

УДК 57.085.23

## ПОЗИТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ҮВ-1 И МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ПЕРВИЧНУЮ КУЛЬТУРУ ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ ACE2-РЕЦЕПТОРА

© 2025 г. Д. Ю. Жданова<sup>а,\*</sup>, А. В. Чаплыгина<sup>а</sup>, Н. В. Бобкова<sup>а</sup>,  
Р. А. Полтавцева<sup>б</sup>, Г. Т. Сухих<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пущино, 142290 Россия

<sup>б</sup>Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ, Москва, 117997 Россия

\*e-mail: ddzhdanova@mail.ru

Поступила в редакцию 30.08.2024

После доработки 06.11.2024

Принята к печати 14.11.2024

Несмотря на то что в настоящее время ситуация с заболеваемостью COVID-19 не является чрезвычайной, в мире продолжают появляться все новые штаммы коронавируса SARS-CoV-2, некоторые из них обладают большей вирулентностью по сравнению с исходным вирусом. Исследования показали, что высокий риск тяжелого течения COVID-19 имели пациенты, страдающие болезнью Альцгеймера (БА), однако молекулярно-клеточный механизм такой предрасположенности не до конца выяснен. В данной работе была разработана клеточная модель начальной стадии COVID-19 на первичной культуре гиппокампа мышей 5xFAD, модели семейной формы БА, с использованием специфического ингибитора ACE2-рецептора MLN-4760. В основу этой модели положен экспериментально доказанный факт снижения активности рецепторов ACE2, которое наблюдается у пациентов с COVID-19 вследствие интернализации рецептора внутрь клетки после связывания с коронавирусом. С использованием иммунохимического окрашивания специфическими антителами для выявления нейронов (маркер MAP2) и астроглии (маркер GFAP) установлено, что через 24 ч после добавления в культуральную среду MLN-4760 (0.2 нмоль на 1 мл среды) отмечалось уменьшение плотности астроцитов и нейронов, изменение их морфологии с резким сокращением длины и плотности нейритов, что приводило к гибели клеточной культуры. При этом трансгенная культура оказалась более чувствительна к воздействию ингибитора по сравнению с контрольной культурой гиппокампа нативных мышей. Во второй части исследования были изучены возможности предотвращения разрушительного действия MLN-4760 на состояние гиппокампальной культуры. Показано, что применение ҮВ-1, эндогенного полифункционального стресс-белка, способствовало восстановлению структуры культуры клеток и приводило к стимуляции роста нейритов и активации астроглии. Введение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) после блокады ACE2 также сопровождалось улучшением выживаемости культур, восстановлением морфологии клеток, увеличением плотности астроцитов и нейронов. Полученные результаты свидетельствуют, что ҮВ-1 и клеточная терапия с использованием ММСК являются перспективными вариантами для разработки новых эффективных методов предотвращения патологического влияния вируса на мозговую ткань, что является важным звеном в лечении инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера, COVID-19, ACE2, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки Вартонова студия пупочного канатика человека, ҮВ-1

**DOI:** 10.31857/S0233475525020062, **EDN:** UFQIWO

### ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) — одно из самых распространенных неврологических заболеваний, которое характеризуется прогрессирующим

повреждением нервных клеток в головном мозге и приводит к потере памяти, нарушению когнитивных функций, мышления, поведения и неминуемой смерти [1]. Несмотря на многочисленные исследования в этой области, точные механизмы

развития БА до сих пор полностью не определены. Основными патологическими процессами при БА являются: нарушение метаболизма бета-амилоидного (А $\beta$ ) белка, приводящее к образованию внеклеточных амилоидных бляшек в мозге, гиперфосфорилирование белка тау, вызывающее образование внутриклеточных нейрофибриллярных клубков и значительное уменьшение количества нейронов. Эти изменения вызывают воспалительные и дегенеративные процессы в мозге, влекущие прогрессирование нейродегенерации [2, 3].

С возникновением пандемии COVID-19 стало ясно, что вирус SARS-CoV-2 может поражать не только дыхательную, но и нервную систему [4], включая головной мозг [5]. Исследования показали, что более 80% пациентов имели сниженное обоняние и вкус, а более 60% из них полностью утратили данные ощущения после проявления общих симптомов [6].

Проблемы с памятью и тревожность, связанные с COVID-19, могут сохраняться в течение двух лет, а литературные данные свидетельствуют о повышенной вероятности развития БА после заражения COVID-19 [7, 8]. Пациенты с БА оказались в группе риска с тяжелым течением COVID-19 [8], а их смертность увеличилась на 16% по сравнению с больными, не страдающими БА. Повышенные уровни А $\beta$  и фосфорилированного белка тау были обнаружены в экзосомах, выделенных из крови пациентов с LongCOVID-19 [9]. Стало очевидным, что у больных БА есть определенные молекулярные механизмы, предопределяющие высокий риск заражения и смертности от COVID-19 [8–11]. В основе этой взаимосвязи могут лежать различные механизмы, одним из которых может быть воспаление, вызванное иммунным ответом на вирус, что способно привести к дальнейшему повреждению нейронов, гибель которых играет ключевую роль в патогенезе БА [12]. Существует ряд предположений, что другими факторами, усугубляющими течение COVID-19 при БА, могут быть носительство генотипа аполипопротеина Е (APOE)  $\epsilon$ 4 или повышенная активность интерферон-регулирующего фактора 5 (IRF5) [13–15]. Обоснованным является и предположение, что таким фактором может быть дисбаланс двух ветвей ренин-ангиотензиновой системы (РАС) в легких и в головном мозге с переходом на системный уровень, зависящий от активности белка ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2), существующего как в свободной растворимой форме (sACE2), так и в виде молекулы с трансмембранной локализацией. Нокаутные по гену ACE2 мыши характеризовались ухудшением памяти, снижением

нейрогенеза, ухудшением морфофункционального состояния нейронов вплоть до развития дегенерации [16–20]. Установлено, что трансмембранный ACE2 в димерной форме служит рецептором для вируса SARS-CoV-2, вызывающего COVID-19, который образует комплекс с рецептором ACE2 и, используя механизм клатринового эндоцитоза, проникает внутрь клетки хозяина, где вирус начинает размножаться [16]. Важно отметить, что место связывания вируса с ACE2 не совпадает с фрагментом молекулы ACE2, проявляющей ферментативную активность [21]. В мозге пациентов с БА отмечается усиление экспрессии белка ACE2 по сравнению со здоровыми людьми, возможно, поэтому у пациентов с БА заражение SARS-CoV-2 сопровождается более интенсивным проникновением вируса в клетки головного мозга хозяина, что и объясняет увеличенную восприимчивость больных БА к инфекции COVID-19 [22].

