

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 576.3:611.81

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЭКЗОСОМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ МОЗГА МЫШИ

© 2024 г. М. Г. Ратушняк^{1, *}, А. В. Родина¹, Д. А. Шапошникова¹, Е. Ю. Москалёва¹

¹НИИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: ratushnyak_mg@nrcki.ru, ratushnyak_marya@mail.ru

Поступила в редакцию 30.05.2023 г.

После доработки 31.07.2023 г.

Принята к публикации 23.08.2023 г.

Изучена возможность переноса экзосом нейральных (НСК) и мезенхимальных (МСК) стволовых клеток (СК) мыши, меченных флуоресцентным красителем PKH26, в кору и гиппокамп головного мозга при их интраназальном введении мышам, и накопления и локализации экзосом в культивируемых клетках мозга разных типов, а также влияние экзосом НСК и МСК на параметры клеточного цикла и уровень апоптоза культивируемых НСК после облучения в дозе 4 Гр. Показано накопление экзосом полученных из культуральной среды НСК и МСК из жировой ткани мышей линии C57BL/6, и в гиппокампе, и в коре головного мозга после их интраназального введения сингенным мышам. Экзосомы обнаруживали преимущественно в перинуклеарной области клеток мозга. При культивировании НСК и дифференцированных из НСК нейронов и астроцитов мыши экзосомы также обнаруживали в перинуклеарной области клеток, а в астроцитах также и в цитоплазме. В астроцитах экзосомы накапливались наиболее эффективно. При исследовании влияния экзосом СК на клеточный цикл и уровень апоптоза облученных в дозе 4 Гр НСК показано, что через 24 ч культивирования облученных НСК в присутствии экзосом как НСК, так и МСК восстановления параметров клеточного цикла не происходит, но снижается доля НСК в состоянии апоптоза.

Ключевые слова: экзосомы, нейральные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, головной мозг, нейроны, астроциты, гамма-облучение, апоптоз, клеточный цикл, мыши

DOI: 10.31857/S1027813324010089, EDN: GYUMZB

ВВЕДЕНИЕ

В основе патогенеза нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, послеоперационное когнитивное снижение, нарушение когнитивных функций в отдаленный период после облучения головного мозга при лучевой терапии опухолей мозга и опухолей в области головы и шеи, при травмах мозга, инсультах и инфекционных поражениях мозга, лежит нейровоспаление. Развитие нейровоспаления при этих состояниях обусловлено длительной активацией клеток микроглии, которая сопровождается секрецией активных метаболитов кислорода и азота и провоспалительных цитокинов [1, 2]. Последние активируют астроциты, которые также начинают секретировать провоспалительные цитокины, усиливая развитие нейровоспаления и повреждение нейронов, что и приводит к нарушению когнитивных функций.

В публикациях последних двух десятилетий убедительно показано, что нейральные стволовые

(НСК) и нейральные прогениторные клетки [3–7], а также мезенхимальные стромальные стволовые клетки (МСК) [8–10] обладают высокой способностью стимулировать процессы регенерации многих тканей, в том числе головного мозга, при разных типах повреждения не столько благодаря их способности к самообновлению и дифференцировке, сколько благодаря способности секретировать широкий спектр регуляторных молекул и факторов роста, в том числе в составе экзосом [11–15].

Экзосомы представляют собой экстраклеточные везикулы, которые отличаются от микровезикул и апоптотических телец способом образования, молекулярным составом и размером, который может варьировать от 30–40 до 150–200 нм. Помимо белков экзосомы содержат разные типы РНК, среди которых 60–80% составляет рРНК, 1–4% – тРНК, 3–30% – микроРНК и другие типы малых РНК и мРНК. Маркерами экзосом, используемыми для их идентификации, являются поверхностные молекулы CD9, CD63, CD81 и белок TSG101 (tumour susceptibility gene 101). Экзосомы стволовых клеток

выделяют из культуральной среды, кондиционированной этими клетками (КС) [11, 16].

Экзосомы, секретируемые НСК, обладают высокой эффективностью в лечении отдаленных пострадиационных повреждений мозга [17, 18]. Накопление и распределение экзосом, полученных из КС культивируемых клеток НСК человека, в мозге при разных способах введения — интракраниальном в область гиппокампа, внутривенном в орбитальный синус и интраназальном введении — было одинаковым, одинаковой была и эффективность трансплантированных НСК и экзосом НСК человека линии Н9 в сохранении структуры нейронов и снижении уровня нейровоспаления у облученных животных [18]. Однако локализация экзосом гомологичных НСК в мозге изучена не была.

МСК, так же как и НСК, способны оказывать защитное действие при радиационно-индуцированном повреждении головного мозга, уменьшая окислительный стресс, воспаление и снижая инфильтрацию гиппокампа клетками микроглии [19, 20].

Близкое защитное действие экзосом НСК и МСК мыши в отношении облученных НСК показано нами ранее в экспериментах *in vitro* [21]. Также показано, что длительное интраназальное введение экзосом НСК мыши предотвращало развитие отдаленных пострадиационных нарушений поведения и обеспечивало сохранение когнитивных функций у мышей после гамма-облучения головы [22]. Однако механизмы такого действия экзосом СК остаются недостаточно изученными.

В защитной активности экзосом НСК и МСК при повреждении мозга важную роль, по-видимому, играет их способность эффективно преодолевать гематоэнцефалический барьер и доставлять в мозг и клетки мозга — НСК, нейроны, астроциты и клетки микроглии — биологически активные вещества для регуляции их активности. В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование переноса флуоресцентно меченных экзосом НСК и МСК мыши в кору и гиппокамп головного мозга при их интраназальном введении мышам, накопления и локализации экзосом в культивируемых клетках мозга разных типов и влияния экзосом НСК и МСК на параметры клеточного цикла и уровень апоптоза культивируемых НСК мыши после облучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование и фенотипирование НСК и МСК мыши для получения КС. НСК выделяли в стерильных условиях из головного мозга неонатальных мышей линии C57BL/6, как описано ранее [23]. Все эксперименты с животными были проведены с соблюдением требований, изложенных

в директиве по охране животных, используемых в научных целях (2010/63/ EU от 22.09.2010), а также в соответствии с требованиями этического комитета НИЦ “Курчатовский институт” по вопросам биомедицинских исследований (протокол от 25.01.2023 № 02–2 пр). Животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. Головной мозг измельчали после удаления обонятельных долей, обрабатывали активированным папаином; выделенные клетки отмывали средой DMEM/F12, ресуспендировали, считали, переносили в культуральные планшеты или бактериальные чашки Петри в культуральной среде состава: DMEM/F12, содержащей NaHCO_3 , — 2.4 мг/мл, глюкозу — 0.6%; Перес — 0.5 мМ, прогестерон — 60 нг/мл, путресцин — 9.6 мкг/мл, инсулин — 4.2 мкг/мл, трансферрин — 3.8 мкг/мл, селенит натрия — 1 мкг/мл, гепарин — 1.8 мкг/мл (все компоненты Sigma-Aldrich), EGF (PeproTech) — 20 нг/мл, bFGF (PeproTech) — 10 нг/мл, B27 (Life Technologies) — 2% и культивировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Через 5–7 сут культивирования сформировавшиеся нейросферы размером 150–200 мкм ресуспендировали в растворе аккумуля (Thermo Fisher Scientific, США) для диссоциации, клетки подсчитывали и рассевали в культуральной среде при плотности 10–20 клеток/мкл. После восьмого пассажа клетки культивировали в среде состава Neurobasal A + Advanced DMEM/F12 (1:1), содержащей 2% бессывороточной добавки B27, 20 нг/мл фактора EGF, 10 нг/мл фактора bFGF и 2 нг/мл гепарина. Клетки культивировали в суспензии в виде нейросфер на низко адгезивном пластике и в виде монослойной культуры на подложке, сформированной с помощью Geltrex (Corning, США). Для фенотипирования НСК нейросферы диссоциировали и клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером Дюльбеко. Анализ антигенов проводили с использованием антител к O4 — конъюгат с аллофикоцианином (Miltenyi Biotec); антител к NG2 — конъюгат с Alexa Fluor 488 (Merk Millipore); антител к нестину — конъюгат с Alexa Fluor 488 (Merk Millipore); антител к β -тубулину III (клон TUJ1) — конъюгат с Alexa Fluor 488 (BioLegend); антител к GFAP — конъюгат с аллофикоцианином (Miltenyi Biotec). Фиксировали НСК мыши 2%-ным параформальдегидом при комнатной температуре в течение 30 мин. Для анализа поверхностных антигенов фиксированные НСК отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с 0.2% бычьего сывороточного альбумина (БСА), супернатант удаляли, ресуспендировали клетки в 100 мкл того же буфера и добавляли антитела. После окончания инкубации клетки трижды отмывали ФСБ, содержащим 0.2% БСА, суспендировали в том же буфере и анализировали флуоресценцию клеток на проточном цитофлуориметре. Для окрашивания клеток антителами

к внутриклеточным антигенам клетки после фиксации пермеабилizировали 0.3%-ным раствором тритона X-100 в ФСБ, содержащем 2% БСА, в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли антитела и инкубировали 1 ч при комнатной температуре без доступа света. После окончания инкубации клетки трижды отмывали ФСБ, содержащим 0,1% тритона и 2% БСА, осадок клеток ресуспендировали в ФСБ, содержащем 0,2% БСА, и анализировали флуоресценцию клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur, оснащенный аргонным лазером с длиной волны 488 нм (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии НИЦ “Курчатовский институт”). В каждом образце анализировали 10^4 клеток.

