

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-18-23>

ВЛИЯНИЕ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОСФЕР НА АНГИОГЕНЕЗ С УЧАСТИЕМ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ *IN VITRO*

УСПЕНСКАЯ Ю.А.^{1,2*}, МАЛИНОВСКАЯ Н.А.¹, МОРГУН А.В.¹, ОСИПОВА Е.Д.¹, САЛМИНА А.Б.¹

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Красноярск, Россия

²ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет», г. Красноярск, Россия

Резюме

Цель. Оценить особенности ангиогенеза *in vitro* в присутствии нейросфер.

Материалы и методы. Источником нейросфер служили мыши C57Bl6 в возрасте 10–14 суток постнатального развития, из головного мозга которых выделяли гиппокамп для получения стволовых и прогениторных клеток нейрональной природы. Для регистрации особенностей ангиогенеза *in vitro* в присутствии нейросфер использовали набор для оценки ангиогенеза Angiogenesis Assay Kit (In Vitro) (Abcam, ab204726, США) согласно протоколу производителя, с последующей статистической обработкой данных.

Результаты. В присутствии нейросфер произошло уменьшение числа образовавшихся сосудистых петель, тогда как остальные параметры ангиогенеза (средняя площадь и периметр петель, общая длина сосудов и число контактов

на мм²) не имели статистической разницы через 18 часов культивирования.

Заключение. Пролиферативная активность нейросфер тормозит неоангиогенез *in vitro*. Полученные данные могут служить основой для разработки новой технологии управления церебральным ангиогенезом.

Ключевые слова: ангиогенез, эндотелиоциты, гиппокамп, нейрональные стволовые и прогениторные клетки.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке Государственного задания на проведение научных исследований Министерства здравоохранения РФ (2018–2020 гг.).

Для цитирования:

Успенская Ю.А., Малиновская Н.А., Моргун А.В., Осипова Е.Д., Салмина А.Б. Влияние развивающихся гиппокампальных нейросфер на ангиогенез с участием церебральных эндотелиоцитов *in vitro*. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3): 18–23. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-18-23>

*Корреспонденцию адресовать:

Успенская Юлия Александровна, 660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1, E-mail: yulia.uspenskaya@mail.ru
© Успенская Ю.А. и др.

ORIGINAL RESEARCH

MOUSE HIPPOCAMPAL NEUROSPHERES NEGATIVELY REGULATE CEREBRAL ANGIOGENESIS

Yulia A. Uspenskaya¹, **, Natalia A. Malinovskaya¹, Andrey V. Morgun¹, Elena D. Osipova¹, Alla B. Salmina¹

¹Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

²Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract

Aim. To evaluate the features of cerebral angiogenesis in the presence of neurospheres, free-floating clusters of neural stem and progenitor cells.

Materials and Methods. Endothelial cells were optionally co-cultured with neurospheres were isolated from the hippocampus of 10-14-days-old C57Bl6 mice. Angiogenesis was evaluated *in vitro* by means of the angiogenesis assay kit (Abcam, ab204726) according to the manufacturer's protocol.

Results. The number of vascular loops was decreased in the presence of neurospheres. Other angiogenic parameters (average loop area and perim-

eter, total vessel length and number of contacts per mm^2) had no statistically significant differences after 18 hours of culture.

Conclusion. The proliferative activity of neurospheres inhibits *in vitro* cerebral angiogenesis.

Keywords: angiogenesis, endothelial cells, hippocampus, neural stem cells, neural progenitor cells.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

The study was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (State Assignment for Research, 2018-2020).

◀ English

For citation:

Yulia A. Uspenskaya, Natalia A. Malinovskaya, Andrey V. Morgun, Elena D. Osipova, Alla B. Salmina. Mouse hippocampal neurospheres negatively regulate cerebral angiogenesis. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5(3): 18-23. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-18-23>

**Corresponding author:

Yulia A. Uspenskaya, 1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, Russian Federation, 660022, e-mail: yulia.uspensskaya@mail.ru
© Yulia A. Uspenskaya et al.

Введение

Одним из актуальных направлений в нейронауках является исследование вопросов ангиогенеза. Ангиогенез – образование новых кровеносных сосудов из уже существующих сосудов является важным процессом, который присутствует как при нормальных, так и при патологических состояниях. Изучение механизмов ангиогенеза и факторов, влияющих на него, вызывает неослабевающий интерес у исследователей в различных областях в течение многих лет. Как избыточное, так и недостаточное образование новых кровеносных сосудов приводит к развитию необратимых морфологических и функциональных изменений центральной нервной системы.