Разработка эффективных средств лечения любых заболеваний, в том числе и COVID-19, нуждается в их валидных моделях, животных и клеточных. Сложность моделирования COVID-19 с использованием лабораторных мышей обусловлена тем фактом, что молекула ACE2 у этих животных хотя и имеет 83% сходство в аминокислотной последовательности с человеческим ACE2, но в значительной степени утрачивает способность взаимодействовать с SARS-CoV-2, что препятствует моделированию этого заболевания у грызунов [23]. Для создания моделей заболевания COVID-19 использовались различные животные, включая нечеловеческих приматов, генетически модифицированных мышей, мышей дикого типа, сенсibilизированных векторами Ad5 или AAV, экспрессирующими ген hACE2, а также модели сирийских хомячков, хорьков, домашних птиц и домашних животных [6]. Однако все перечисленные модели требуют значительных финансовых затрат и особых условий для их создания и дальнейших исследований. Были созданы и математические модели динамики поведения SARS-CoV-2 в клеточных линиях, но они также базируются на результатах заражения клеточных линий кишечника и легких человека [24].

В данном исследовании на первичной культуре гиппокампа мы предприняли попытку воспроизвести условия, с определенными ограничениями моделирующие последствия нарушения активности ACE2-рецепторов в мозге, которые наблюдаются при заражении SARS-CoV-2, используя для этого специфический ингибитор ферментативной активности ACE2 мышей – MLN-4760 [25]. Для моделирования этого процесса при БА мы использовали первичную культуру гиппокампа

мышей 5xFAD, широко распространенную модель семейной формы БА. В отличие от существующих моделей COVID-19 на трансгенных мышах со встроенным человеческим геном ACE2 и с использованием инъекции вирусных частиц [26], наша клеточная система позволяет оценить эффект вмешательства в деятельность ACE2, не требуя работы с патогенными вирусами.

Ранее в исследованиях *in vivo* и *in vitro* на животных моделях наследственной и спорадической форм БА было показано положительное влияние мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) и многофункционального белка с доменом холодового шока YB-1, которые улучшали пространственную память и снижали интенсивность нейродегенеративного процесса в нейронах [27–29]. Поэтому в данном исследовании мы изучили способность этих потенциальных терапевтических агентов влиять на последствия ингибирования ферментативной активности рецепторов ACE2 в культуре гиппокампа нетрансгенных и трансгенных мышей 5xFAD, снижение которой является одним из первых этапов воздействия вируса на клетку хозяина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение ММСК из Вартонова студня пупочного канатика.** Первичная культура ММСК была выделена из Вартонова студня пупочного канатика. Забор материала осуществлялся с письменного информированного согласия здоровых обследованных рожениц после операции кесарева сечения. Последующее выделение ММСК осуществляли в соответствии с протоколом [30]. Культивирование клеток производили в условиях 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в среде DMEM/F12 (1:1, Gibco, США) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (“ПанЭко”, Россия) в культуральных флаконах 25 см<sup>2</sup> (Corning, США). Через трое суток 50% среды заменяли на свежую. По достижении 80% конfluence клетки пассировали в соотношении 1:2. Для снятия клеток с поверхности пластика применяли 0.05% раствор трипсина (“ПанЭко”).

**Характеристика ММСК из Вартонова студня пупочного канатика.** Фенотип ММСК был охарактеризован с анализом клеточных маркеров методом проточной цитофлуориметрии. Анализ интенсивности флуоресценции осуществляли с применением проточного цитофлуориметра FACSCalibur и программного обеспечения BD CellQuest Pro (BD Biosciences, США). Клеточная популяция была выделена по параметрам

прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Оценивалась экспрессия таких маркеров, как CD34, CD44, CD45, CD90, CD105. Оценку уровня экспрессии исследуемого маркера производили по гистограмме интенсивности флуоресценции. Подробное описание характеристик ММСК представлено в нашей работе [30].

**Модель болезни Альцгеймера на мышах.** При проведении экспериментов использовались трансгенные мыши линии 5xFAD (TG6799), представляющие модель наследственной формы БА. Эти мыши коэкспрессируют шведскую (K670N/M671L), флоридскую (I716V) и лондонскую (V717I) мутации в человеческом белке APP(695), и M146L и L286V мутации в пресенилине 1, с экспрессией обоих трансгенов под Thy1 промотером. У мышей в возрасте 1.5 месяцев наблюдается высокий уровень внутриклеточного бета-амилоида, а в возрасте 4 месяцев – внеклеточные отложения этого белка. Для животных характерна синаптическая дегенерация, потеря нейронов и дефицит в пространственном обучении [31]. К шести месяцам амилоидные бляшки и глиоз обнаруживаются в коре и гиппокампе [28, 32]. Наши исследования были проведены на потомстве F1 от скрещивания носителей трансгенов с SJL/C57Bl6 животными. В возрасте 1.5 месяцев было осуществлено генотипирование будущих родителей с помощью ПЦР-анализа ДНК, выделяемого из ткани ушной раковины, как описано в [33]. По результатам ПЦР-анализа мыши подразделялись на группы трансгенных (Tg) и нетрансгенных (nTg) животных и использовались для получения новорожденных мышей, которые также генотипировались на трансгенность. Все животные содержались в клетках по 3–6 особей со свободным доступом к воде и стандартизированному корму, при температуре воздуха 21–23°C в условиях естественной освещенности. Все исследования проводились в полном соответствии с Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными и правилами надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г., № 199н).

**Получение первичной культуры гиппокампа 5xFAD мышей.** После генотипирования новорожденных мышат (на 0–1 день после рождения) и определения их принадлежности к группе Tg или nTg животных осуществляли получение жизнеспособной первичной культуры клеток гиппокампа следующим образом: после декапитации производили извлечение гиппокампа и измельчение его в холодном растворе Хэнкса с добавлением 500 мкл трипсина (0.05%), после чего пробу помещали на 5 мин на термошейкер при 37°C.

Затем добавляли 500 мкл нейробазальной среды, ресуспендировали и центрифугировали пробу в течение 3 мин при  $\sim 70g$  (1000 об/мин). Далее отбирали среду, добавляли 100 мкл нейробазальной среды и ресуспендировали осадок. Полученную суспензию наносили на дно сухих лунок 6-луночного планшета, покрытых полиэтиленмином. Планшеты помещали в  $CO_2$ -инкубатор на 1 ч при 5%  $CO_2$  и 37°C. После прикрепления клеток в лунки добавляли теплую нейробазальную среду (2 мл) и вновь помещали планшеты в  $CO_2$ -инкубатор при 37°C и 5%  $CO_2$ . На следующий день среду полностью заменяли и далее производили замену половины среды на свежую 1 раз в трое суток.