Для получения КС НСК на 16–20 пассажах высеивали по 5×10^5 в чашки Петри диаметром 6 см² и культивировали в виде нейросфер, КС для выделения экзосом собирали через 48 ч культивирования и центрифугировали 10 мин при $300 \times g$ при 4°C для удаления клеток на центрифуге Elmi Sky Line CM-6M (ELMI Ltd., Латвия).

МСК выделяли из жировой ткани мышей линии C57BL/6 в возрасте 2-х месяцев, как описано ранее [24]. Фрагменты жировой ткани измельчали ножницами, затем гомогенизировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США) без сыворотки. К суспензии фрагментов жировой ткани в среде добавляли раствор коллагеназы (Sigma, США) в конечной концентрации 0.08% и инкубировали суспензию при перемешивании 1 ч при 37°C. Собирали клетки с помощью центрифугирования (1200 об/мин, 10 мин). Осадок клеток ресуспендировали в среде DMEM/F12 с 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, США) для нейтрализации коллагеназы, собирали клетки с помощью центрифугирования (1200 об/мин, 10 мин), ресуспендировали в среде DMEM/F12 с 10% ФБС и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США) и переносили в культуральный флакон площадью 75 см² (Corning, США). После прикрепления (через 24 ч) клетки промывали ФСБ (Sigma, США), вносили культуральную среду и культивировали до достижения субконфлюентного состояния при 37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. По достижении 80–85% конфлюентности клетки рассевали, используя раствор трипсин-ЭДТА (Gibco, США), содержащий 0,05% трипсина и 0,02% ЭДТА. Полученные МСК характеризовали по экспрессии специфических антигенов. Для этого МСК ресуспендировали в ФСБ, содержащем 0,1% БСА, инкубировали 30 мин при комнатной температуре с антителами, конъюгированными с AlexaFluor 488 или фикоэритрином (Biolegend, США), к антигенам мыши Sca-1, CD9, CD45 и CD11b. В качестве изотипического контроля использовали соответствующие IgG, конъюгированные с AlexaFluor 488 или фикоэритрином (Biolegend, США). Клетки фиксировали в растворе

2%-ного параформальдегида 20 мин при комнатной температуре и анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur, оснащенный аргонным лазером с длиной волны 488 нм (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии НИЦ “Курчатовский институт”). В каждом образце анализировали 10^4 клеток.

Для получения КС МСК из жировой ткани мыши культивировали в состоянии, близком к монослою, в среде α MEM в течение 48 ч с добавлением 5% ФБС, предварительно очищенной от экзосом путем ультрацентрифугирования при $110000 \times g$ в течение 2 ч при 4°C. КС собирали и центрифугировали 10 мин при $300 \times g$ при 4°C для удаления клеток на центрифуге Elmi Sky Line CM-6M (ELMI Ltd., Латвия).

Выделение экзосом из КС НСК и МСК мыши. Собранную КС центрифугировали 20 мин при $2000 \times g$ при 4°C для удаления крупных фрагментов клеток и апоптотических телец. Полученную надосадочную жидкость фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,22 мкм и центрифугировали при $10000 \times g$ в течение 30 мин на центрифуге Avanti J-E (Beckman Coultere, США, ротор JA-25) при 4°C. Надосадочную жидкость собирали и хранили до выделения экзосом при –80°C, затем размораживали и выделяли экзосомы с помощью двойного ультрацентрифугирования на высокоскоростной центрифуге Optima MAX-XP (Beckman Coulter, США, ротор MLA-55) при $110000 \times g$ в течение 2 ч при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл ФСБ. Полученную после ультрацентрифугирования фракцию экзосом концентрировали с помощью ультрафильтрации с использованием концентраторов Amicon Ultracel YM-30 (30k MWCO, объем 0.5 мл; Merck Millipore, США) и Spin-X UF 500 (100k MWCO, объем 0.5 мл; Corning, Великобритания). Аликвоты по 100 мкл хранили при –80°C для дальнейших исследований. Концентрацию белка в образцах определяли спектрофотометрически с использованием набора BCA (Bicinchoninic acid protein assay kit, Sigma-Aldrich, США).

Характеристика морфологии и размера экзосом с помощью электронной микроскопии. Для исследования морфологии экзосом, полученных из КС НСК и МСК, применяли метод криогенной просвечивающей электронной микроскопии (крио-ПЭМ), как описано ранее [21]. Образцы анализировали с помощью крио-ПЭМ Titan Krios 60–300 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенного высокочувствительным детектором электронов Falcon II (Thermo Fisher Scientific, США) и корректором сферической aberrации Cs изображения (Image corrector, CEOS, Германия) в ресурсном центре зондовой и электронной микроскопии КК НБИКС-ПТ НИЦ “Курчатовский институт”. Экспериментальные данные получены при ускоряющем напряжении 300 кВ с использованием

программного обеспечения EPU (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме малых доз при увеличениях 3800х, 18000х и 37000х и дефокусировке в диапазоне $[-2.0; -18.0]$ мкм. Авторы приносят благодарность сотрудникам ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии Е. В. Ястремскому и Р. А. Камышинскому за проведение исследований с использованием крио-ПЭМ.

Определение размера экзосом с помощью метода динамического светорассеяния. Средний размер экзосом определяли методом динамического светорассеяния на анализаторе размера частиц и дзета-потенциала Malvern Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical, Великобритания). Для каждого образца проводили не менее трех повторных измерений, данные усредняли.

Характеристика экзосом по экспрессии специфических маркеров с помощью проточной цитометрии. Для анализа специфических маркеров экзосом с помощью проточной цитометрии экзосомы инкубировали с альдегид-сульфатными латексными частицами диаметром 4 мкм (Invitrogen, США) в соотношении 1:9. К 5 мкл суспензии латексных частиц добавляли 45 мкл суспензии экзосом в ФСБ и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 1 мл ФСБ и инкубировали еще 2 ч при комнатной температуре при перемешивании на шейкере. Далее латексные частицы с адсорбированными на них экзосомами осаждали центрифугированием ($3000 \times g$, 5 мин), осадок ресуспендировали в 100 мкл 100 ммоль/л раствора глицина и инкубировали в течение 30 мин для нейтрализации свободных альдегидных групп на частицах. Для контроля неспецифического связывания все те же экспериментальные процедуры повторяли с ФСБ, предварительно очищенной от экзосом путем ультрацентрифугирования. Далее частицы отмывали ФСБ от глицина и инкубировали с моноклональными антителами к маркерам экзосом CD9, конъюгированными с фикоэритрином (CD9-PE, BioLegend, США) и CD63, конъюгированными с аллофикоцианином (CD63-APC, BioLegend, США), в ФСБ, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина. При окрашивании экзосом неконъюгированными моноклональными антителами к TSG101 (TSG101-4A10, Invitrogen, США) использовали вторичные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (IgG-Alexa Fluor 488, Poly4053, BioLegend, США). Инкубацию проводили в течение ночи при 4°C (CD9, CD63) или в течение 45 мин при комнатной температуре (TSG101) на шейкере, после чего образцы дважды отмывали ФСБ и анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSAria Fusion (BD Biosciences, США) (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии НИЦ “Курчатовский институт”).

Окрашивание экзосом красителем RKN26. Окрашивание экзосом НСК и МСК флуоресцентным

красителем RKN26 проводили в соответствии с инструкцией производителя (Sigma-Aldrich, США). Осадок экзосом каждого типа ресуспендировали в 500 мкл разбавителя С. В отдельном эппендорфе 500 мкл разбавителя С смешивали с 2 мкл RKN26. Суспензию экзосом смешивали с раствором красителя и инкубировали в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением равного объема 1%-ного бычьего сывороточного альбумина. Меченые экзосомы собирали при ультрацентрифугировании при $110000 \times g$ в течение 60 мин, промывали ФСБ и собирали при ультрацентрифугировании.

