: 10.7868/S3034606126010024

Effect of Reactive Astrogliosis Induced by Optogenetic Stimulation on Proliferation and Neurogenesis in the Mouse Cerebellum

O. S. Belozor^a, E. S. Grinev^{b, c}, E. D. Khilazheva^a, E. A. Teplyashina^a, N. V. Pisareva^a,
A. N. Shuvaev^b, A. N. Shuvaev^{a, *}

^a Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

^b Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041, Russian Federation

^c “Sirius” Educational Center, Federal Territory “Sirius”, 354340, Russian Federation

* E-mail: shuvaevan@krasgmu.ru

Abstract. Objective: Reactive astrogliosis is a key component of the microenvironment in neurodegenerative diseases, but its specific role in the regulation of the stem cell pool and neurogenesis remains incompletely understood. The aim of this study was to investigate the effects of targeted chronic activation of astrocytes *in vivo* and *in vitro* on the dynamics of progenitor cell proliferation and neurogenesis. **Methods:** Optogenetic approaches were used for selective activation of astrocytes. *In vivo*, mice with selective expression of AVV GFAP-mKate-ChR2 underwent chronic photostimulation of the cerebellum. *In vitro*, neurospheres were isolated from the mouse cerebellum, infected with AVV GFAP-mKate-ChR2, and also subjected to chronic photostimulation followed by differentiation. Cellular responses were assessed by immunofluorescence analysis of proliferation (Ki67) and neuronal differentiation markers (doublecortin, DCX). **Results:** Chronic optogenetic stimulation of astrocytes *in vivo* resulted in a significant decrease in the number of DCX-positive cells in the cerebellar molecular layer, while the number of Ki67-positive cells did not change significantly. In contrast, in the *in vitro* model, photostimulation induced an increase in proliferation (Ki67) in neurospheres without a significant effect on the proportion of DCX-positive cells after differentiation. Our results demonstrate that chronic astrocyte activation *in vivo* creates a toxic microenvironment that selectively inhibits neuronal differentiation of progenitor cells without affecting their proliferative potential. The difference in results between *in vivo* and *in vitro* models highlights the critical role of the reactive astrogliosis-mediated microenvironment in dysregulating neurogenesis. **Conclusions:** These data suggest that strategies aimed at modulating astrocyte activity, rather than simply stimulating proliferation, may be promising for restoring the regenerative potential of the cerebellum in neurodegenerative conditions.

Keywords: neurogenesis, astrogliosis, cerebellar neurodegeneration

Acknowledgments. The authors express their gratitude to S.A. Kasparov and A.A. Vasiliev for modeling and production of the adenoviral vector (AVV) at the Immanuel Kant Baltic Federal University (Kaliningrad, Russia) and the Common Use Center of the Krasnoyarsk State Medical University (Krasnoyarsk, Russia) for the use of their equipment.

Funding. This work was supported by the Russian Scientific Foundation and Krasnoyarsk Regional Science Foundation (projects ID: 25-15-20029).

Ethics approval and consent to participate. All procedures related to the maintenance and experiments on animals were carried out in accordance with international ethical standards and were approved by the local Ethics Committee of the Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Krasnoyarsk, Russia, protocol no. 2 dated February 11, 2025).

Conflict of interest. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

For citation: Belozor O. S., Grinev E. S., Khilazheva E. D., Teplyashina E. A., Pisareva N. V., Shuvaev A. N., Shuvaev A. N. Effect of reactive astrogliosis induced by optogenetic stimulation on proliferation and neurogenesis in the mouse cerebellum. *Tsitologiya / Cell and Tiss. Biol.*, 2026, vol. 68, no. 1, p. 28. doi: 10.7868/S3034606126010024

Received September 16, 2025

Revised October 08, 2025

Accepted October 10, 2025

Мозжечок, известный своей ролью в моторном контроле, еще и вносит вклад в когнитивные и эмоциональные функции (Baumann, Mattingley, 2022). Его сложная клеточная архитектура высоко уязвима в случае нейродегенеративных процессов. В ответ на повреждение резидентные клетки-предшественники в мозжечке, в основном локализованные в белом веществе, демонстрируют ограниченную способность к пролиферации и нейрогенезу, потенциально давая начало новым интернейронам (Leto et al., 2016). Однако при хронических патологиях этот компенсаторный механизм зачастую оказывается недостаточно эффективным.

Ключевым фактором, определяющим судьбу клеток-предшественников, является их микроокружение, или ниша (Llorente et al., 2022). Центральным элементом этой ниши являются астроциты (Luo et al., 2017; Schneider et al., 2019). В норме они обеспечивают поддержку трофики и гомеостаза. Однако при активации в ответ на патологические воздействия — процесс, известный как реактивный астроглиоз, — астроциты претерпевают значительные фенотипические изменения, включая изменение экспрессии ключевых белков, высвобождение провоспалительных медиаторов и нарушение их компенсационных функций (Li et al., 2019). Эти изменения существенно влияют на микроокружение клеток-предшественников и могут оказывать как защитное, так и патогенное воздействие на нейрональную пластичность и регенерацию (Meeuwsen et al., 2003; Sofroniew, 2009; Niranjana, 2014).

Традиционные методы изучения реактивного астроглиоза часто заключаются в неспецифическом повреждении, что затрудняет различение причинно-следственных связей (Allahyari et al., 2015). Чтобы преодолеть это ограничение, мы использовали оптогенетические подходы для направленной и хронической активации именно популяции GFAP-позитивных клеток (астроцитов и потенциально некоторых клеток-предшественников) в мозжечке мыши (Шуваев, 2021; Shuvaev, 2021). Это позволило нам смоделировать один ключевой этап нейродегенеративной среды — хронически активные астроциты — и изучить его непосредственное влияние на два критических процесса: пролиферацию клеток-предшественников (оцениваемую по маркеру Ki67) и их последующую дифференцировку в нейроны (оцениваемую по маркеру незрелых нейронов даблкортину, DCX).