**Блокада активности рецепторов ACE2.** Для создания блокировки ACE2 был использован специфический ингибитор ACE2 MLN-4760. Концентрация MLN-4760 на протяжении всего эксперимента в каждой отдельной лунке с клетками составляла 0.2 нмоль на 1 мл в соответствии с рекомендациями производителя. Выраженный эффект добавления блокатора ACE2 анализировали через 24 ч.

**Исследование действия УВ-1 и ММСК.** Далее были проведены серии экспериментов для изучения эффектов УВ-1 и ММСК на первичные клеточные культуры гиппокампа после воздействия MLN-4760. 14-дневные Tg и nTg культуры обрабатывали ингибитором рецепторов ACE2 и через 24 ч в культуральную среду вносили выбранный терапевтический агент. Обработка УВ-1 производилась в концентрации 30 нМ, ММСК вводили в соотношении 100 ММСК на 1.5 млн клеток первичной культуры гиппокампа. Эксперименты проводили на различных клеточных культурах в трех повторах.

**Иммуноцитохимический анализ.** По окончании экспериментов клеточные культуры фиксировали в течение 10 мин 4% параформальдегидом. Затем увеличивали проницаемость мембран с помощью 0.2% раствора Triton X-100 и в течение 1 ч при комнатной температуре блокировали неспецифическое связывание с антигенами в растворе PBST (PBS + 0.1% Tween 20) + 1% бычий сывороточный альбумин (BSA) с применением 10% сыворотки осла нормализованной (Abcam, ab7475) и 5% сыворотки козла нормализованной (Invitrogen, 31872). Инкубирование с первичными антителами осуществляли в течение ночи при 4°C. После инкубации с первичными антителами проводили связывание с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными метками в течение 2 ч при комнатной

температуре. После каждой процедуры клетки отмывали 3 раза раствором PBS (pH 7.4) по 5 мин.

Идентификацию ММСК в культуре проводили по присутствию белка ядер человека, для чего дополнительно использовали Goat Anti-Mouse Fab-fragment IgG H&L (AffiniPure, 115-007-003) и далее антитела Anti-Human Nuclear Antigen (Abcam, ab191181, 1:100) и антитела Goat Anti-Mouse IgG H&L (Abcam, ab175660, 1:400). Для флуоресцентной окраски астроцитов использовали антитела Anti-GFAP (Abcam, ab4674, 1:800) и Goat Anti-Chicken IgY H&L (Alexa Fluor 488, Abcam, ab150169, 1:1000); нейронов: Anti-MAP2 antibody – Neuronal Marker (Abcam, ab32454, 1:200) и Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 594, Abcam, ab150080, 1:400). В некоторых случаях ядра клеток нейроглиальной культуры были дополнительно окрашены Hoechst 33342. Результаты иммуноцитохимических окрасок воспроизводились в трех повторах с использованием трех разных культур. Для анализа результатов окрашивания использовалась автоматизированная система JuLI Stage (NanoEnTek, Корея). Для оценки плотности культуры мы проводили ститчинг-съемку каждой лунки культурального планшета. Съемка производилась на площади  $6.7 \times 9$  мм, состоящей из 121 снимка, площадь одного снимка составляла 2 818 816 пикселей. Далее в программе ImageJ мы оценивали площадь (в пикселях), которую занимали иммунопозитивные структуры – нейроны и астроциты. Площадь одного снимка принималась за 100%, площадь иммунопозитивных структур – процент от общей площади. Для формирования генеральной совокупности исключались снимки, на которых не было клеточных культур, а также края культур, поскольку они не отражали исследуемые характеристики первичных культур. Во всех случаях настройки камеры микроскопа (gain, offset) и т.д. были одинаковыми. Применялись стандартные процедуры измерения площадей с использованием порогового значения. Чтобы отличить клетки от фона, была использована внутренняя пороговая функция (Threshold). В случае достаточно ярких иммунофлуоресцентных окрасок не возникает проблем с отделением клеток от фона. В случае перекрывающихся окрасок (двойная иммунопозитивность астроглии и нейронов) производилась сегментация изображения методом водораздела по пороговому уровню серого.

**Статистический анализ.** Статистический анализ результатов проводился с помощью программы Sigma Plot 12.5. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего; результаты представлены на графиках

в виде вертикальных диаграмм рассеяния (по 200 изображений). Гипотеза о нормальности распределения проверялась с помощью теста Шапиро–Уилка. Для сравнения различий между группами и определения статистической значимости использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным сравнением групп по методу Данна или Бонферрони.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Блокада ACE2

В нашем исследовании мы воспроизвели снижение активности рецепторов ACE2 с помощью ингибитора мышинового ACE2 MLN-4760 в культуре клеток Tg и nTg животных. Результаты анализа флуоресцентной окраски с использованием специфических для нейронов и астроцитов антител свидетельствуют, что после воздействия MLN-4760 наблюдалось достоверное снижение процента площадей специфической окраски как для нейронов, так и для астроглии, это говорит о снижении их плотности в культурах гиппокампа Tg и nTg мышей 5xFAD (рис. 1). Культура, подвергнутая 24-часовой экспозиции блокатора, резко меняла свою морфологию (рис. 2). Как у нейронов, так и у астроцитов сокращалось количество отростков, астроциты приобретали веретенообразную форму. Встречались астроциты, которые были одновременно иммунопозитивны как к GFAP, так и к маркеру MAP2, который может сверхэкспрессироваться, когда астроцитарные клетки претерпевают серьезные цитоскелетные изменения [34], или при патологических состояниях и формировании реактивной астроглии [35]. Результаты статистического анализа изменения плотности нейронов и астроцитов в нативных и трансгенных культурах под воздействием MLN-4760 представлены на рис. 1. Плотность астроцитов (%) в нативных контрольных культурах изменялась с  $50.6 \pm 0.4\%$  до  $20.3 \pm 0.4\%$  после применения блокатора. В трансгенных культурах 5xFAD мышей астроцитарная плотность изменялась от значения  $66.6 \pm 0.5\%$  в интактных культурах до  $14.6 \pm 0.4\%$  в культурах, подвергнутых воздействию ACE2 ингибитора. Под влиянием MLN-4760 наблюдалось снижение плотности нейронов в нетрансгенных культурах с  $46.0 \pm 0.5\%$  в интактных до  $12.0 \pm 0.3\%$  после блокады, и в трансгенных культурах 5xFAD с  $35.2 \pm 0.4\%$  в интактных до  $9.5 \pm 0.2\%$  после блокады.