Анализ локализации экзосом НСК и МСК в головном мозге мыши. Работа проведена на 9-ти самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2-х месяцев, весом 18–21 г (ФГБУН НЦБМТ ФМБА питомник “Столбовая”, Россия). Все эксперименты с животными проводили в соответствии с требованиями этического комитета НИЦ “Курчатовский институт”. Мыши содержались по 4–5 особей в клетках в стандартных условиях вивария со сменой темной и светлой фаз суток 12/12 ч при свободном доступе к пище и воде. Животные были разделены на 3 группы. Первой двукратно в течение 2 дней интраназально вводили в каждую ноздрю по 5 мкл ФСБ (группа 1 – “контрольная группа”, $n = 3$), второй – суспензию флуоресцентно меченых красителем RKN26 экзосом НСК (группа 2), а третьей – экзосом МСК (группа 3) в ФСБ. Экспериментальные группы 2 и 3 получали по 5 мкл суспензии окрашенных RKN26 экзосом НСК или МСК в каждую ноздрю, по 5 мкг по белку на мышь ($n = 3$). Через 24 ч после последнего введения мышей анестезировали с использованием смеси зоветил (Virbac Sante Animale, Франция) и рометар (Bioveta, Чешская Республика). Объем внутримышечной инъекции составлял 0.1 мл на 10 г веса животного. Через 10 мин мышей подвергали транскардиальной перфузии, которую проводили с помощью перистальтического насоса Ecoline ISM1090 (Ismatec, Швейцария) сначала холодным ФСБ (pH 7.4; Sigma-Aldrich, США) при комнатной температуре, затем 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) в ФСБ, и извлекали мозг. Для иммуногистохимического анализа головной мозг животных фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в ФСБ при 4°C в течение 24 ч. На вибраторе Leica VT1200S (Leica, Германия) готовили парасагиттальные срезы толщиной 50 мкм. Плавающие срезы мозга контрольных мышей и мышей, которым интраназально вводили экзосомы НСК и МСК, окрашенные RKN26, помещали в 12-луночные планшеты с ФСБ и инкубировали в растворе с 300 ммоль/л DAPI в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Отмывали ФСБ 3 раза по 15 мин. Срезы мозга заключали под покровные стекла с использованием маунтинга Fluoromount (Sigma-Aldrich, США).

Флуоресцентные срезы оцифровывали с помощью конфокального микроскопа FluoView 10i (Olympus, Япония). Для обработки и анализа полученных изображений срезов мозга использовали программный пакет Imaris 7.4.2 (Bitplane, Швейцария).

Индукция дифференцировки НСК в нейроны и астроциты и культивирование с флуоресцентно меченными экзосомами НСК и МСК. Дифференцировку НСК проводили на стеклах, предварительно покрытых раствором Geltrex. НСК высаживали в плотности 20 тыс. клеток/см² (40 тыс. клеток/лунку) в стандартной среде (0.5 мл/лунку). Через 2 сут для индукции дифференцировки культуральную среду заменяли средой Neurobasal A, содержащей 2% B27 и 5 нг/мл bFGF. Еще через 2 сут удаляли bFGF. Каждые 2 сут половину объема культуральной среды заменяли свежей средой того же состава. Через 6 сут дифференцировки (8 сут после посева на стекла) к дифференцированным в нейроны и астроциты клеткам и недифференцированным НСК, которые высаживали на стекла за 24 ч до внесения экзосом, добавляли флуоресцентно меченные красителем PKH26 экзосомы НСК и МСК (5 мкг/мл). Через 24 ч клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом с 4%-ной сахарозой в течение 20–30 мин при комнатной температуре. После этого фиксированные клетки окрашивали антителами к маркерам дифференцировки нейронов (β -тубулин III) и астроцитов (GFAP). Клетки пермеабелизовали 0,3%-ным раствором тритона X-100 в ФСБ, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина, в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали с неконъюгированными антителами к β -тубулину III (клон TUJ1, BioLegend, США) и GFAP (поликлональные антитела куриные, Poly28294, BioLegend, США) в течение ночи при 4°C. После инкубации с антителами стекла с клетками трижды промывали промывочным буфером, добавляли вторичные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (поликлональные козы антимышинные антитела IgG-Alexa Fluor 488, Poly4053, BioLegend, США) для окрашивания нейронов и вторичные антитела, конъюгированные с красителем Cy2 (поликлональные ослиные антитела к куриному IgY (IgG), Polyclonal AB 2340370 Jackson ImmunoResearch, Великобритания) для окрашивания астроцитов, после чего инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Ядра окрашивали DAPI (1 мкг/мл) в течение 15 мин, отмывали и монтировали на предметные стекла с помощью фиксирующей жидкости ProLong Diamond (Invitrogen, США) и высушивали в течение ночи. Препараты исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM900 (Carl Zeiss, Германия). Фотографировали не менее 10 случайных полей зрения с использованием двух объективов: 20 $\times$ и 63 $\times$ с иммерсией (Ресурсный центр

клеточной и молекулярной биологии НИЦ “Курчатовский институт”) и подсчитывали по фотографиям общее число клеток по ядрам, число клеток с экзосомами и число экзосом на клетку (на НСК, нейрон или астроцит), после чего рассчитывали долю клеток каждого типа с экзосомами, среднее число экзосом на клетку и среднее число экзосом на клетку с экзосомами.

Облучение клеток. НСК облучали в суспензии в культуральной среде на холоде в пробирках на 2 мл на установке “ГУТ-200М” (кобальт-60) при мощности дозы 0,5 Гр/мин в дозе 4 Гр.

Анализ уровня апоптоза и распределения клеток по фазам клеточного цикла. Контрольные и облученные НСК на 16–20 пассажах высеивали по 5×10^5 в чашки Петри диаметром 6 см² и культивировали в виде прикрепляющейся культуры. Часть контрольных и облученных НСК культивировали в присутствии экзосом НСК или МСК, которые через 30 мин после облучения вносили в конечной концентрации 5 мкг/мл. Клетки собирали через 24 ч после облучения, промывали ФСБ, фиксировали 70%-ным этанолом при +4°C в течение 1 ч, используя 1 мл раствора этанола на 1×10^6 клеток, и хранили при –20°C в этом же фиксирующем растворе до исследования. Фиксированные клетки осаждали центрифугированием при 700 g, промывали ФСБ, ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в растворе для окрашивания ДНК (ФСБ pH 7.4, содержащий 0.1% тритона X-100, 0.1 моль/л ЭДТА, 0.05 мг/мл рибонуклеазы А, 50 мкг/мл йодистого пропидия) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Исходный раствор рибонуклеазы А предварительно кипятили на водяной бане в течение 10 мин для удаления возможной примеси дезоксирибонуклеаз. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла и клеток, находящихся в состоянии апоптоза, проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACSAria при длине волны возбуждения 488 нм и эмиссии 585 ± 42 нм (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии НИЦ “Курчатовский институт”). Долю апоптотических клеток оценивали как долю гиподиплоидных клеток.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием компьютерных программ OriginPro (OriginLab Corporation) и Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Статистически значимыми считали результаты при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

НСК и МСК из жировой ткани мыши, использованные для получения КС для выделения экзосом, характеризовали по экспрессии набора маркерных антигенов, специфичных для этих

Таблица 1. Характеристика препаратов НСК и МСК мыши, использованных для получения кондиционированной среды для выделения экзосом

Маркер	Доля клеток, экспрессирующих соответствующий антиген, %
НСК	
Маркер стволовых клеток нестин	86,0 ± 2
Маркер дифференцировки нейронов β-тубулин III	4,0 ± 1,5
Маркер дифференцировки астроцитов GFAP	4,8 ± 1,5
Маркер дифференцировки олигодендроцитов O4	4,1 ± 1,5
Маркер дифференцировки предшественников олигодендроцитов NG2	1,3 ± 0,5
Маркер нейральных прогениторных клеток, белок плазматической мембраны СК—проминин-1 (CD133)	2,6 ± 0,5
МСК	
Маркер стволовых клеток Sca-1	94,9 ± 1,0
Маркер МСК белок семейства тетраспанинов CD9	95,9 ± 1,5
Маркер миелоидных клеток CD45	Отсутствует
Маркер миелоидных клеток CD11b	Отсутствует

стволовых клеток. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Представленные в табл. 1 результаты позволяют заключить, что по набору поверхностных маркеров использованные для приготовления КС для получения экзосом культуры клеток полностью соответствуют характеристикам НСК и МСК соответственно.