В настоящей работе мы сравнили две модели селективного астроглиоза мозжечка, созданного посредством оптогенетической стимуляции, *in vivo* и *in vitro*, чтобы выяснить, является ли потенциальное негативное влияние активированных астроцитов на нейрогенез результатом клеточно-автономных изменений в самих клетках-предшественниках, или же оно опосредовано паракринными сигналами от реактивных астроцитов в сложной тканевой среде.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. В исследовании использовали мышей линии CD1 в возрасте 8—10 недель. Животных содержали в виварии в стандартных условиях с 12-часовым световым циклом при свободном доступе к воде и пище.

Оптогенетическая стимуляция астроцитов *in vivo*. Для селективной экспрессии каналродопсина-2 (ChR2) в астроцитах в кору червя мозжечка мышей стереотаксически вводили 10 мкл аденовирусного вектора (AVV) GFAP-mKate-ChR2 (3.7×10^7 ед./мл) (Gourine et al., 2010; Figueiredo et al., 2014) и имплантировали канюлю для подсоединения оптоволокон. Данный вектор содержит промотор GFAP для селективной экспрессии в астроцитах, последовательность, кодирующую красный флуоресцентный белок mKate, а также последовательность, кодирующую светочувствительный белок каналродопсин 2-го типа (ChR2).

После послеоперационного восстановления подсоединяли оптород и проводили стимуляцию зараженной области (импульсами голубого света (490 нм) по 20 мс с интервалами в 20 мс) (Intelligent Optogenetic System, RWD, Китай). Такая стимуляция длилась на протяжении 4 сут циклами: 60 с стимуляция — 60 с интервал. Контрольная группа животных ChR2 (hv-) имела имплантированное оптоволоконно, но ее не подвергали стимуляции.

Получение и культивирование нейросфер. Животных декапитировали, мозжечок выделяли на льду в стерильных условиях и механически диссоциировали в холодном солевом растворе Хэнкса. Клеточную суспензию центрифугировали при 200 g в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в среде NeuroCul NS-A Proliferation, дополненной эпидермальным фактором роста (EGF, 20 нг/мл), базовым фактором роста фибробластов (bFGF, 10 нг/мл) и гепарином (2 мкг/мл) (все от StemCell, США). Полученные клетки в количестве 1.5×10^6 засеивали в культуральные флаконы T-75 см² в 25 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation и культивировали при 37 °C и 5 % CO₂.

Дифференцировка нейросфер. Для индукции дифференцировки нейросферы собирали, центрифугировали при 200 g в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco, США), 2 мМ глутамина («ПанЭко», Россия), пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», Россия). Стерильной серологической пипеткой объемом 5 мл проводили механическую диссоциацию нейросфер, полученную суспензию клеток засеивали в чашки Петри 35 мм со стеклянным дном (Greiner Bio-One, Австрия) по 1×10^5 клеток на чашку.

Оптогенетическая стимуляция культуры клеток. Для оптогенетической стимуляции *in vitro* дифференцирующиеся клетки трансдуцировали аденовирусным вектором AVV GFAP-mKate-ChR2 через 3 сут после посадки. Через 10 сут клетки подвергали хронической фотостимуляции с частотой, описанной выше, в течение

последующих 4 сут. Контрольная группа клеток ChR2 (hv-) экспрессировала ChR2, но ее не подвергали фотостимуляции.

Иммуноцитохимический анализ (ИЦХ). Клетки фиксировали в 4%-ном параформальдегиде и оценивали экспрессию GFAP, DCX и Ki67 методом двойного непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания. Инкубацию с первичными антителами в разведении 1:200 проводили в течение ночи при 4 °С. Были использованы антитела к GFAP (ARG52313; Arigo Biolaboratories, Тайвань), Ki67 (ab15580; Abcam, США) и DCX (sc-8066; SantaCruz Biotechnology, США). После двукратной отмывки клетки инкубировали в течение 1 ч при 37 °С с вторичными антителами AlexaFluor 488 (ab150077; Abcam, США) AlexaFluor 647 (ab150175; Abcam, США) и AlexaFluor 647 (A21447; Thermo Fisher Scientific, США). Ядра контрастировали DAPI (1 мкг/мл). Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 10i, Япония). Подсчет позитивных клеток проводили слепым методом не менее чем в пяти полях зрения.

Иммуногистохимический анализ. Мышам транкардиально вводили 4%-ный раствор параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере после внутрибрюшинной анестезии золотилом (50 мг/кг) (Virbac, Carfos, Франция). Мозг извлекали и фиксировали в том же растворе в течение ночи. Червь мозжечка нарезают на сагиттальные срезы толщиной 50 мкм с помощью микротомы (Thermo Scientific Microm HM 650, США). Срезы инкубировали с первичными кроличьими моноклональными антителами (теми же, что и при ИЦХ) против GFAP, Ki67 и DCX в течение ночи при 4 °С. Антитела растворяли в растворе PBS, содержащем 2% нормальной ослиной сыворотки, 0.1% Тритона X-100 и 0.05% NaN₃. После инкубации с первичными антителами срезы промывали в PBS, инкубировали со вторичными антителами AlexaFluor 488 (A11034; Thermo Fisher Scientific, США), AlexaFluor 647 (ab150171; Abcam, США), AlexaFluor 647 (A21244; Thermo Fisher Scientific, США) в течение 2 ч при комнатной температуре, затем промывали в PBS. Наносили монтирующую жидкость, накрывали срез покровным стеклом. Для сравнения были получены конфокальные флуоресцентные изображения срезов мозжечка из соответствующей области с помощью микроскопа FV10i (Olympus, Япония). Изображения записывали с использованием объектива с увеличением 10× и размером изображения 1024 × 1024 пикселей. Микрофотографии, преобразованные в чёрно-белые изображения, анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ.