### Действие YB-1

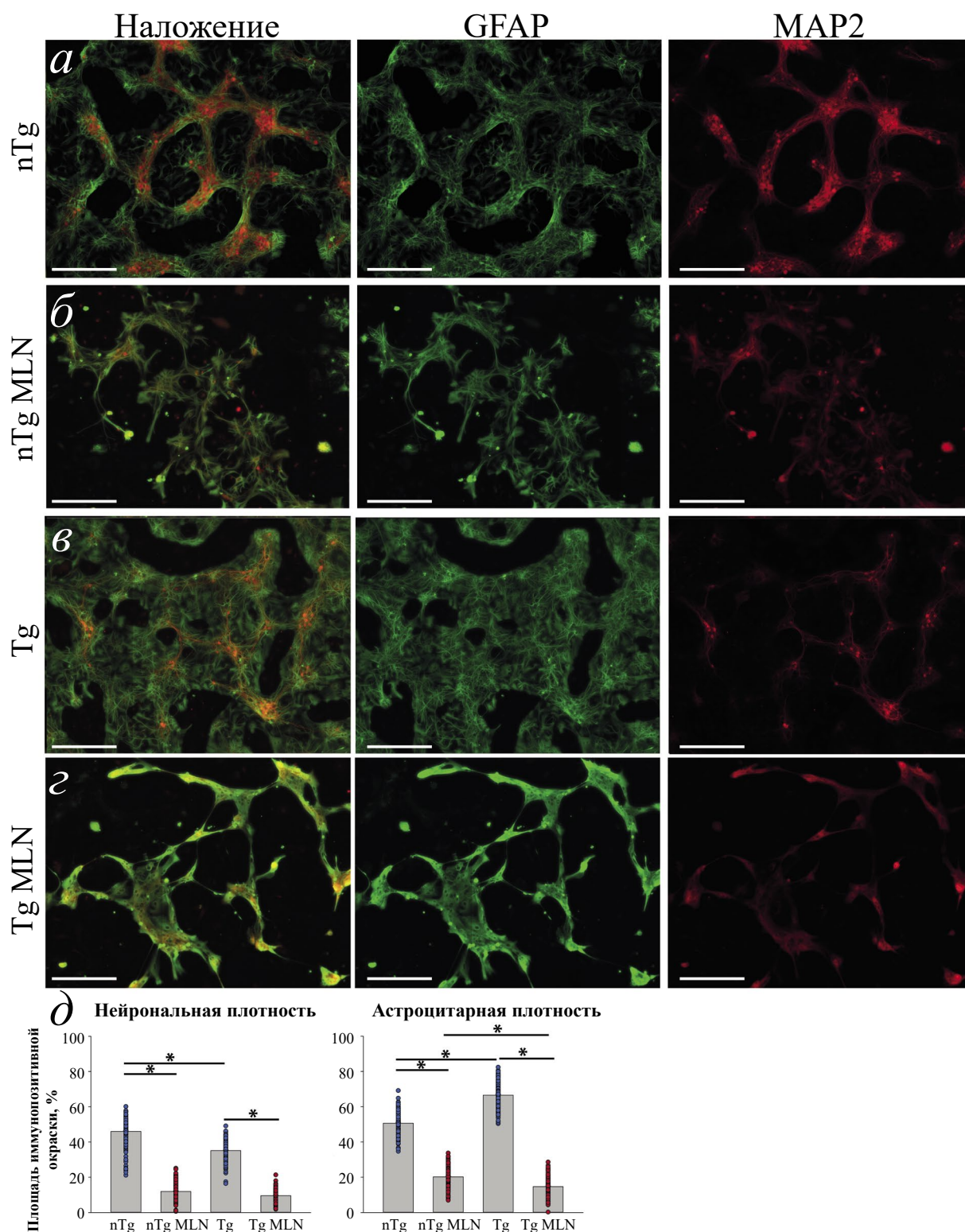
YB-1 способствовал увеличению площади, занимаемой астроцитами, о чем свидетельствует увеличение иммунопозитивности к GFAP. В различной степени наблюдалась гипертрофия клеточных тел и отростков. Исходная плотность астроцитов составляла  $50.6 \pm 0.4\%$  в nTg и  $66.6 \pm 0.5\%$  в Tg культурах и резко падала после воздействия блокатора ACE2. Под влиянием YB-1 астроцитарная плотность хотя и увеличилась в 2.4 и 3.2 раза в nTg и Tg культурах соответственно, однако не достигла исходного уровня (рис. 3, 4). Под влиянием добавления YB-1 в среду культивирования в обоих типах культур наблюдалась стимуляция роста нейритов (рис. 4), при этом наблюдался и рост площади иммунопозитивной окраски к маркеру нейронов MAP2 в 2.1 раза как в nTg, так и в Tg культурах, но тем не менее она оставалась сниженной по сравнению с исходной нейрональной плотностью в этих культурах до введения блокатора. Все вышеописанное свидетельствует о восстановлении нейроглиальной культуры гиппокампа Tg и nTg мышей под влиянием YB-1, но астроциты в Tg культуре были более чувствительны к его позитивному влиянию. Интересно отметить, что астроцитарная плотность восстанавливалась до значений, характерных для nTg культуры до воздействия блокатора.

### Действие ММСК

При введении ММСК в клеточные культуры гиппокампа, подвергнутые воздействию блокатора активности ACE2-рецептора, вне зависимости от трансгенности культуры наблюдалось восстановление нейритов и тел нейронов (рис. 5). Было отмечено, что отдельные астроциты были иммунопозитивны как к маркеру астроцитов, так и к MAP2. В nTg культурах плотность астроцитов возросла с  $20.3 \pm 0.4\%$  до  $44.1 \pm 0.4\%$ , а в Tg культурах с  $14.6 \pm 0.4\%$  до  $41.7 \pm 0.3\%$  (рис. 6). Под влиянием ММСК происходило увеличение нейрональной плотности, которая возросла в Tg культурах с  $9.5 \pm 0.2\%$  до  $26.9 \pm 0.3\%$ , а в nTg культурах с  $12.0 \pm 0.3\%$  до  $20.1 \pm 0.3\%$ .