Характеристика препаратов экзосом, полученных из КС НСК и МСК, представлена на рис. 1. Приведенные результаты позволяют заключить, что препараты экзосом стволовых клеток, полученные из КС НСК и МСК мыши для проведения исследования, полностью соответствовали параметрам, описанным ранее [21]: они имели характерную округлую форму и двойную мембрану по данным крио-ПЭМ (рис. 1, а, д), средний размер экзосом НСК по данным динамического светорассеяния составил 50.8 ± 0.1 нм, а МСК — 68.1 ± 3.8 нм (рис. 2, б, е). По данным проточной цитометрии практически все экзосомы были положительны по маркерам CD9/CD63 и TSG101 (рис. 1, в, г, ж, з). Совокупность представленных данных позволяет заключить, что полученные и использованные в дальнейших экспериментах экстракционные микровезикулы соответствуют всем требованиям, предъявляемым к экзосомам.

Исследование накопления экзосом НСК и МСК в головном мозге мышей. Для исследования накопления и анализа локализации экзосом НСК и МСК мыши в коре и гиппокампе головного мозга интактных животных им интраназально ежедневно раз в день в течение 2 сут вводили препараты

экзосом, окрашенных флуоресцентным красителем РКН26. Через 24 ч животных подвергали эвтаназии, извлекали мозг, готовили препараты мозга, окрашивали ядра клеток красителем DAPI и проводили исследование образцов с помощью флуоресцентной микроскопии. Полученные результаты представлены на рис. 2 и рис. 3.

Показано, что при интраназальном введении мышам окрашенные красителем РКН26 экзосомы НСК мышей проникают в головной мозг (см. рис. 2) и через 24 ч после введения регистрируются в коре головного мозга и гиппокампе (рис. 2, б, г) и локализуются в перинуклеарной области клеток по границе ядер, окрашенных красителем DAPI (рис. 2, в, д).

Аналогичные данные по накоплению экзосом в мозге были получены при интраназальном введении мышам экзосом МСК мыши (см. рис. 3).

Как следует из представленных на рис. 3 данных, МСК мышей, окрашенные РКН26, так же как и экзосомы НСК, через 24 ч после интраназального введения обнаруживались и в коре и гиппокампе мышей и локализовались в перинуклеарной области клеток мозга. Полученные результаты свидетельствуют об эффективной доставке экзосом НСК и МСК в головной мозг мышей при интраназальном введении этих микровезикул, их проникновении в часть клеток гиппокампа и коры и локализации в клетках мозга в прилегающей к клеточному ядру области.

Для исследования накопления и локализации экзосом НСК и МСК в клетках мозга разных типов было изучено взаимодействие экзосом

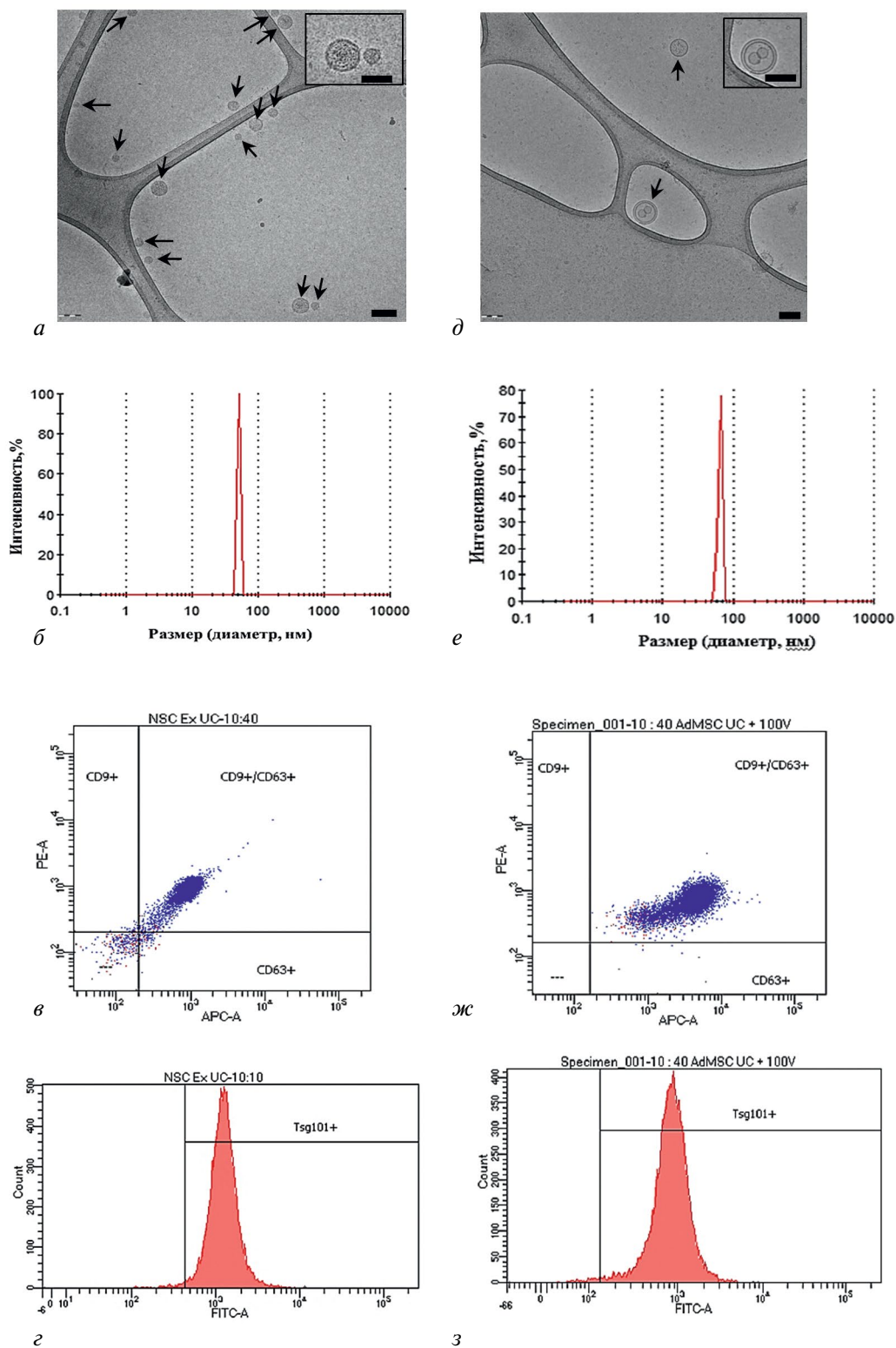


Рис. 1. Характеристика экзосом, выделенных из культуральной среды, кондиционированной НСК (*a – з*) и МСК (*e – з*); *a, д* – морфология экзосом, данные крио-ПЭМ, масштабный отрезок – 100 нм; *б – е* – распределение экзосом по размеру по данным динамического светорассеяния; *в, ж* – экспрессия маркеров CD9/CD63 при двойном окрашивании экзосом антителами к указанным маркерам; *з, 3* – экспрессия маркера TSG101 по данным проточной цитометрии.