Известно, что в нейрогенных нишах головного мозга (в постнатальном периоде это субгранулярная зона гиппокампа, субвентрикулярная зона), где формируется локальное микроокружение, способствующее пролиферации и дифференцировке нейральных стволовых и прогениторных клеток в ответ на действие стимулов (когниция, репарация), процессы ангиогенеза могут иметь существенные особенности. Так, важную роль в регулировании структуры и функции церебральных сосудов играют клетки нейроваскулярной единицы головного мозга, которые тесно взаимодействуют между собой и обеспечивают функциональное сопряжение механизмов нейрональной активности

и локальной микроциркуляции. Ингибирование их пролиферации приводит к резкому снижению плотности и разветвленности корковых кровеносных сосудов [1]. Кроме того, тесная связь между нервными и сосудистыми клетками имеет решающее значение для нормального развития и функционирования мозга.

Поскольку ангиогенез может сочетаться с нейрогенезом, сопряжение областей ангиогенеза и окружающих тканей может представлять новую мишень для терапии патологии головного мозга. В настоящее время исследователи не теряют оптимизма в плане использования нейрональных стволовых клеток в качестве субстрата для восстановления нейро- и ангиогенеза поврежденного головного мозга. Самые недавние экспериментальные результаты демонстрируют, что стимуляция даже небольшого пула нейрональных стволовых клеток в ткани головного мозга «омолаживает» мозг, редуцируя возраст-ассоциированные проявления когнитивного дефицита [2]. В этом контексте перспективным подходом может быть оценка особенностей ангиогенеза *in vitro* в присутствии нейросфер, представляющих собой сферообразное скопление нейрональных стволовых и прогениторных клеток [3].

Цель исследования

Оценить особенности ангиогенеза *in vitro* в присутствии нейросфер.

Материалы и методы

Объект исследования – мышцы линии C57Bl6 в возрасте 10–14 суток постнатального развития, которые были использованы в эксперименте для получения стволовых и прогениторных клеток нейрональной природы (нейросфер).

Животных декапитировали после охлаждения на льду и производили забор головного мозга. Мозг помещали в ледяной раствор 2% глюкозы в PBS. Выделяли гиппокамп и иссекали до размеров 1 мм³. После окончания диссекции выделенную ткань переносили в свежий раствор 2% глюкозы в PBS (в конической пробирке 14 мл) на 1 минуту. После осаждения ткани удаляли супернатант. Оставшуюся ткань ресуспензировали в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, USA). 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 минуты, после осаждения неразделенных кусочков ткани, собирали супернатант и переносили его в новую стерильную 14 мл пробирку. Собранный супернатант центрифугировали при 150 g в течение 5 минут, после чего удаляли супернатант и добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation с последующей тритурацией [4].

Подсчет количества клеток осуществляли с помощью цитометра Scepter Cell Counter (Millipore). 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. Инкубация осуществлялась в условиях инкубатора при 5% CO₂ и 37°C. Через 24–48 часов наблюдали образование нейросфер.

Для регистрации особенностей ангиогенеза *in vitro* в присутствии нейросфер использовали набор для оценки ангиогенеза Angiogenesis Assay Kit (In Vitro) (Abcam, ab204726, США) согласно протоколу производителя.

На дно лунок культурального 96-луночного планшета (предварительно охлажденного на льду) вносили 50 мкл размороженного раствора внеклеточного матрикса. Осуществляли инкубацию в течение 1 часа при 37°C до перехода раствора в гель. В каждую лунку вносили 20 000 эндотелиальных клеток в 100 мкл среды. В опытную группу внесли нейросферы (500 нейросфер на лунку). В качестве контрольной группы использовали чистую культуру эндоте-

лиальных клеток. В качестве негативного контроля в питательную среду был добавлен ингибитор пролиферативной активности клеток (Винбластин) – 1 мкл/мл. Клетки инкубировали в течение 18 часов в условиях CO₂ инкубатора (37°C, содержащем 5% CO₂).

После окончания инкубации удаляли среду из лунок и промывали 100 мкл промывочного буфера. В каждую лунку вносили 100 мкл рабочего раствора окрашивающего красителя 1: 200 и инкубировали в течение 30 минут при 37°C, после чего оценивали особенности ангиогенеза (число петель, средний периметр петли, площадь занимаемой петли) с использованием микроскопа ZOE (Bio-Rad, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов непараметрической статистики (критерий Манна–Уитни). Результаты представлены в виде $M \pm SD$ (σ), где M – среднее значение, σ – стандартное отклонение. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ и менее. Анализ изображений проводили с применением пакета программного обеспечения ImageJ (1.47 v, США).