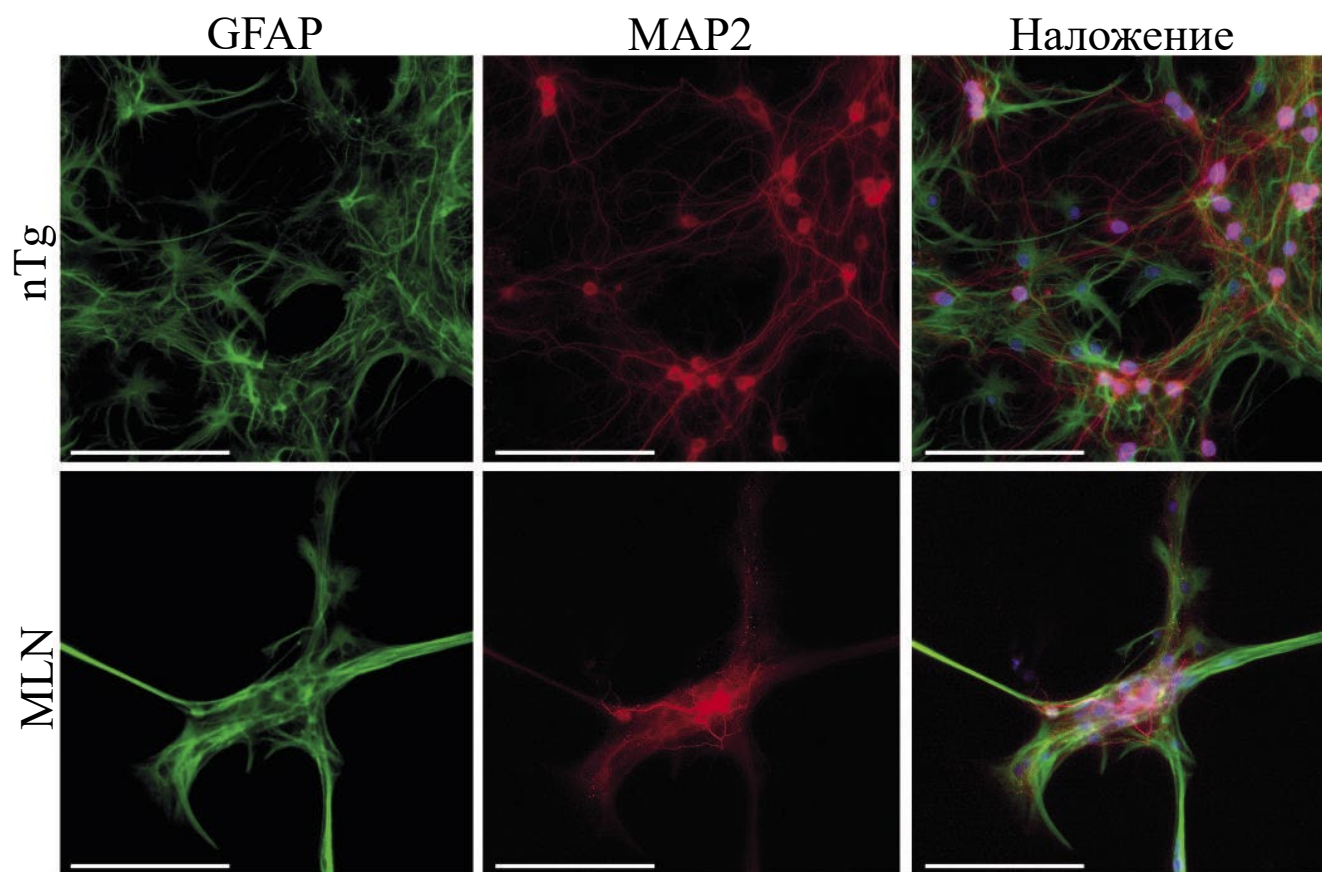
В целом, под влиянием добавления ММСК в нейроглиальную культуру гиппокампа, подвергнутую воздействию блокатора ACE2, увеличивалась как астроцитарная (в 2.2 и 2.9 раза в nTg и Tg культурах соответственно), так и нейрональная плотности (в 2.3 и в 2.1 раза в nTg и Tg культурах соответственно).

Таким образом, мы показали, что вмешательство в деятельность ACE2-рецептора ухудшает состояние нейроглиальных культур гиппокампа



**Рис. 1.** Влияние ингибитора ACE2 на площадь иммунопозитивной окраски маркера астроцитов (GFAP — зеленый) и маркера нейронов (MAP2 — красный) в первичных клеточных культурах гиппокампа нетрансгенных (nTg) и трансгенных (Tg) мышей. *а* — Нативная первичная культура гиппокампа nTg мыши (nTg). *б* — Влияние MLN-4760 на нативную первичную культуру гиппокампа nTg мыши (nTg MLN). *в* — Нативная первичная культура гиппокампа Tg мыши 5xFAD (Tg). *г* — Влияние MLN-4760 на первичную культуру гиппокампа Tg мыши 5xFAD (Tg MLN). *д* — Плотность нейронов и астроцитов (в %). \*  $p < 0.05$ , однофакторный ANOVA с последующими посттестами Данна. Шкала — 250 мкм.





**Рис. 2.** Структурные изменения астроцитов (GFAP — зеленый) и нейронов (MAP2 — красный) в первичных nTg клеточных культурах гиппокампа после действия MLN-4760. nTg — Нативная первичная культура гиппокампа. MLN — Влияние MLN-4760 на первичную культуру гиппокампа. Шкала — 125 мкм.