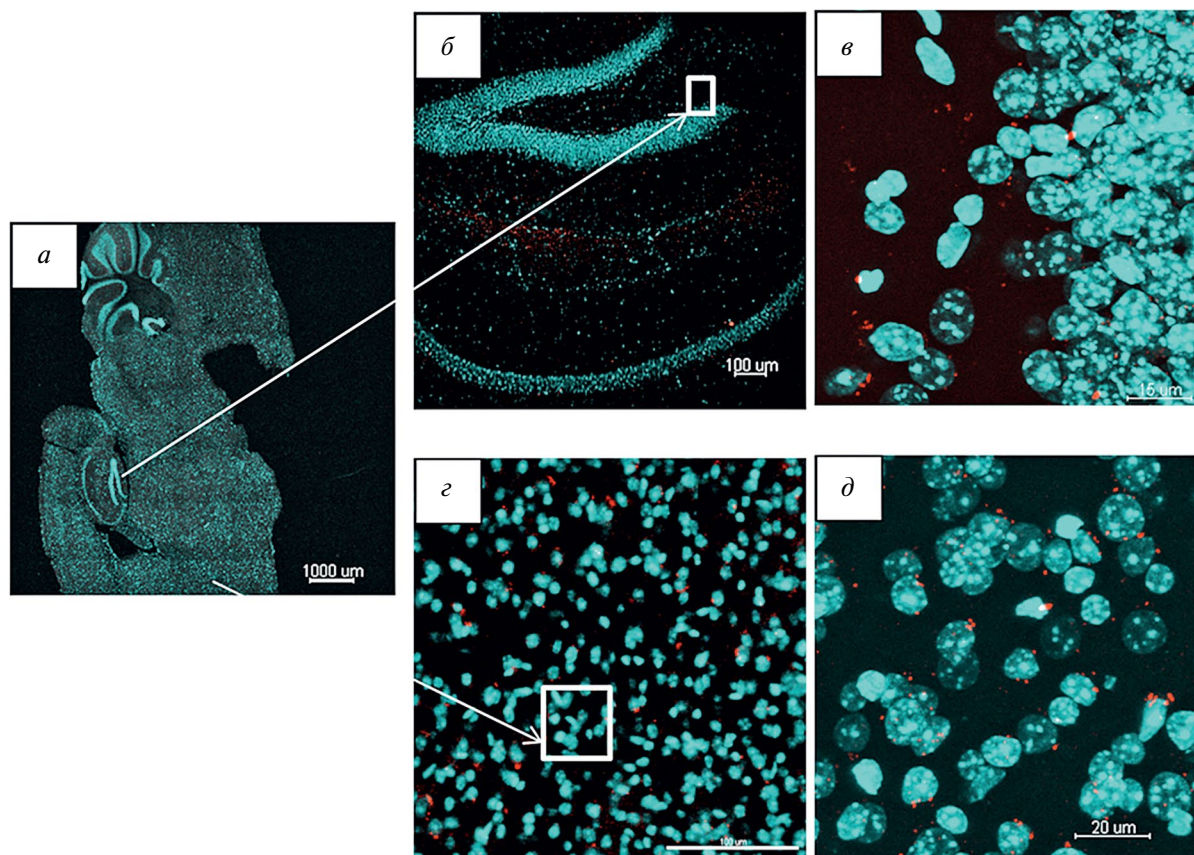


Рис. 2. Микрофотографии препаратов головного мозга мыши через 24 ч после интраназального введения экзосом НСК мыши. Меченные красителем РКН26 экзосомы (красный) НСК мыши визуализировали на парасагитальных срезах мозга (*а*) для обнаружения их присутствия в гиппокампе (*б*, *в*) и коре (*з*, *д*). Z-stacks с увеличением 20× (*б*, *з*) и 60× (*в*, *д*). Ядра окрашены DAPI (голубой).

с культивируемыми НСК, а также с нейронами и астроцитами, дифференцированными из культивируемых НСК мыши. В культивируемых НСК экзосомы, выделенные и из КС НСК, и из КС МСК и окрашенные красителем РКН26, визуализировались по периферии ядер НСК, окрашенных красителем DAPI (рис. 4).

Присутствие экзосом НСК и МСК в нейронах обнаруживали лишь в небольшом числе клеток, их локализация также соответствовала перинуклеарной области тела нейронов (рис. 5). В отростках нейронов экзосомы обнаружены не были.

Накопление экзосом НСК и МСК в астроцитах, особенно экзосом НСК, обнаруживали в большем числе клеток, чем при исследовании их накопления в нейронах (см. рис. 5). В астроцитах, так же как и в других клетках, экзосомы располагались по границе ядер, и, кроме того, в цитоплазме клеток (см. рис. 5). При этом в астроцитах были хорошо видны окрашенные крупные везикулы, по-видимому, эндосомы, содержащие окрашенные РКН26 экзосомы, что позволяет предполагать, что

интернализация экзосом в этих клетках осуществляется по механизму эндоцитоза.

Количественные данные по особенностям накопления экзосом НСК и МСК в культивируемых клетках мозга мыши представлены в табл. 2.

Показано, что через 24 ч после добавления флуоресцентно меченных экзосом НСК в концентрации 5 мкг/мл к культуре клеток НСК доля клеток с экзосомами была достоверно выше после добавления экзосом МСК ($p < 0.05$). При этом среднее число экзосом на клетку было близким для экзосом НСК и экзосом МСК. Среднее число экзосом на НСК с экзосомами составило 3.2 ± 0.3 после культивирования с экзосомами НСК и 2.3 ± 0.2 после культивирования с экзосомами МСК. Таким образом, в НСК экзосомы МСК накапливались большим числом клеток, но среди НСК с экзосомами более высокое число экзосом наблюдали при культивировании НСК с экзосомами НСК.

При культивировании экзосом НСК и МСК с нейронами и астроцитами, дифференцированными из НСК, в той же концентрации через 24 ч

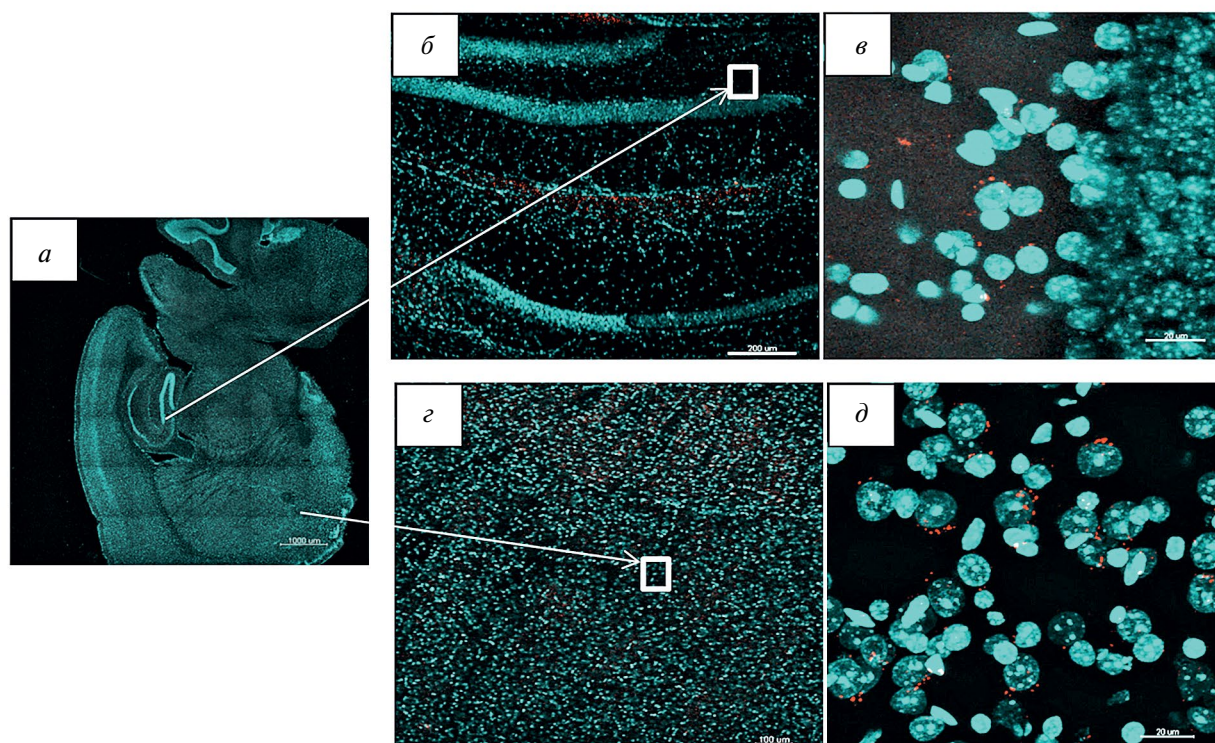


Рис. 3. Микрофотографии головного мозга мыши через 24 ч после интраназального введения экзосом МСК мыши. Меченные красителем РКН26 экзосомы (красный) МСК мыши визуализировали на парасагитальных срезах мозга (а) для обнаружения их присутствия в гиппокампе (б, в) и коре (г, д). Z-stacks с увеличением 20× (б, г) и 60× (в, д).

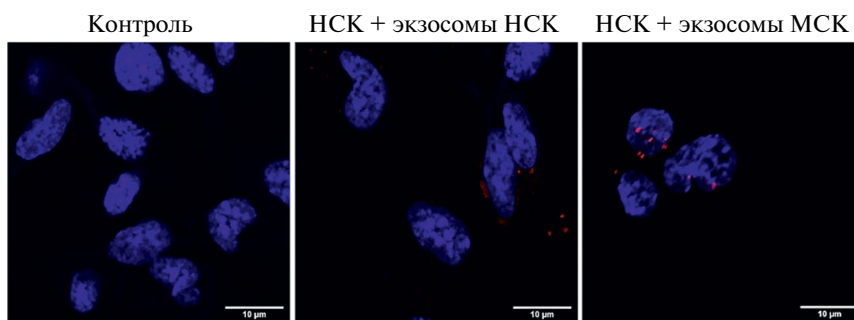


Рис. 4. Микрофотографии культуры НСК мыши через 24 ч культивирования без (контроль) и в присутствии экзосом НСК и МСК, меченных красителем РКН26, увеличение 63×. Ядра окрашены DAPI (голубой).