Результаты и обсуждение

При оценке влияния нейросфер на процессы ангиогенеза *in vitro* установлено, что в присутствии нейросфер произошло уменьшение числа образовавшихся сосудистых петель ($p < 0,01$). Остальные параметры ангиогенеза, такие как средняя площадь и периметр петель, а также общая длина сосудов и число контактов на мм², не имели статистической разницы через 18 часов культивирования (таблица 1, рисунок 1). Таким образом, локальная нейрогенная активность тормозит неангиогенез *in vitro*.

Вероятно, терапевтический потенциал нейросфер отмечается только в моделях поврежденных головного мозга и проявляется в способности нейрональных стволовых клеток продуцировать широкий спектр физиологически активных веществ, обладающих ангиогенным, антиапоптотическим, антиоксидантным и митогенным эффектами [5–7]. Считается, что усиление ангиогенеза является одной из стратегий, способствующих функциональному восстановлению после ишемического инсульта и других повреждений головного мозга [8]. Так, постишемический ангиогенез может способствовать ремоделированию нейронов, по крайней мере, двумя способами [9]. Во-первых, новые кровеносные сосуды, которые образуются

	Число петель <i>Loop number</i>	Средняя площадь петли, мм ² <i>Average loop area, mm²</i>	Средний периметр петли, мм <i>Average loop perimeter, mm</i>	Общая длина "сосудов" мм/мм ² <i>Total vessel length, mm per mm²</i>	Число контактов/мм ² <i>Number of contacts per mm²</i>
Эндотелий <i>Cerebral endothelial cells</i>	9,3 ± 3	0,015 ± 0,002	0,456 ± 0,03	15,032 ± 1,5	4 ± 1
Эндотелий + Нейросферы <i>Cerebral endothelial cells + neurospheres</i>	6,2 ± 2*	0,014 ± 0,001	0,477 ± 0,03	13,357 ± 0,8	5 ± 1
Эндотелий + Винбластин <i>Cerebral endothelial cells + vinblastine</i>	0,8 ± 0,5 *#	0,007 ± 0,003 *#	0,332 ± 0,04 *#	1,33 ± 0,5 *#	2 ± 1 *#

Таблица 1.

Влияние нейросфер на особенности ангиогенеза *in vitro*

Table 1.

The influence of neurospheres on *in vitro* angiogenesis parameters

Примечание:

* – отличие от группы контроля, $p < 0,01$, критерий Манна-Уитни ($n = 4$).

– отличие от группы эндотелий + нейросферы, $p < 0,01$, критерий Манна-Уитни ($n = 4$).

* – difference from the control group, $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни ($n = 4$).

– difference from the endothelium + neurosphere group, $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни ($n = 4$).

* $p < 0,01$ as compared with the control cells, Mann-Whitney U-test ($n = 4$).

$p < 0,01$ as compared with the cells with neurospheres, критерий Mann-Whitney U-test ($n = 4$).

*as compared with the control cells, $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test test ($n = 4$).

#as compared with the cells with neurospheres, $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test test ($n = 4$).