Статистический анализ. Все данные представлены как среднее значение и его стандартная ошибка (SEM). Анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0. Для сравнения групп использовали непарный *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние хронической оптогенетической стимуляции астроцитов на морфологию клеток. Как мы показали ранее, хроническая фотостимуляция астроцитов коры мозжечка — глии Бергмана (ГБ), экспрессирующей ChR2-mKate, приводит к изменениям, характерным для астроглиоза. В результате хронической фотостимуляции наблюдается значительное увеличение количества и толщины отростков ГБ, при этом уменьшается их длина, они становятся извитыми (Shuvaev et al., 2021). Репрезентативные фотографии представлены на рис. 1а.

Хроническая фотостимуляция астроцитов, экспрессирующих ChR2, тоже оказала влияние на их морфологию *in vitro* (рис. 1б). Число клеток без отростков в группе со стимуляцией [ChR2 (hv+)] было значительно меньше по сравнению с контрольной группой [ChR2 (hv-)] (10.0 ± 1.1 и 15.9 ± 1.9 соответственно; $P < 0.05$; рис. 1в, г). Площадь области без отростков значительно уменьшилась в группе ChR2 (hv+) по сравнению с контролем ($10\,555.9 \pm 1\,210.3$ мкм² и $16\,331.2 \pm 2\,335.7$ мкм² соответственно; $P < 0.05$), что свидетельствует о выраженном изменении морфологии астроцитов под влиянием хронической активации (рис. 1в, д).

Изменения морфологии и активности астроцитов влияют на микроокружение клеток-предшественников и могут оказывать как защитное, так и патогенное воздействие на нейрональную пластичность и регенерацию.

Влияние активированных астроцитов на нейрогенез в мозжечке. Пролиферативную активность оценивали по маркеру Ki67. Анализ количества клеток, позитивных по маркеру пролиферации Ki67, выявил зависимость эффекта от модели. В срезах мозжечка *in vivo* хроническая оптогенетическая стимуляция не вызывала значимых изменений количества Ki67⁺-клеток по сравнению с контрольной (не стимулированной) группой (26.5 ± 2.9 и 25.6 ± 2.3 соответственно; $P > 0.05$; рис. 2а, б). Напротив, в культуре доля Ki67⁺-клеток после хронической фотостимуляции была значительно увеличена по сравнению с контрольной группой (95.6 ± 0.5 и $90.8 \pm 1.4\%$ от общего числа клеток; $P > 0.05$; рис. 2в, г).

Наиболее выраженные изменения были зафиксированы при оценке нейрогенеза по маркеру незрелых нейронов DCX. В срезах мозжечка *in vivo* хроническая фотостимуляция астроцитов привела к снижению количества DCX-позитивных клеток по сравнению с контрольной группой (30.1 ± 3.1 и 38.6 ± 2.0 соответственно; $P < 0.05$; рис. 3а, б). Это указывает на подавление процессов нейрональной дифференцировки в условиях реактивного астроглиоза. В культуре клеток, однако, доли DCX⁺-клеток после дифференцировки нейросфер значимо не различались в экспериментальной и контрольной группах (89.4 ± 2.0 и $91.7 \pm 2.0\%$ от общего количества клеток соответственно; $P > 0.05$; рис. 3в, г).