культивирования доля нейронов с экзосомами МСК также была более высокой, чем при культивировании с экзосомами НСК. Число экзосом на нейрон также было достоверно более высоким при добавлении экзосом МСК.

Доля астроцитов с экзосомами НСК и МСК была одинакова, но накопление экзосом на клетку было достоверно более высоким при культивировании клеток с экзосомами НСК, чем при культивировании с экзосомами МСК.

Анализируя данные табл. 2, необходимо также отметить, что исследованные типы клеток мозга в равной мере накапливали экзосомы МСК, а экзосомы НСК наиболее активно накапливались астроцитами, в то время как нейроны накапливали экзосомы НСК наименее активно.

Таким образом, накопление экзосом МСК в разных типах клеток мозга происходит с близкой эффективностью, в то время как накопление экзосом НСК различалось для разных типов клеток

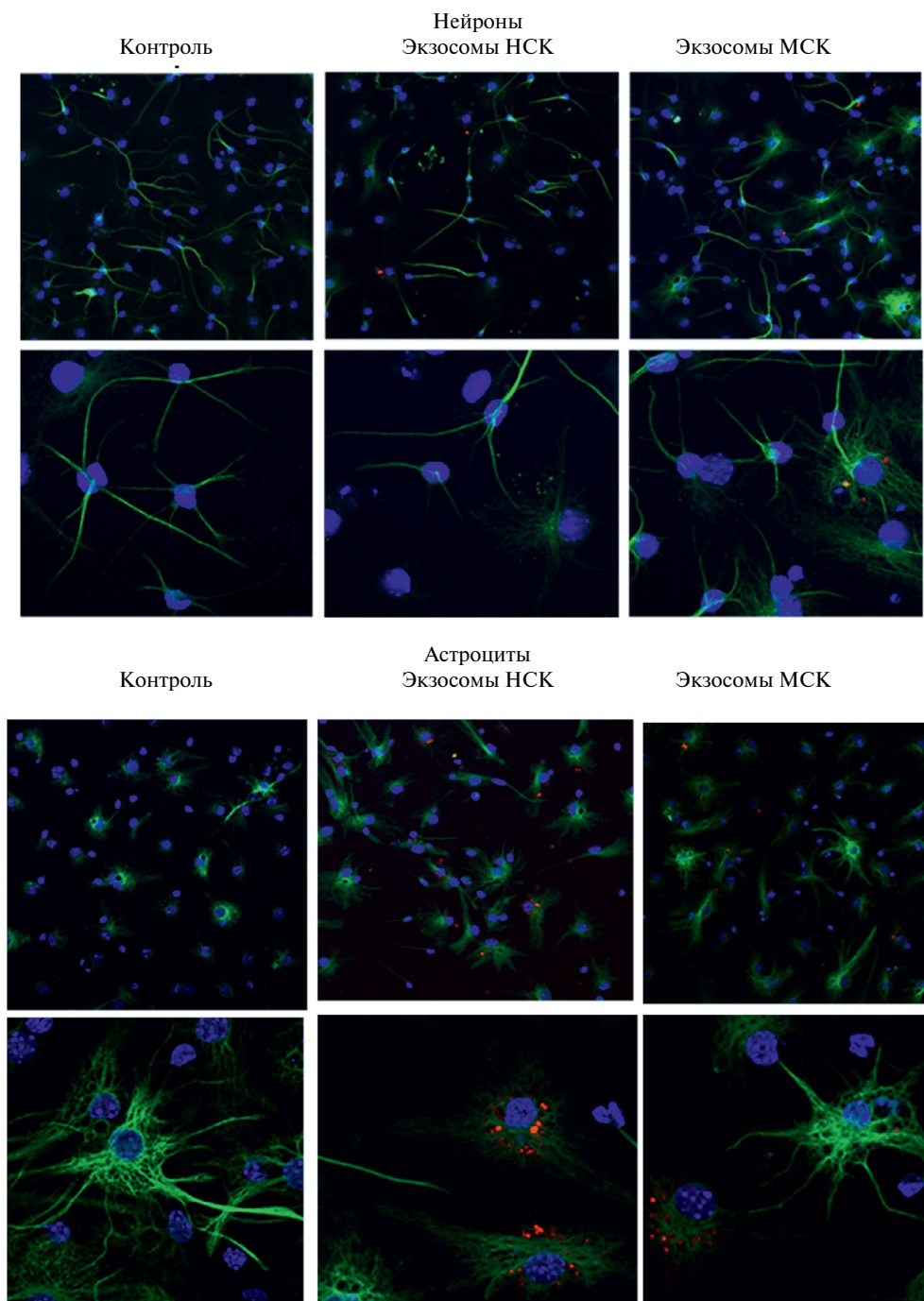


Рис. 5. Микрофотографии культуры нейронов и астроцитов через 24 ч культивирования без (контроль) и в присутствии экзосом НСК и МСК, меченных красителем PKH26. Для микрофотографий нейронов и астроцитов увеличение: верхний ряд – 20×, нижний – 63×. Нейроны и астроциты получены при дифференцировке из НСК мыши. Зеленое окрашивание на микрофотографиях нейронов соответствует маркеру нейронов белку бета-тубулину III, а на микрофотографиях астроцитов – маркеру астроцитов белку GFAP. Ядра окрашены DAPI (голубой).

мозга и наиболее активным было в астроцитах, а минимальным в нейронах.

Экзосомы стволовых клеток могут регулировать активность клеток головного мозга и оказывать

защитное влияние при действии ряда повреждающих факторов. Поэтому далее было изучено влияние исследуемых микровезикул на параметры клеточного цикла и уровень апоптоза НСК при

Таблица 2. Количественный анализ накопления экзосом НСК (эНСК) и МСК (эМСК) в культивируемых клетках мозга мышей. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего, для всех групп *n* = 10.

Тип клеток	Доля клеток, %		Среднее число экзосом на клетку, шт.		Среднее число экзосом на клетку для клеток с экзосомами, шт.	
	с эНСК	с эМСК	с эНСК	с эМСК	с эНСК	с эМСК
НСК	28,3 ± 1,7	38,2 ± 0,1*	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1	3,2 ± 0,3	2,3 ± 0,2*
Нейроны	11,2 ± 1,9#	33,7 ± 8,4*	0,2 ± 0,0#	1,0 ± 0,2*	2,0 ± 0,3#	2,7 ± 0,6
Астроциты	41,1 ± 4,7	37,2 ± 3,8	5,1 ± 0,7	1,3 ± 0,2*	8,4 ± 1,3	3,5 ± 0,4*

* — отличия между показателями доли клеток с эНСК и с эМСК и для числа эНСК и эМСК на клетку статистически значимы, *p* < 0.05; # — отличия показателя для нейронов от НСК и астроцитов статистически значимы, *p* < 0.05.

действию облучения. Полученные результаты представлены на рис. 6.

Показано, что облучение культуры НСК в дозе 4 Гр через 24 ч сопровождалось накоплением клеток в фазе G₀/G₁ и снижением их количества в фазах S и G₂/M, что свидетельствует о блоке прохождения клеточного цикла в фазе G₀/G₁ через 24 ч после облучения (рис. 6, а, б). Культивирование облученных в дозе 4 Гр НСК в присутствии экзосом и НСК, и МСК в течение 24 ч не приводило к изменению параметров клеточного цикла облученных НСК.

При анализе уровня апоптоза НСК, выявляемого по доле гиподиплоидных клеток, было обнаружено увеличение количества клеток в состоянии апоптоза с 1.4 ± 0.1% до 5.9 ± 0.7% через 24 ч после облучения НСК в дозе 4 Гр. Культивирование облученных НСК в присутствии экзосом НСК приводило к статистически значимому снижению уровня апоптоза до 3.7 ± 0.5% (*p* = 0.04), а в присутствии экзосом МСК — только к незначительному снижению уровня апоптоза до 4.5 ± 0.7% соответственно, который, однако, при действии и экзосом НСК, и экзосом МСК оставался выше уровня контроля (рис. 6, а — г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование позволило показать, что при интраназальном введении мышам препаратов гомологичных экзосом — экзосом НСК и МСК мыши — эти экстраклеточные микровезикулы через 24 ч после введения обнаруживаются в головном мозге и коре, и в гиппокампе — в тех областях мозга, которые связаны с выполнением когнитивных функций. Полученные данные о быстром появлении экзосом СК в разных отделах мозга подтверждают способность этих микровезикул эффективно преодолевать гематоэнцефалический барьер. Следует отметить, что при терапевтическом использовании экзосом для снижения/предупреждения развития пострadiационного

нейровоспаления и нарушения когнитивных функций после облучения головы мышей введение экзосом продолжали длительно — в течение 4-х недель по 2–3 раза в неделю с интервалом 1–2 дня между введениями [22]. Учитывая полученные результаты о поступлении экзосом в мозг, можно заключить, что такая схема введения обеспечивала длительное воздействие биологически активных веществ, транспортируемых экзосомами СК, на клетки мозга облученных животных, в том числе в отдаленный период, когда развиваются нейродегенеративные осложнения, обусловленные развитием нейровоспаления, что и обеспечивало предупреждение развития патологии.