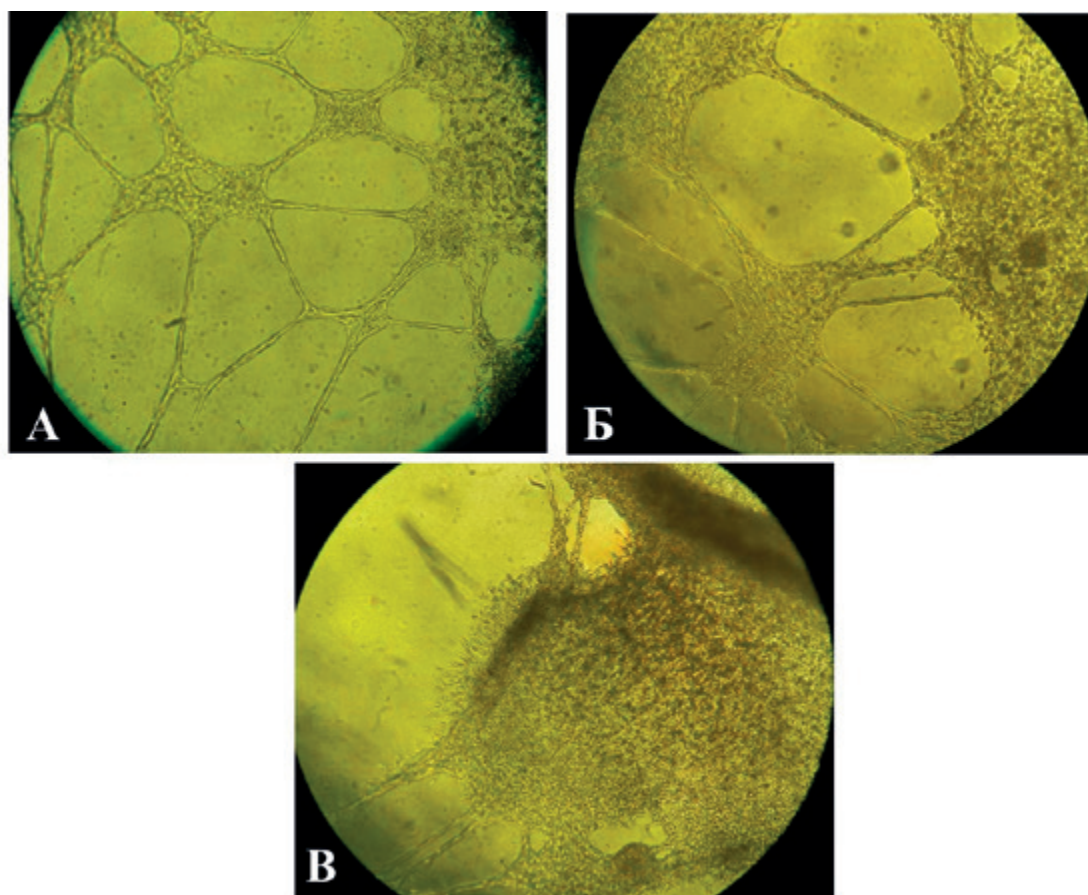


Рисунок 1.

Особенности ангиогенеза в присутствии нейросфер. А – интактный эндотелий, Б – эндотелий + нейросферы, В – эндотелий + винбластин

Figure 1.

In vitro angiogenesis in the presence of neurospheres. А – intact cerebral endothelial cells, В – cerebral endothelial cells + neurospheres, С – cerebral endothelial cells + vinblastine

после ишемии, участвуют в регуляции направления роста аксонов с помощью фактора роста эндотелия сосудов и ламинин / β 1-интегрин-сигнального пути. Во-вторых, кровеносные сосуды усиливают нейрогенез в три этапа: 1) кровеносные сосуды усиливают пролиферацию нейрональных стволовых клеток / клеток-предшественников посредством экспрессии нескольких внеклеточных сигналов; 2) микрососуды поддерживают миграцию нейрональных стволовых клеток / клеток-предшественников в направлении перинфарктной зоны, поставляя кислород, питательные вещества и растворимые факторы, а также выступая в качестве скаффолдов для миграции; и 3) оксигенация, индуцированная ангиогенезом в ишемическом ядре, способствует

дифференцировке мигрирующих нервных стволовых клеток / клеток-предшественников в зрелые нейроны. При этом васкулярная система головного мозга в физиологических условиях стабильна за счет отлаженного взаимодействия между стимуляторами и ингибиторами роста сосудов, тогда как замедленный или чрезмерный ангиогенез может существенно нарушить функцию органа и привести к развитию заболеваний.

Заключение

Таким образом, впервые установлено, что пролиферативная активность нейросфер тормозит неоангиогенез *in vitro*. Полученные данные могут служить основой для разработки новой технологии управления церебральным ангиогенезом.