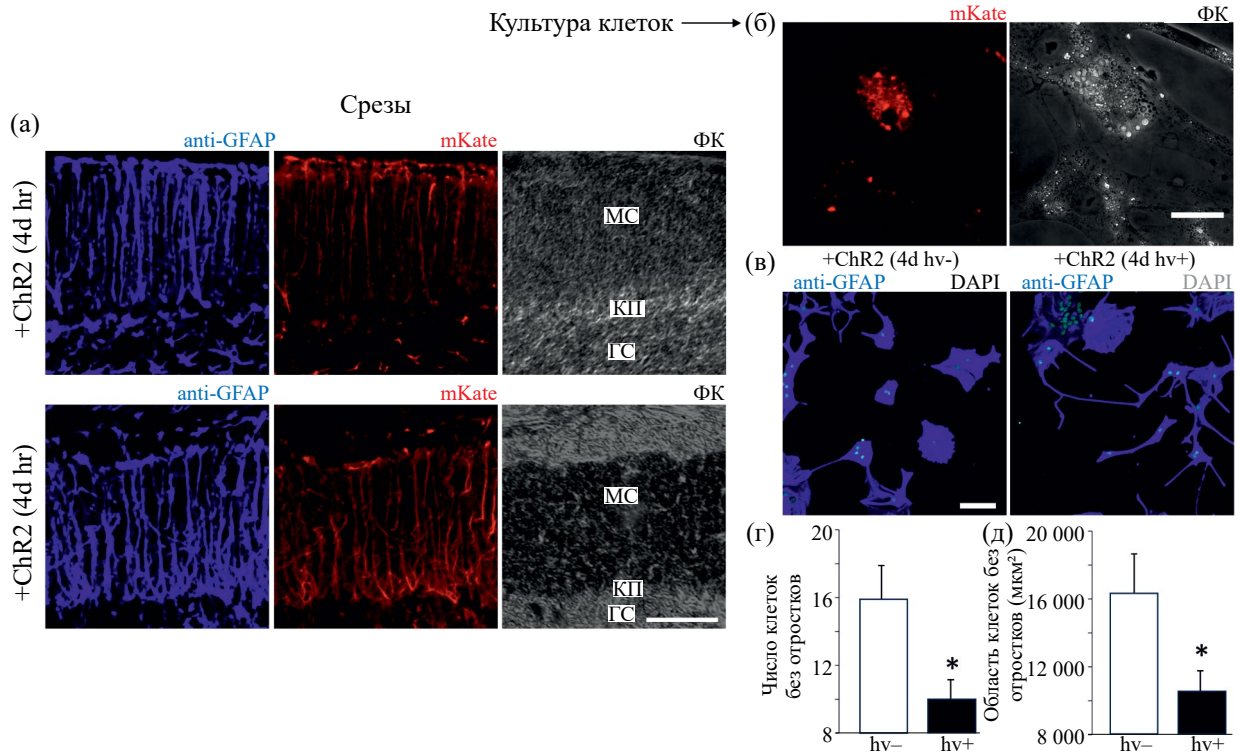
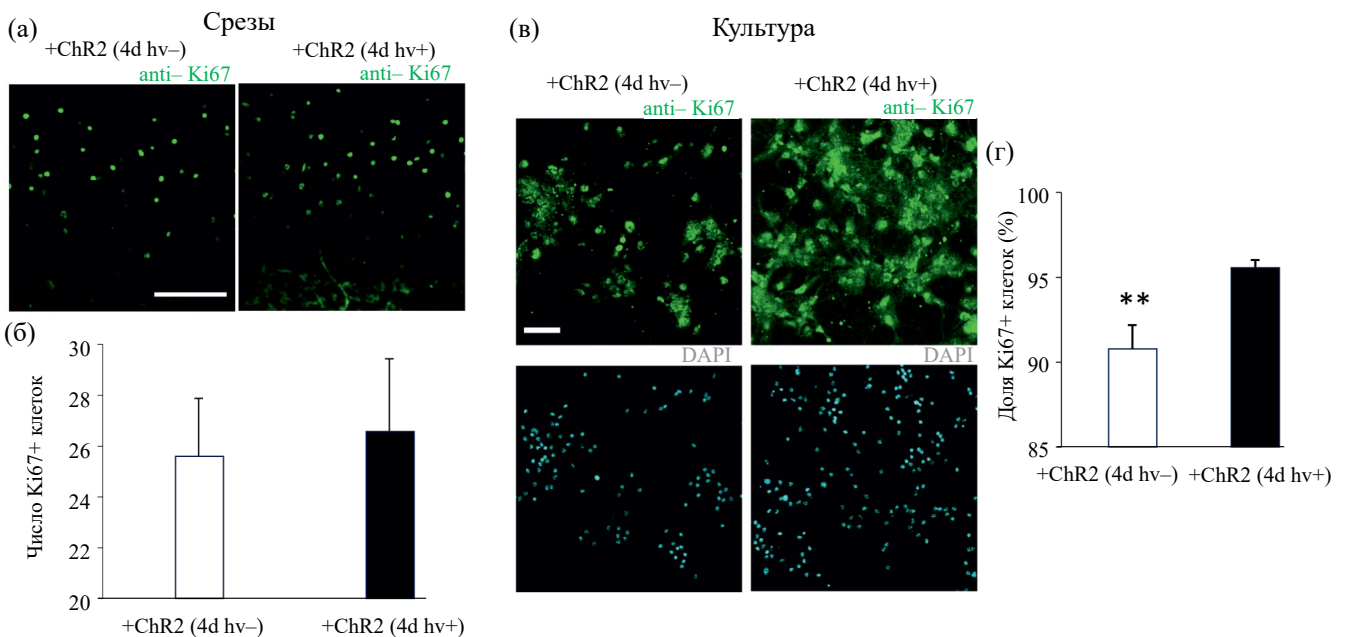


Рис. 1. Влияние хронической оптогенетической стимуляции на морфологию GFAP-позитивных клеток в коре мозжечка мыши (а) и в культуре (б). а — Срезы мозжечка мыши — глия Бергмана (ГБ), экспрессирующая ChR2, меченная anti-GFAP (синий цвет) и mKate (красный цвет) в контрольной группе без стимуляции [ChR2 (hv-)] и после 4-суточной фотостимуляции [ChR2 (hv+)]. На фазово-контрастном изображении (ФК) показано расположение молекулярного слоя (МС), клеток Пуркинью (КП) и гранулярного слоя (ГС); б, в — клетки в культуре, экспрессирующие ChR2, меченные на mKate (красный цвет; подтверждает экспрессию ChR2) и anti-GFAP (синий цвет) соответственно; ядра окрашены DAPI; г, д — число клеток в культуре (г) и площадь области клеток без отростков (д), экспрессирующих ChR2 (hv-) (белые столбики) и ChR2 (hv+) (черные столбики). Показаны средние значения и их ошибки, различия достоверны при $P \leq 0.05$ (*). а–в — Конфокальная микроскопия, масштабный отрезок: 100 (а), 10 (б) и 50 (в) мкм