В модельных экспериментах, выполненных на культивируемых клетках мозга — НСК и дифференцированных из НСК нейронах и астроцитах, — показано, что в культуре эти клетки накапливают экзосомы, которые обнаруживаются в перинуклеарной области клеток. Ранее нами было показано аналогичное накопление экзосом СК в перинуклеарной области культивируемых клеток микроглии [25].

В литературе обсуждается, по крайней мере, два механизма переноса экзосом в клетки-мишени. С одной стороны, допускается возможность слияния двуслойной мембраны экзосом с мембраной клетки, с другой стороны, рассматривается процесс переноса экзосом в клетки в результате эндоцитоза этих микровезикул. Последний механизм получил подтверждение в исследовании, выполненном Т. Тяп и соавторами с использованием прижизненной микроскопии на клетках феохромоцитомы крыс линии PC12 — клеток нейронального происхождения, — в котором было показано, что экзосомы интернализуются клетками по механизму эндоцитоза, обнаруживаются в эндоцитарных везикулах и транспортируются ими в перинуклеарную область клеток [26]. Полученные нами данные о локализации экзосом в культивируемых клетках мозга разных типов в перинуклеарной области клеток, полностью коррелируют с представленными

в этой работе результатами и позволяют полагать, что транслокация экзосом СК в клетки мозга происходит в результате их эндоцитоза. В астроцитах показано образование напоминающих эндосомы крупных везикул, окрашенных РН26, и в цитоплазме, и в перинуклеарной области клеток.

Защитное действие экзосом СК разного происхождения продемонстрировано при использовании разных моделей, в том числе при облучении в процессе лучевой терапии для снижения повреждения нормальных тканей [27]. Механизм защитного действия экзосом связывают с регуляцией пролиферации облученных клеток и снижением их гибели. Защитное действие экзосом МСК от апоптоза, вызванного окислительным стрессом, показано в первичной культуре нейронов [28]. В этой же работе авторы показали возможность стимуляции ремиелинизации нейронов с помощью экзосом после демиелинизации клеток лизофосфатидилхолином. В настоящей работе через 24 ч после культивирования облученных в дозе 4 Гр НСК в присутствии экзосом не было обнаружено восстановления пострадиационного блока клеточного цикла этих клеток. Однако было показано снижение уровня апоптоза НСК при культивировании облученных клеток в присутствии экзосом НСК и аналогичная тенденция к снижению уровня апоптоза НСК показана при действии экзосом МСК, что подтверждает представления о снижении гибели клеток по механизму апоптоза при действии экзосом. Следует отметить, что культура нейральных стволовых/нейральных прогениторных клеток характеризуется высокой радиочувствительностью: 50% клеток погибает через 7 сут после облучения культуры в дозе 1.2 Гр, а при дозе 4 Гр выживает только 10% клеток [23]. Поэтому даже незначительное снижение уровня апоптоза при этой дозе может иметь значение для повышения выживаемости НСК.

Ранее, кроме того, была показана возможность регуляции активности микроглии при действии экзосом НСК [25], что может определять еще один механизм действия экзосом НСК.

Экзосомы МСК, так же как и сами МСК, могут играть важную регуляторную роль в снижении уровня нейровоспаления, регулируя провоспалительную активность микроглии и макрофагов. Действительно, было показано снижение уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов в селезенке мышей при введении ЛПС и культивируемых клеток активированной ЛПС микроглии при действии экзосом МСК, но экзосомы НСК такой активностью не обладали [25].

В полученных в настоящей работе результатах показан перенос экзосом гомологичных СК в головной мозг мыши и их накопление в перинуклеарной области клеток мозга. Аналогичные

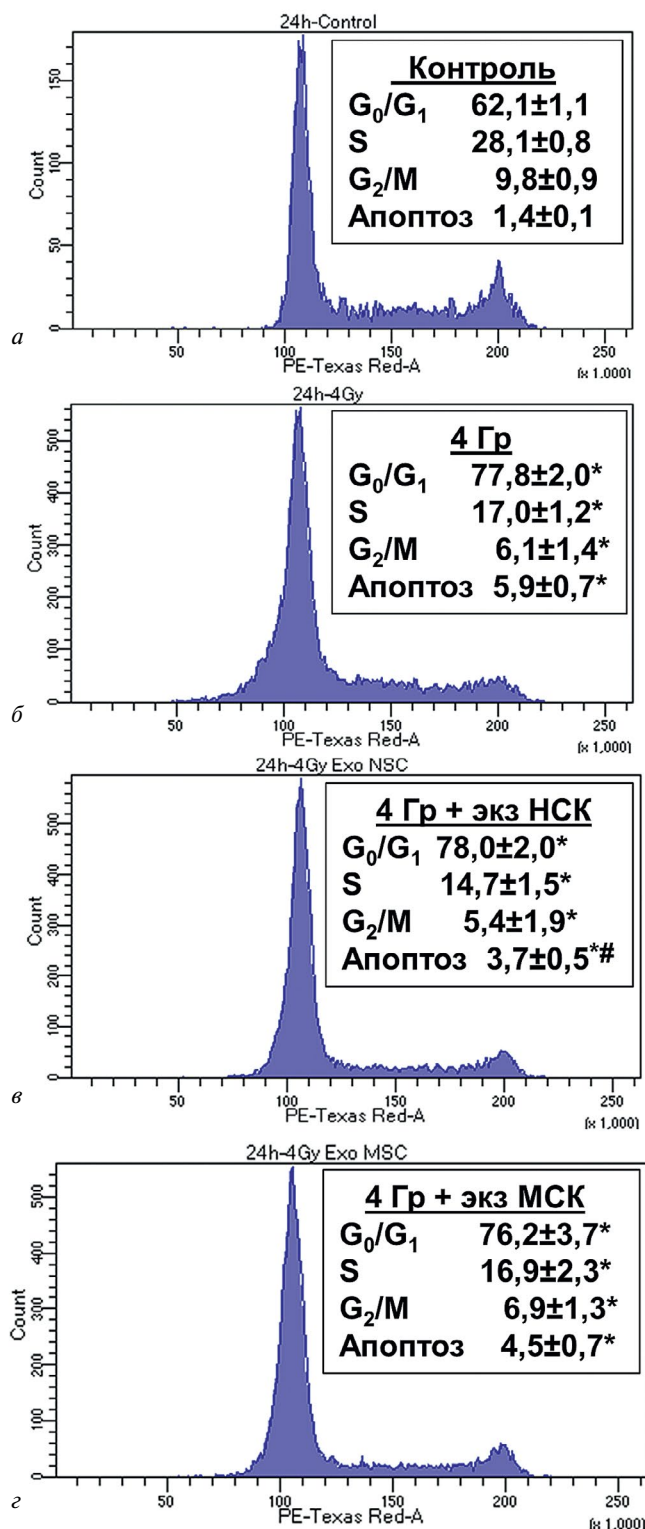


Рис. 6. Параметры клеточного цикла и уровень апоптоза контрольных (а) и облученных в дозе 4 Гр НСК (б) и НСК, которые после облучения культивировали в присутствии экзосом НСК (в) или МСК (г) мыши через 24 ч после воздействия.

результаты получены при исследовании локализации экзосом СК в культивируемых клетках мозга. Совокупность этих данных, безусловно, свидетельствует о важной регуляторной роли биологически активных веществ, транспортируемых экзосомами СК, в защитном действии экзосом и их способности стимулировать процессы регенерации.

Кроме того, накопление экзосом в мозге свидетельствует о возможности регуляции активности клеток головного мозга в результате лиганд-рецепторных взаимодействий между молекулами мембраны клеток мозга и мембраны экзосом, приводящих к активации специфических сигнальных каскадов. Эти механизмы остаются мало изученными, но могут быть наиболее эффективными при использовании гомологичных экзосом.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что механизмы стимуляции процессов регенерации с помощью экзосом СК после повреждения мозга разнообразны и реализуются, во-первых, по нескольким механизмам, а во-вторых, могут зависеть от происхождения экзосом и требуют дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Показано накопление экзосом, полученных из культуральной среды, кондиционированной НСК и МСК мышей линии C57BL/6, в гиппокампе и коре головного мозга при их интраназальном введении сингенным мышам. Локализовались экзосомы в перинуклеарной области клеток мозга.