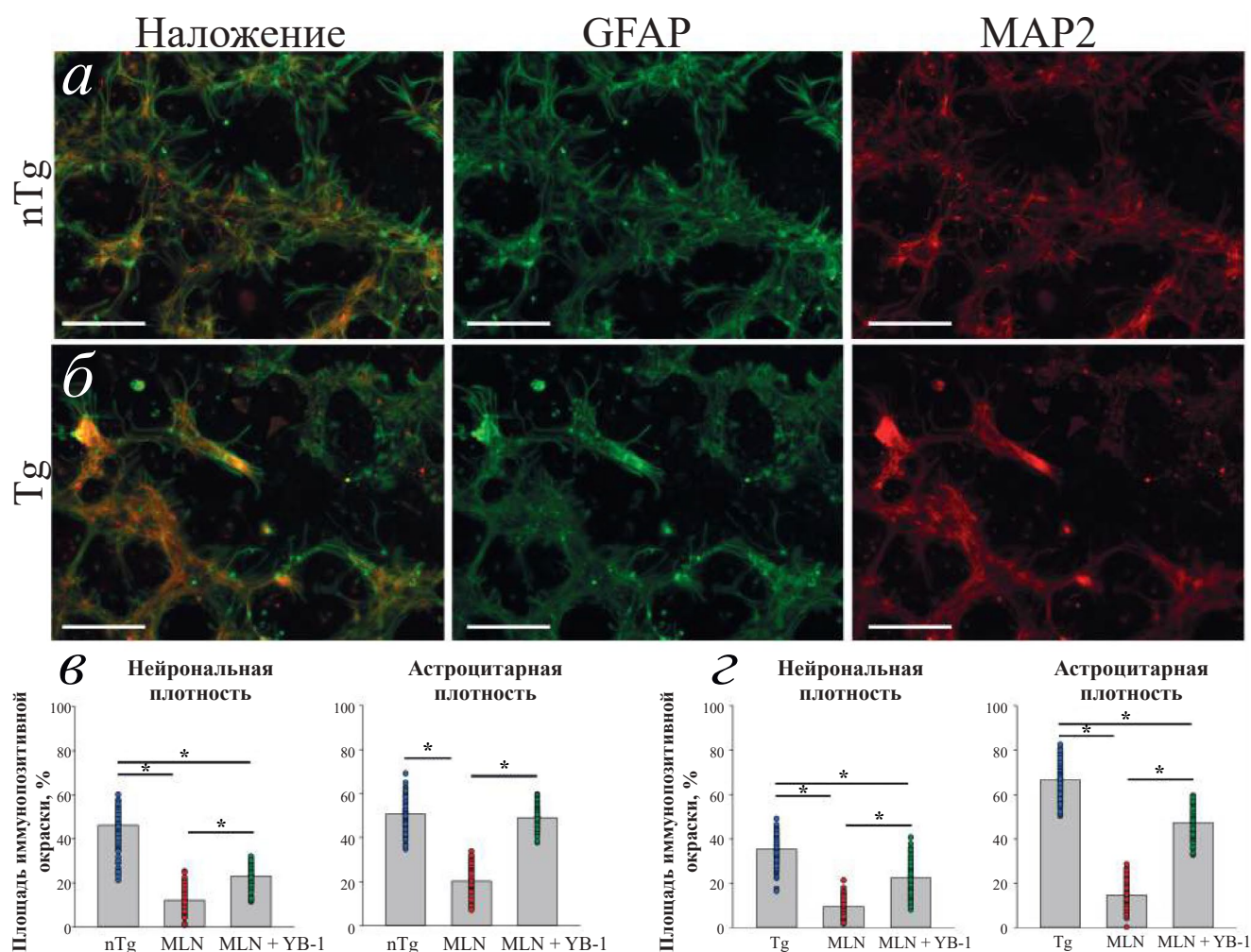
Tg и nTg мышей, а стресс-белок YB-1 и ММСК оказывают терапевтическое действие, восстанавливая плотности нейронов и астроцитов.

### ОБСУЖДЕНИЕ

С момента начала пандемии COVID-19 были предприняты значительные усилия по разработке эффективных и безопасных вакцин и терапевтических препаратов, а также по изучению этиопатогенеза инфекции. Во всех этих исследованиях важнейшую роль играют животные модели. В начале 2020 года в соответствии с планом НИОКР Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) была оперативно создана группа ВОЗ по моделированию COVID (World Health Organization COVID-19 modeling, WHO-COM), цель которой заключалась в скорейшей разработке животных моделей инфекции SARS-CoV-2 [36]. Одной из центральных задач нашего исследования было создание клеточной модели COVID-19, основанной на нарушении деятельности рецептора ACE2,

наблюдаемом у пациентов с коронавирусной инфекцией, что происходит в результате интернализации мембранного рецептора ACE2 внутрь клетки при связывании с коронавирусом.

Известно, что основным препятствием для инициации заражения мышей дикого типа SARS-CoV-2 является невозможность взаимодействия вируса с мышинным ACE2-рецептором из-за отличий в структуре его домена связывания от человеческого ACE2 [6], в результате чего вирус не может проникнуть в клетку хозяина. Несмотря на то что SARS-CoV-2 может инфицировать клетки независимым от ACE2-рецептора образом с участием альтернативных рецепторов и путей, таких как индуктор металлопротеиназы внеклеточного матрикса (EMMPRIN или CD147), рецептор асиалогликопротеина 1 (ASGR1), крингл-содержащий трансмембранный белок 1 (KREMEN1), нейропилин-1 (Nrp1), дипептидилпептидаза 4 (DPP4/CD26), аланиловая аминопептидаза (ANPEP/CD13), рецептор ангиотензина II типа 2 (AGTR2) и глутаминовая

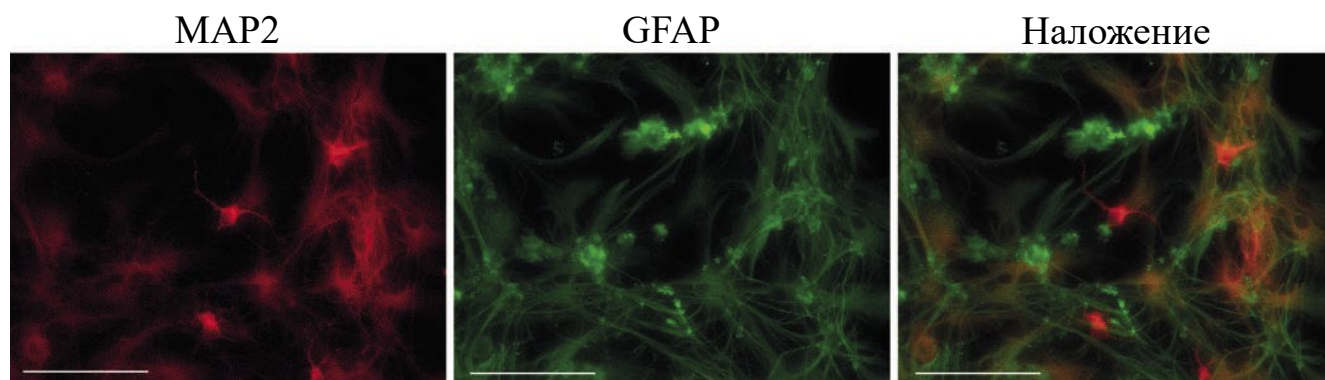


**Рис. 3.** Позитивное действие YB-1 на плотность нейронов и астроцитов в культурах Tg и nTg мышей, подвергнутых действию блокатора ACE2. Иммунопозитивность к маркеру астроцитов (GFAP – зеленый) и маркеру нейронов (MAP2 – красный). *а* – эффект YB-1 на nTg культуру, подвергнутую действию блокатора ACE2 (nTg). *б* – эффект YB-1 на Tg культуру, подвергнутую действию блокатора ACE2 (Tg). *в* – Плотность нейронов и астроцитов (в %) в nTg культуре в отсутствие MLN-4760 (nTg), под влиянием MLN-4760 (MLN), после действия YB-1 (MLN + YB-1). *г* – Плотность нейронов и астроцитов (в %) в Tg культуре 5xFAD в отсутствие MLN-4760 (nTg), под влиянием MLN-4760 (MLN), после действия YB-1 (MLN + YB-1). \*  $p < 0.05$ , однофакторный ANOVA с последующими посттестами Данна. Шкала – 250 мкм.