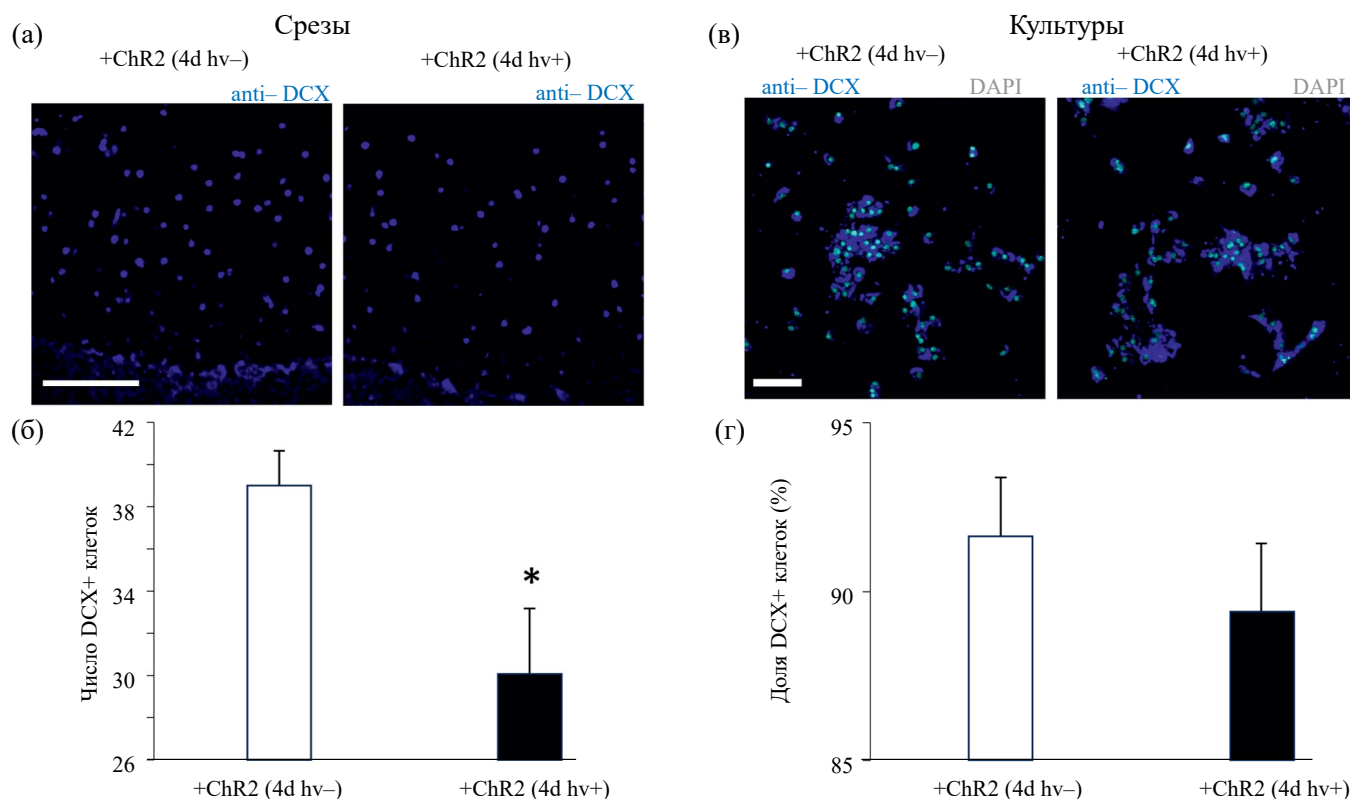


Рис. 3. Влияние хронической оптогенетической стимуляции астроцитов на нейрональную дифференцировку мозжечка. *a* — Флуоресценция меченых антител к маркеру DCX в коре мозжечка, экспрессирующей ChR2 в группах ChR2 (hv-) и ChR2 (hv+). *б* — Число DCX-позитивных клеток в срезах мозжечка у животных контрольной группы ChR2 (hv-) (белые столбики) и после 4-суточной фотостимуляции [ChR2 (hv+)] (черные столбики); показаны средние значения и их ошибки, различия достоверны при $P \leq 0.05$ (*). *в* — Флуоресценция меченых антител к DCX. Ядра окрашены DAPI. *г* — Доля DCX-позитивных клеток в культуре, экспрессирующих ChR2, после дифференцировки; белые столбики — контрольная группа ChR2 (hv-), черные столбики — группа ChR2 (hv+). Достоверных различий нет ($P > 0.05$). *a, в* — Конфокальная микроскопия, масштабный отрезок: 100 мкм

Для оценки непосредственного перехода клеток-предшественников от пролиферации к нейрогенезу был проведен анализ ко-локализации Ki67 и DCX. В срезах мозжечка наблюдали значимое уменьшение количества двойных позитивных клеток (Ki67⁺/DCX⁺) в группе с хронической стимуляцией астроцитов [ChR2 (hv+)] по сравнению с контролем [ChR2 (hv-)] (5.9 ± 1.4 и 23.5 ± 1.9

соответственно; $P < 0.01$; рис. 4*a–в*). Это демонстрирует разрыв между пролиферацией и последующей дифференцировкой *in vivo*. В культуре клеток доля двойных позитивных клеток (Ki67⁺/DCX⁺) в группе ChR2 (hv+) не отличалась от контрольных значений (91.6 ± 1.6 и $91.4 \pm 3.2\%$ от общего количества клеток соответственно; $P > 0.05$; рис. 4*г–е*).

Рис. 2. Изменение пролиферативной активности клеток в срезах коры мозжечка мыши (*a*) и клеток в культуре (*б*) после хронической оптогенетической стимуляции астроцитов в течение 4 сут. *a* — Конфокальные изображения коры мозжечка мышей, экспрессирующей ChR2, в контроле ChR2 (hv-) и после фотостимуляции ChR2 (hv+), меченной anti-Ki67. *б* — Число Ki67-позитивных клеток в срезах мозжечка у животных групп ChR2 (hv-) (белые столбики) и ChR2 (hv+) (черные столбики). Показаны средние значения и их ошибки, достоверных различий между группами не выявлено ($P > 0.05$). *в* — Флуоресценция меченых антител к Ki67 в клетках культуры, экспрессирующих ChR2 (верхний ряд); ядра окрашены DAPI (нижний ряд). *г* — Доля Ki67-позитивных клеток в культуре, полученных от животных групп ChR2 (hv-) (белые столбики) и ChR2 (hv+) (черные столбики); показаны средние значения и их ошибки, различия достоверны при $P \leq 0.01$ (**). *a, в* — Конфокальная микроскопия, масштабный отрезок: 100 мкм