Литература / References:

1. Ma S, Santhosh D, Kumar TP, Huang Z. A brain-region-specific neural pathway regulating germinal matrix angiogenesis. *Dev Cell*. 2017;4 (4):366-381. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.04.014>
2. Berdugo-Vega G, Arias-Gil G, López-Fernández A, Artegiani B, Wasielewska JM, Lee C-C, Lippert MT, Kempermann G, Takagaki K, Calegari F. Increasing neurogenesis refines hippocampal activity rejuvenating navigational learning strategies and contextual memory throughout life. *Nat Commun*. 2020;11(1):135. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14026-z>.
3. Khan J, Das G, Gupta V, Mohapatra S, Ghosh S, Ghosh S. Neurosphere development from hippocampal and cortical embryonic mixed primary neuron culture: a potential platform for screening neurochemical modulator. *ACS Chem Neurosci*. 2018;9(11):2870-2878. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00414>
4. Хилажева Е.Д., Бойцова Е.Б., Пожиленкова Е.А., Солончук Ю.Р., Салмина А.Б. Получение трехклеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro*. *Цитология*. 2015;57(10):710-713 [Khilazheva ED, Boytsova EB, Pozhilenkova EA, Solonchuk YR, Salmina AB. The model of neurovascular unit *in vitro* consisting of three cells types. *Tsitologiya*. 2015;57(10):710-713. (In Russ.)]
5. Capone C, Frigerio S, Fumagalli S, Gelati M, Principato M-C, Storini C, Montinaro M, Kraftsik R, De Curtis M, Parati E, De Simoni M-G. Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment. *PLoS One*. 2007;2 (4):e373. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000373>
6. Kishida N, Maki T, Takagi Y, Yasuda K, Kinoshita H, Ayaki T, Noro T, Kinoshita Y, Ono Y, Kataoka H, Yoshida K, Lo EH, Arai K, Miyamoto S, Takahashi R. Role of perivascular oligodendrocyte precursor cells in angiogenesis after brain ischemia. *J Am Heart Assoc*. 2019;8(9):e011824. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.011824>.
7. Tang Y, Wang J, Lin X, Wang L, Shao B, Jin K, Wang Y, Yang G-Y. Neural stem cell protects aged rat brain from ischemia-reperfusion injury through neurogenesis and angiogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34(7):1138-1147. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.61>
8. Zhang RL, Chopp M, Roberts C, Liu X, Wei M, Nejad-Davarani SP, Wang X, Zhang ZG. Stroke increases neural stem cells and angiogenesis in the neurogenic niche of the adult mouse. *PLoS One*. 2014;9(12):e113972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113972>
9. Hatakeyama M, Ninomiya I, Kanazawa M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke. *Neural Regen Res*. 2020;15(1):16-19. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.264442>.

Сведения об авторах

Успенская Юлия Александровна, доктор биологических наук, доцент, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. П. Железняк д.1); профессор кафедры внутренних незаразных болезней, акушерства и физиологии сельскохозяйственных животных ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет» (660049, Россия, г. Красноярск, пр. Мира д. 90).

Вклад в статью: написание текста статьи, анализ литературы.

ORCID: 0000-0003-4386-9753

Authors

Prof. Yulia A. Uspenskaya, DSc, Associate Professor, Research Fellow, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation); Professor, Department of Internal Noncommunicable Diseases, Obstetrics and Physiology of Livestock, Krasnoyarsk State Agrarian University (90, Prospekt Mira, Krasnoyarsk, 660049, Russian Federation).

Contribution: performed the literature review; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0003-4386-9753

Малиновская Наталья Александровна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. П. Железняка, д.1).

Вклад в статью: экспериментальные работы, написание текста статьи, анализ литературы.

ORCID: 0000-0002-0033-3804

Моргун Андрей Васильевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. П. Железняка, д.1).

Вклад в статью: экспериментальные работы, статистический анализ, написание текста статьи.

ORCID: 0000-0002-9644-5500

Осипова Елена Дмитриевна, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. П. Железняка, д.1).

Вклад в статью: экспериментальные работы, написание текста статьи, анализ литературы.

ORCID: 0000-0002-9718-1260

Салмина Алла Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник и руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, заведующая кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. П. Железняка, д.1).

Вклад в статью: выдвижение общей концепции, постановка задач, редакция текста статьи.

ORCID: 0000-0003-4012-6348

Prof. Natalia A. Malinovskaya, MD, DSc, Senior Researcher, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation).

Contribution: conducted the experiments; performed the literature review; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-0033-3804

Dr. Andrey V. Morgun, MD, DSc, Leading Researcher, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation).

Contribution: conducted the experiments; performed the statistical analysis; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-9644-5500

Mrs. Elena D. Osipova, Research Fellow, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation).

Contribution: conducted the experiments; performed the literature review; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-9718-1260

Prof. Alla B. Salmina, MD, DSc, Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Head of the Department of Biological, Medical, Pharmaceutical, and Toxicological Chemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation).

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0003-4012-6348

Статья поступила: 21.07.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Received: 21.07.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.