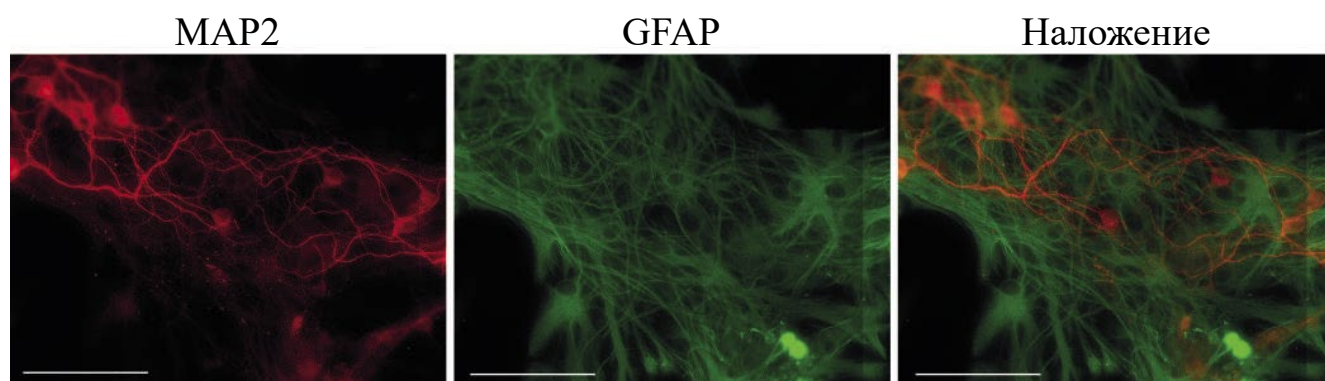
аминопептидаза (ENPER), ACE2-рецептор по-прежнему остается главным участником этого процесса, что было подтверждено многочисленными экспериментами *in vitro* и *in vivo* [6, 37–44]. Поэтому основным требованием к моделям COVID-19 являлась гарантия взаимодействия вирусных частиц с рецептором ACE2, обеспечивающим внедрение вируса в клетку и катаболизм рецептора ACE2 в лизосомах [45]. При этом последнему факту, с нашей точки зрения, не уделяется должного внимания. Действительно, как правило, не учитывается функциональный дуализм белка ACE2, с одной стороны, обусловленный его рецепторными свойствами,

с другой – его ферментативной активностью, позволяющей регулировать баланс двух ветвей РАС, важнейшей системы в организме, ответственной за поддержание гомеостаза на организменном, тканевом и клеточном уровнях, являющейся жизненно важным регулятором сердечной деятельности и водно-солевого баланса [16], а также имеющей большое значение для функциональной активности мозга. Поэтому интернализация вируса в клетку одновременно приводит к снижению ферментативной активности ACE2. Драматическим последствиям нарушения баланса двух ветвей РАС посвящены экспериментальные статьи и обзоры [46–48], однако этот факт





**Рис. 4.** Влияние введения YB-1 на нейроны (MAP2 — красный) и астроциты (GFAP — зеленый) в первичных пТг нейроглиальных культурах гиппокампа, подвергнутых воздействию MLN-4760. Шкала — 125 мкм.

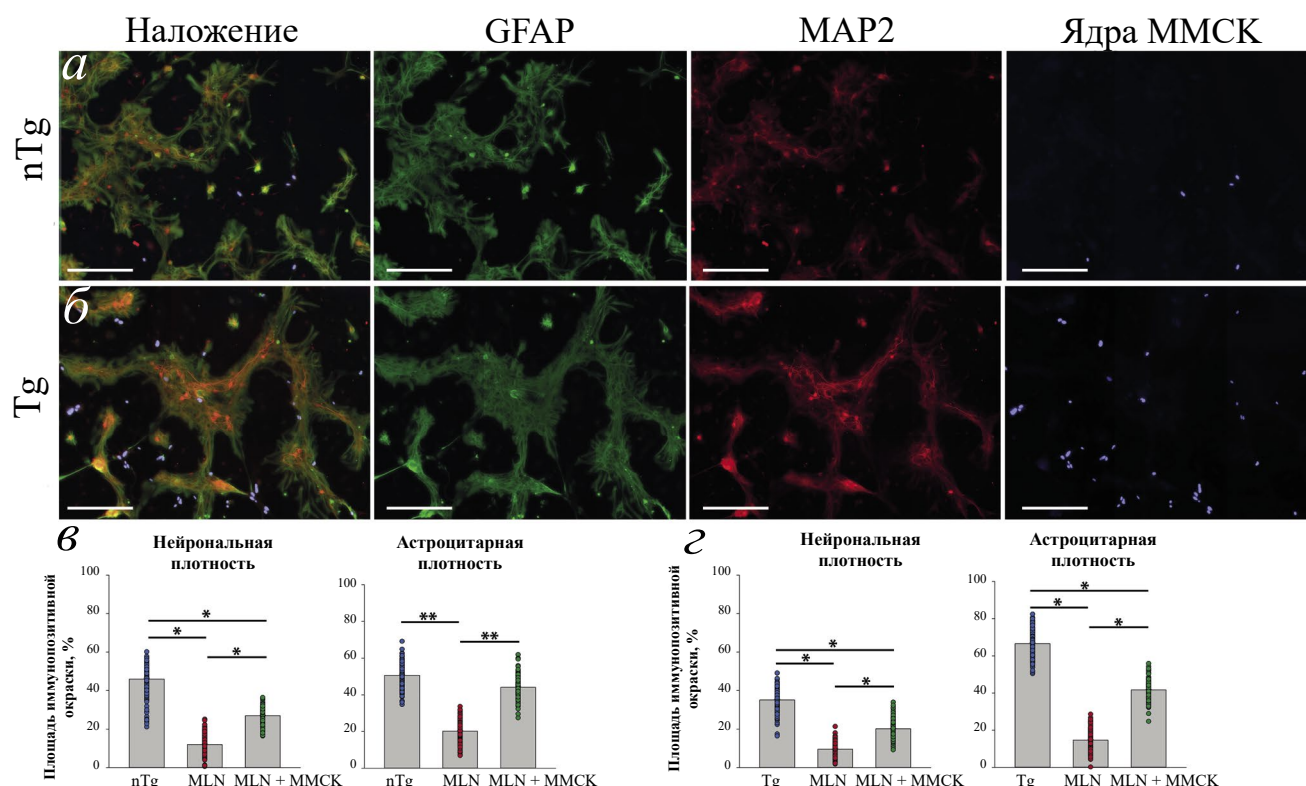


**Рис. 5.** Влияние ММСК на нейроны (MAP2 — красный) и астроциты (GFAP — зеленый) в пТг клеточной культуре гиппокампа, подвергнутой воздействию MLN-4760. Шкала — 125 мкм.