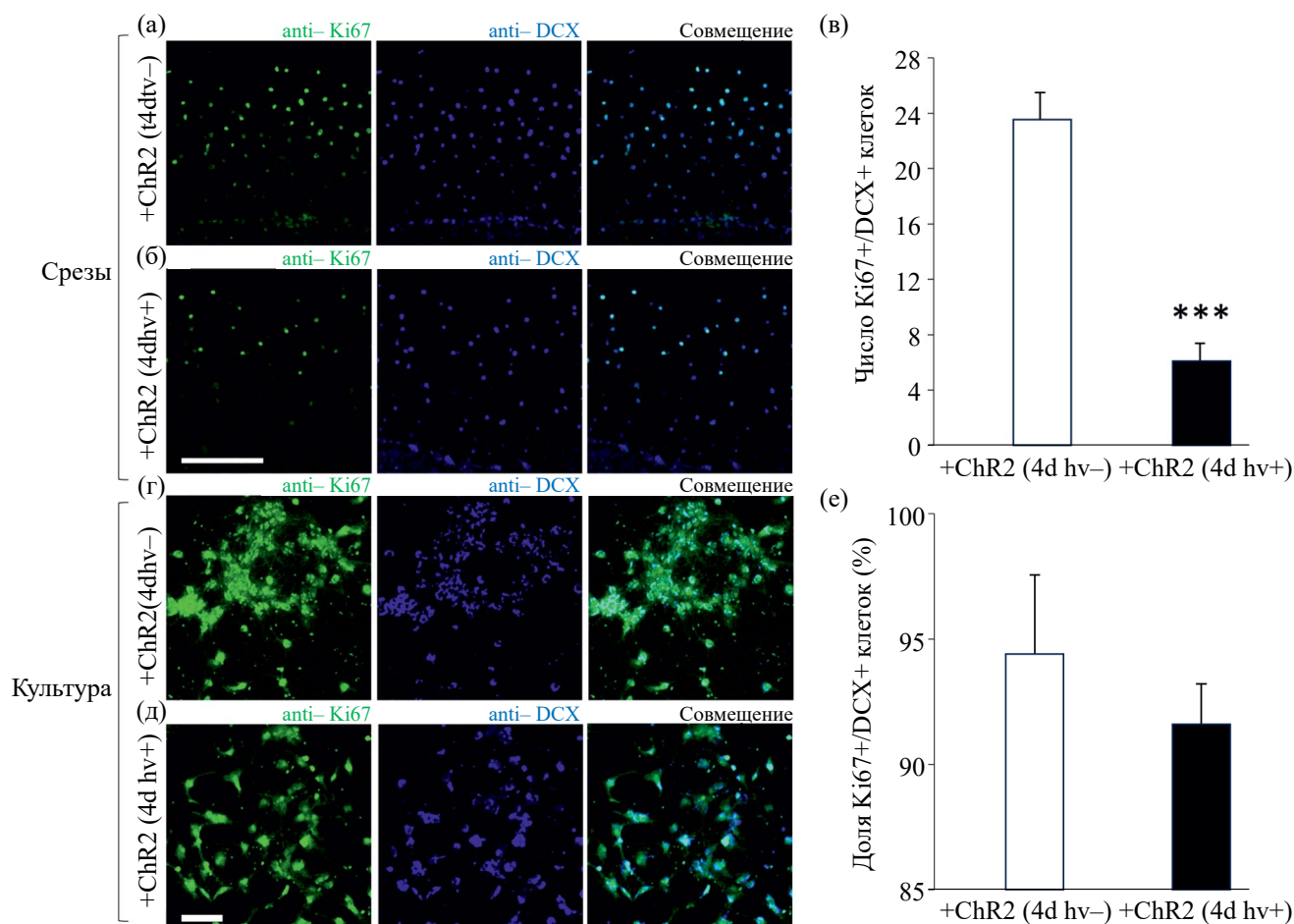


Рис. 4. Сравнение ко-экспрессии маркеров пролиферации и дифференцировки в клетках срезов и в культуре клеток мозжечка мыши после хронической оптогенетической стимуляции. *a, б* — Флуоресценция меченых антител к маркерам Ki67 (зелёная метка), DCX (синяя метка) и их ко-локализация в срезах коры мозжечка, экспрессирующей ChR2, в группе ChR2 (hv-) и в группе ChR2 (hv+); масштабный отрезок — 100мкм. *в* — Число клеток, ко-экспрессирующих Ki67 и DCX, в срезах мозжечка у животных групп ChR2 (hv-) и ChR2 (hv+); белые столбики — группа ChR2 (hv-), черные столбики — группа ChR2 (hv+); (***) — различия достоверны при $P \leq 0.001$. *г, д* — Флуоресценция меченых антител к маркерам Ki67 (зелёная метка) и DCX (синяя метка) и их колокализация в культуре клеток коры мозжечка, экспрессирующей ChR2, в групп[ChR2 (hv-) и ChR2 (hv+) (*д*). *е* — Доля клеток, ко-экспрессирующих Ki67 и DCX, в культуре клеток мозжечка у животных групп ChR2 (hv-) и ChR2 (hv+); белые столбики — группа ChR2 (hv-), черные столбики — группа ChR2 (hv+). Достоверных различий между группами не выявлено ($P > 0.05$). *в, е* — Показаны средние значения и их ошибки

ОБСУЖДЕНИЕ

Астроглиоз, характерный для многих травматических, нейродегенеративных или воспалительных состояний, сопровождается специфическими фенотипическими и функциональными изменениями астроцитов (Meeuwse et al., 2003; Wagner et al., 2013; Li et al., 2019). Реактивный астроглиоз играет ключевую роль в регенерации и ремоделировании нейронных цепей после травмы и ишемии и может оказывать как положительное, так и негативное действие в зависимости от контекста

и степени повреждения (Song et al., 2002; Liberto et al., 2004; Wilhelmsson et al., 2012).