2. Обнаружено, что при культивировании НСК, а также нейронов и астроцитов, полученных при дифференцировке НСК, с экзосомами НСК эти микровезикулы более интенсивно накапливаются в НСК и астроцитах и локализуются в перинуклеарной области клеток, а в астроцитах и цитоплазме.

3. Показано, что накопление экзосом МСК в разных типах клеток мозга происходит с близкой эффективностью, в то время как накопление экзосом НСК различалось для разных типов клеток мозга и наиболее активным было в астроцитах, а минимальным в нейронах.

4. Культивирование облученных в дозе 4 Гр НСК в присутствии экзосом как НСК, так и МСК мыши не приводит к восстановлению параметров клеточного цикла через 24 ч после воздействия, но обеспечивает снижение количества клеток в состоянии апоптоза при действии экзосом НСК, аналогичная тенденция наблюдается при действии экзосом МСК.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

НИЦ “Курчатовский институт”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все манипуляции с животными были проведены с соблюдением требований, изложенных в директиве по охране животных, используемых в научных целях (2010/63/ EU от 22.09.2010), а также в соответствии с правилами, утвержденными комиссией по биоэтике НИЦ “Курчатовский институт” (протокол от 25.01.2023 № 02-2 пр).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang L., Yang J., Li G., Li Y., Wu R., Cheng J., Tang Y. // *Molecular. neurobiology*. 2017. V. 54. № 2. P. 022–1032.
2. Raber J., Rola R., LeFevour A., Morhardt D., Curley J., Mizumatsu S., VandenBerg S.R., Fike J.R. // *Radiation research*. 2004. V. 162. № 1. P. 39–47.
3. Blurton-Jones M., Kitazawa M., Martinez-Coria H., Castello N.A., Muller F.J., Loring J.F., Yamasaki T.R., Poon W.W., Green K.N., LaFerla F.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 32. P. 13594–13599.
4. Acharya M.M., Christie L.A., Lan M.L., Giedzinski E., Fike J.R., Rosi S., Limoli C.L. // *Cancer Res*. 2011. V. 71. № 14. P. 4834–4845.
5. Joo K.M., Jin J.K., Kang B.G., Lee S.J., Kim K.H., Yang H., Lee Y.A., Cho Y.J., Im Y.S., Lee D.S., Lim D.H., Kim D.H., Um H.D., Lee S.H., Lee J.I., Nam D.H. // *PLoS. One*. 2012. V. 7. № 2. P. e25936.
6. Haus D.L., Lopez-Velazquez L., Gold E.M., Cunningham K.M., Perez H., Anderson A.J., Cummings B.J. // *Exp. Neurol*. 2016. V. 281. P. 1–16.
7. Laperle A., Alexandra V., Avalos P., Lu B., Wu A., Fulton A., Ramirez S., Garcia V.J., Bell Sh., Ho R., Lawless G., Roxas K., Shahin S., Shelest O., Svendsen S., Wang Sh., Svendsen C.N. // *Stem Cell Reports*. 2023. V. 18. № 8. P. 1629–1642.
8. Lopatina T., Kalinina N., Karagyaur M., Stambolsky D., Rubina K., Revischin A., Pavlova G., Parfyonova Y., Tkachuk V. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 3. P. e17899.
9. McLaughlin M.M., Marra K.G. // *Organogenesis*. 2013. V. 9. № 2. P. 79–81.
10. Su Y., Xu C., Cheng W., Zhao Y., Sui L., Zhao Y. // *Int. J. Mol. Sci*. 2023. V. 24. № 2. P. 1277.
11. Vogel A., Upadhyay R., Shetty A.K. // *EBioMedicine*. 2018. V. 38. P. 273–282.
12. Jin M., Zhang S., Wang M., Li Q., Ren J., Luo Y., Sun X. // *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2022. V.10. P. 980548.
13. Cherian S.G., Narayan S.K., Arumugam M. // *Brain Res*. 2023. V. 1803. P. 148228.
14. Sun X., Jung J.H., Arvola O., Santoso M.R., Giffard R.G., Yang P.C., Stary C.M. // *Front Cell Neurosci*. 2019. V. 13. P. 394.

15. *Chen L.Y., Kao T.W., Chen C.C., Niaz N., Lee H.L., Chen Y.H., Kuo C.C., Shen Y.A.* // *Cells*. 2023. V. 12. № 7. P. 1018.
16. *Smith S.M., Giedzinski E., Angulo M.C., Lui T., Lu C., Park A.L., Tang S., Martirosian V., Ru N., Chmielewski N.N., Liang Y., Baulch J.E., Acharya M.M., Limoli C.L.* // *Stem Cells Transl Med*. 2020. V. 9. № 1. P. 93–105.
17. *Baulch J.E., Acharya M.M., Allen B.D., Ru N., Chmielewski N.N., Martirosian V., Giedzinski E., Syage A., Park A.L., Benke S.N., Parihar V.K., Limoli C.L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 17. P. 4836–4841.
18. *Ioannides P., Giedzinski E., Limoli C.L.* // *J. Cancer Metastasis Treat*. 2020. V. 6. № 15.
19. *Liu M., Yang Y., Zhao B., Yang Y., Wang J., Shen K., Yang X., Hu D., Zheng G., Han J.* // *Front Cell Dev Biol*. 2021. V. 9. P. 693782.
20. *Forsberg M.H., Kink J.A., Hematti P., Capitini C.M.* // *Front. Cell Dev. Biol*. 2020. V. 8. P. 665.
21. *Ratushnyak M.G., Semochkina Y.P., Yastremsky E.V., Kamyshinsky R.A.* // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2022. V.173. № 4. P. 544–552.
22. *Ratushnyak M.G., Zhirnik A.S., Smirnova O.D., Semochkina Y.P., Parfenova A.A., Goryunov K.V., Silachev D.N., Moskaleva E.Y.* // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2022. V. 174. № 4. P. 571–577.
23. *Посыпанова Г.А., Ратушняк М.Г., Семочкина Ю.П., Абишева А.А., Москалева Е.Ю.* // *Цитология*. 2019. Т. 61. № 10. С. 806–816.
24. *Rodina A.V., Semochkina Y.P., Vysotskaya O.V., Glukhov A.I., Moskaleva E.Y.* // *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci*. 2021. V. 48. P. 2060–2070.
25. *Ратушняк М.Г., Шапошникова Д.А., Высоцкая О.В.* Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1 / Под ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. С. 283–289.
26. *Tian T., Wang Y., Wang H., Zhu Z., Xiao Z.* // *J. Cell. Biochem*. 2010. V. 111. № 2. P. 488–96.
27. *Nanduri L.S.Y., Duddempudi P.K., Yang W-L., Tamarat R., Guha C.* // *Front. Pharmacol*. 2021. V. 12. P. 662437.
28. *Farinazzo A., Turano E., Marconi S., Bistaffa E., Bazzoli E., Bonetti B.* // *Cytotherapy*. 2015. V. 17. № 5. P. 571–578.

Localization of the Stem Cells Exosomes in the Brain and in the Cultured Mouse Brain Cells

M. G. Ratushnyak¹, A. V. Rodina¹, D. A. Shaposhnikova¹, and E. Yu. Moskaleva¹

¹*NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia*

The possibility of transferring exosomes of neural (NSC) and mesenchymal (MSC) mouse stem cells labeled with the fluorescent dye PKH26 into the cerebral cortex and hippocampus after their intranasal administration to mice, and the accumulation and localization of exosomes in cultured brain cells of various types, and also the effect of exosomes of NSCs and MSCs on the parameters of the cell cycle and the level of apoptosis of cultured NSCs after irradiation at a dose of 4 Gy. The accumulation of exosomes obtained from the culture medium of NSCs and MSCs from the adipose tissue of C57BL/6 mice was shown both in the hippocampus and in the cerebral cortex after their intranasal administration to syngeneic mice. Exosomes were found predominantly in the perinuclear region of brain cells. When culturing NSCs and differentiated from NSCs neurons and astrocytes, exosomes accumulate more intensively in astrocytes and are also localized in the perinuclear region of cells, and in astrocytes also in the cytoplasm. Exosomes accumulated most intensively in astrocytes. When studying the effect of stem cell exosomes on the cell cycle of irradiated NSCs, it was shown that the cultivation of NSCs irradiated at a dose of 4 Gy in the presence of exosomes of both NSCs and mouse MSCs does not lead to the restoration of cell cycle parameters, but provides a decrease the number of apoptotic cells in 24 h after exposure.

Keywords: exosomes, neural stem cells, mesenchymal stem cells, brain, neurons, astrocytes, gamma irradiation, apoptosis, cell cycle, mice