Проведенное исследование демонстрирует комплексное влияние хронической оптогенетической активации астроцитов на регенеративный потенциал мозжечка, выявляя различия между ответом *in vivo* и *in vitro*. Мы воспроизвели один из ключевых компонентов нейродегенеративной среды — хронически активированные астроциты — и изучили их влияние на пролиферацию клеток-предшественников и их дифференцировку в нейроны.

Ключевым открытием является то, что хроническая фотостимуляция астроцитов *in vivo*, приводящая к реактивному астроглиозу, не оказывает существенного влияния на пролиферативную активность клеток-предшественников (о чем свидетельствует неизменный уровень Ki67), но при этом избирательно и значимо подавляет нейрональную дифференцировку, что проявляется в резком снижении количества DCX⁺ клеток и двойных позитивных клеток (Ki67⁺/DCX⁺) в срезах мозжечка.

Выявленный нами эффект сохранения пролиферации при блокировке дифференцировки является центральным патогенетическим звеном, выявленным в нашей работе. Он позволяет объяснить, почему при нейродегенеративных заболеваниях, сопровождающихся хроническим реактивным астроглиозом, собственный регенеративный потенциал мозжечка оказывается нереализованным. Пул предшественников формально активен (Ki67⁺), но микроокружение, формируемое активированными астроцитами, создает токсические условия, неблагоприятные для нейрогенеза. Это подтверждается резким снижением ко-локализации Ki67/DCX, что указывает на разрыв в критической цепи деление → дифференцировка. Это позволяет предположить, что реактивные астроциты избирательно стимулируют дифференцировку астроцитарных линий, а не усиливают нейрональную дифференцировку или пролиферацию клеток-предшественников (Fajerson et al., 2006; Robel et al., 2011).

Важнейшим аргументом в пользу ведущей роли именно микроокружения, а не клеточно-автономных дефектов, служат данные экспериментов *in vitro*. В культуре клеток, изолированных от влияния системных факторов и хронического нейровоспаления, внутренняя способность клеток-предшественников к пролиферации и дифференцировке сохранялась. Это доказывает, что сам по себе акт стимуляции астроцитов не является токсичным для предшественников. Напротив, их потенциал подавляется опосредованно через паракринные сигналы (провоспалительные цитокины, факторы роста, нарушения гомеостаза), доминирующие в ткани *in vivo* (Robel et al., 2011; Li et al., 2019).

Полученные результаты коррелируют с данными других исследований, демонстрирующих двойственную

роль реактивного астроглиоза (Fajerson et al., 2006; Götz et al., 2015). Реактивный астроглиоз способствует изоляции очагов повреждения и поддержанию тканевого гомеостаза, с одной стороны, а с другой — индуцирует выделение факторов, нарушающих синаптическую пластичность и процессы регенерации. Наши данные позволяют уточнить этот тезис: хронический астроглиоз целенаправленно подавляет именно нейрогенез, возможно, перенаправляя ресурсы на другие цели, например на глиогенез или формирование глиального рубца.

С клинической точки зрения, наши результаты предупреждают о потенциальных рисках терапевтических стратегий, направленных на общую стимуляцию пролиферации без учета состояния микроокружения. Бесконтрольное усиление пролиферации в условиях хронического астроглиоза может оказаться не только неэффективным, но и потенциально вредным, способствуя накоплению клеток, склонных к гибели или неправильной дифференцировке.

ВЫВОДЫ

1. Хроническая оптогенетическая активация астроцитов *in vivo* избирательно подавляет нейрональную дифференцировку (снижение DCX⁺ и Ki67⁺/DCX⁺ клеток), не оказывая значимого влияния на пролиферацию клеток-предшественников (уровень Ki67⁺).
2. Подавление нейрогенеза опосредовано не клеточно-автономными дефектами клеток-предшественников, а токсическим микроокружением, формируемым реактивными астроцитами *in vivo*, что подтверждается сохранением их пролиферативного и дифференцировочного потенциала в изолированной культуре *in vitro*.
3. Ключевым звеном нарушения регенерации является разрыв между пролиферацией и дифференцировкой, что проявляется в резком снижении количества клеток, ко-экспрессирующих Ki67 и DCX.
4. Полученные данные указывают на необходимость разработки терапевтических стратегий, направленных не на стимуляцию пролиферации, а на коррекцию микроокружения (подавление патологического нейровоспаления, обеспечение нейротрофической поддержки) для создания условий, благоприятных для выживания и интеграции новообразованных нейронов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шuvaев А. Н., Белозор О. С., Можей О. И., Яковлева Д. А., Шuvaев А., Смольникова М. В., Пожиленкова Е. А., Каспаров С., Салмин В. В., Салмина А. Б. 2021. Влияние реактивной глиии Бергмана на кратковременную синаптическую пластичность в моделях мозжечковой нейродегенерации, вызванной хронической активацией ChR2 и экспрессией мутантного атаксина 1. *Анналы клинической и экспер. неврологии*. Т. 15. № 1. С. 51. (Shuvaev A. N., Belozor O. S., Mozhey O. I., Yakovleva D. A., Shuvaev A., Smolnikova M. V., Pozhilenkova E. A., Kasparov S., Salmin V. V., Salmina A. B. 2021. Study of reactive gliobergmani on severe synaptic plasticity in models of cerebellar neurodegeneration caused by sequential activation of chr2 and expression of mutant attack1. *Annals Clin. Exper. Neurol.* V. 15. No. 1. P. 51). <https://doi.org/10.25692/ACEN.2021.1.6>

2. *Allahyari R. V., Garcia A. D.* 2015. Triggering reactive gliosis *in vivo* by a forebrain stab injury. *J. Vis. Exp.* V. 100. Art. ID: e52825.
<https://doi.org/10.3791/52825>
3. *Baumann O., Mattingley J. B.* 2022. Cerebellum and emotion processing. *Adv. Exper. Med. Biol.* V. 1378. P. 25.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-99550-8_3
4. *Fajjerson J., Tinsley R. B., Apricó K., Thorsell A., Nodin C., Nilsson M., Blomstrand F., Eriksson P. S.* 2006. Reactive astrogliosis induces astrocytic differentiation of adult neural stem/progenitor cells *in vitro*. *J. Neurosci. Res.* V. 84. P. 1415.
<https://doi.org/10.3791/52825.1002/jnr.21044>
5. *Figueiredo M., Lane S., Stout R. F. Jr., Liu B., Parpura V., Teschemacher A. G., Kasparov S.* 2014. Comparative analysis of optogenetic actuators in cultured astrocytes. *Cell Calcium.* V. 56. P. 208.
<https://doi.org/10.3791/52825.1016/j.ceca.2014.07.007>
6. *Gourine A. V., Kasymov V., Marina N., Tang F., Figueiredo M. F., Lane S., Teschemacher A. G., Szyper K. M., Deisseroth K., Kasparov S.* 2010. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science.* V. 329. P. 571.
<https://doi.org/10.3791/52825.1126/science.1190721>
7. *Götz M., Sirko S., Beckers J., Irmeler M.* 2015. Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: *in vivo* lineage, *in vitro* potential, and genome-wide expression analysis. *Glia.* V. 63. P. 1452.
<https://doi.org/10.3791/52825.1002/glia.22850>
8. *Leto K., Arancillo M., Becker E. B., Buffo A., Chiang C., Ding B., Dobyns W. B., Dusart I., Haldipur P., Hatten M. E., Hoshino M., Joyner A. L., Kano M., Kilpatrick D. L., Koibuchi N., Marino S., Martinez S., Millen K. J., Millner T. O., Miyata T., Parmigiani E., Schilling K., Sekerková G., Sillitoe R. V., Sotelo C., Uesaka N., Wefers A., Wingate R. J., Hawkes R.* 2016. Consensus paper: cerebellar development. *cerebellum.* V. 15. P. 789.
<https://doi.org/10.1007/s12311-015-0724-2>
9. *Liberto C. M., Albrecht P. J., Herx L. M., Yong V. W., Levison S. W.* 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J. Neurochem.* V. 89. P. 1092.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02420.x>
10. *Li K., Li J., Zheng J., Qin S.* 2019. Reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Aging Dis.* V. 10. P. 664.
<https://doi.org/10.14336/AD.2018.0720>
11. *Llorente V., Velarde P., Desco M., Gómez-Gaviro M. V.* 2022. Current understanding of the neural stem cell niches. *Cells.* V. 11. P. 3002.
<https://doi.org/10.3390/cells11193002>
12. *Luo L., Guo K., Fan W., Lu Y., Chen L., Wang Y., Shao Y., Wu G., Xu J., Lü L.* 2017. Niche astrocytes promote the survival, proliferation and neuronal differentiation of co-transplanted neural stem cells following ischemic stroke in rats. *Exper. Theor. Med.* V. 13. P. 645.
<https://doi.org/10.3892/etm.2016.4016>
13. *Meeuwssen S., Persoon-Deen C., Bsibsi M., Ravid R., van Noort J. M.* 2003. Cytokine, chemokine and growth factor gene profiling of cultured human astrocytes after exposure to proinflammatory stimuli. *Glia.* V. 43. P. 243.
<https://doi.org/10.1002/glia.10259>
14. *Niranjan R.* 2014. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. *Mol. Neurobiol.* V. 49. P. 28.
<https://doi.org/10.1007/s12035-013-8483-x>
15. *Robel S., Berninger B., Götz M.* 2011. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 12. P. 88.
<https://doi.org/10.1038/nrn2978>
16. *Schneider J., Karpf J., Beckervordersandforth R.* 2019. Role of astrocytes in the neurogenic niches. *Methods Mol. Biol.* V. 1938. P. 19.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9068-9_2
17. *Shuvaev A. N., Belozor O. S., Mozhei O., Yakovleva D. A., Potapenko I. V., Shuvaev A. N., Smolnikova M. V., Salmin V. V., Salmina A. B., Hirai H., Teschemacher A. G., Kasparov S.* 2021. Chronic optogenetic stimulation of Bergmann glia leads to dysfunction of EAAT1 and Purkinje cell death, mimicking the events caused by expression of pathogenic ataxin-1. *Neurobiol. Dis.* V. 154. Art. ID: 105340.
doi: 10.1016/j.nbd.2021.105340
18. *Sofroniew M. V.* 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* V. 32. P. 638.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>

19. *Song H., Stevens C. F., Gage F. H.* 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*. V. 417. P. 39. <https://doi.org/10.1038/417039a>
20. *Wagner D. C., Scheibe J., Glocke I., Weise G., Deten A., Boltze J., Kranz A.* 2013. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury. *Acta Neurobiol. Exper. (Wars.)*. V. 73. P. 79. <https://doi.org/10.55782/ane-2013-1923>
21. *Wilhelmsson U., Faiz M., de Pablo Y., Sjöqvist M., Andersson D., Widestrand A., Potokar M., Stenovec M., Smith P. L., Shinjyo N., Pekny T., Zorec R., Ståhlberg A., Pekna M., Sahlgren C., Pekny M.* 2012. Astrocytes negatively regulate neurogenesis through the Jagged1-mediated Notch pathway. *Stem Cells*. V. 30. P. 2320. <https://doi.org/10.1002/stem.1196>