упускается при моделировании COVID-19. Хотя, как неврологические последствия COVID-19, так и нокаутные по ACE2-рецептору животные характеризуются сходными поведенческими, морфологическими и биохимическими нарушениями, включающими потерю памяти, гибель нейронов вплоть до развития дегенеративных изменений в мозге, сходными с БА [7, 8, 16–20]. Важно, что эти патологические реакции могут наблюдаться в условиях отсутствия самого вируса и входят в симптомокомплекс постковидного синдрома, но на фоне снижения ферментативной активности ACE2-рецептора. Поэтому в нашей работе для имитации потенциальных эффектов SARS-CoV-2 на ферментативную активность мышинного ACE2 мы использовали его специфический блокатор MLN-4760 [25].

Согласно имеющимся данным, экспрессия ACE2 обнаружена как в возбуждающих, так и тормозных нейронах, а также в ненейронных клетках — астроцитах и олигодендроцитах, при этом распространенность этого рецептора в мозговых

структурах человека и мыши очень сходна [49]. Важно отметить, что ACE2 экспрессируется и в условиях культивирования клеток, о чем свидетельствует его наличие в таких разнообразных клеточных культурах, как нейробласты, глиобласты и микроглия человека и мыши [50]. При заражении SARS-CoV-2 вирус также обнаруживается в нейронах и глии [51], в мозговых структурах, имеющих ACE2-рецепторы, и способен распространяться в обонятельную луковицу, пириформную кору, базальные ганглии, средний мозг, гипоталамус, черную субстанцию среднего мозга, миндалину, гиппокамп и мозжечок, вызывая интенсивную гибель нейронов, развитие астроглиоза и активацию микроглии [52, 53], что определяет его «нейроинвазивный потенциал» [54, 55]. Поэтому именно первичная нейроглиальная культура гиппокампа мышей явилась объектом нашего исследования. Присутствие в культуре не только нейронов, но и астроцитов, которые хорошо выявляются гистоиммунохимической окраской, способно воспроизводить взаимовлияние



**Рис. 6.** Влияние ММСК (ядра ММСК – синий) на иммунопозитивность астроцитов (маркер GFAP – зеленый) и нейронов (маркер MAP2 – красный) в первичных культурах гиппокампа nTg и Tg мышей. *а* – ММСК вводили в nTg культуру после ингибирования ACE2. *б* – ММСК вводили в Tg культуру 5xFAD после ингибирования ACE2. *в* – Плотность нейронов и астроцитов (в %) в nTg культуре в отсутствие MLN-4760 (nTg), под влиянием MLN-4760 (MLN), после действия ММСК (MLN + ММСК). *г* – Плотность нейронов и астроцитов (в %) в Tg культуре 5xFAD в отсутствие MLN-4760 (Tg), под влиянием MLN-4760 (MLN), после действия ММСК (MLN + ММСК). \*\*  $p < 0.001$ , однофакторный ANOVA с последующими посттестами Бонферрони. \*  $p < 0.05$ , однофакторный ANOVA с последующими посттестами Данна. Шкала – 250 мкм.

нейронных сетей и астроцитов, что является неотъемлемой частью деятельности мозга [56].

Как указывалось ранее, по данным клинических наблюдений, важным фактором, способным потенцировать тяжесть течения вирусной инфекции, является БА [8–15], характерной особенностью которой является сниженная ферментативная активность ACE2, наблюдаемая на фоне усиления экспрессии рецептора и сверхвысокой концентрации в плазме его растворимой формы, которая представляет собой внеклеточный домен рецептора, образующийся в результате его отщепления от мембраны ферментом ADAM17 [45]. В нашем исследовании мы также попытались исследовать влияние нарушения ACE2 на нейроны, несущие в своем геноме мутации, которые встречаются при БА. Поэтому часть работ была выполнена на нейроглиальной культуре гиппокампа трансгенных 5xFAD мышей, которые считаются общепринятой моделью наследственной формы

БА, поскольку несут в своем геноме 5 мутаций, характерных для этой патологии [27, 31]. Клеточную культуру этих животных мы, с определенными ограничениями, также рассматривали как модель БА, поскольку наша проверка методом ПЦР-анализа доказывает, что как гиппокампальная ткань, используемая для приготовления первичной культуры, так и сама культура имеют гиперусиленный генетический фон БА. Наличие трансгенов в головном мозге эмбрионов 5xFAD мышей было подтверждено другими исследователями [57]. Анализ действия блокатора ACE2-рецептора был выполнен нами на 14–17 день культивирования, когда, по нашим и многочисленным данным других исследователей, нейроны приобретают свойства конечно дифференцированных клеток с образованием синапсов и межнейронных связей [58]. При этом некоторые исследователи рассматривают культуры после 13 дней культивирования даже как стареющие культуры [59], что позволяет полагать, что в нашей модели был учтен и возрастной

фактор. Известно, что возраст является одним из основных рисков заболевания БА.

Наши наблюдения свидетельствуют о драматическом уменьшении площади иммунореактивности нейронов и астроцитов в культурах гиппокампа после обработки MLN-4760, что свидетельствует о снижении их плотности и позволяет предположить важную роль ACE2 в поддержании жизнеспособности клеток, что является новым аспектом в активности этого рецептора. Изменения морфологии культуры указывают на обширные нарушения клеточного строения и контактов, которые могут быть связаны с изменениями в клеточной адгезии и межклеточных взаимодействиях. Астроциты подвергаются сложной морфологической перестройке, которая может сопровождаться изменением их свойств.

Следует отметить, что трансгенные культуры 5xFAD мышей демонстрируют повышенную чувствительность к ингибированию активности ACE2, что проявилось в большей степени падения в этих культурах иммунореактивности нейронов и глии под воздействием MLN-4760. По-видимому, в условиях трансгенной культуры происходит гибель нейронов, а дальнейшее снижение активности ACE2 усугубляет этот процесс, возможно, через ослабление влияния ACE2 на расщепление A $\beta$ , что приводит к последующему увеличению A $\beta$  и его нейротоксического действия. Возможно, этот механизм участвует в большей предрасположенности больных БА к тяжелому течению COVID-19. Таким образом, снижение уровня ферментативной активности трансмембранного ACE2 под влиянием MLN-4760 оказывается достаточным, чтобы вызвать уменьшение выживаемости нейронов и астроцитов в культуре гиппокампа. Моделирование событий в мозге, происходящих на начальных этапах инфицирования вирусом SARS-CoV-2 обеспечивает новый подход к изучению патогенеза этого заболевания и его связи с развитием нейродегенерации.

Использование стресс-белка YB-1 в наших экспериментах было обусловлено ранее выявленной его способностью препятствовать развитию нейродегенерации в моделях семейной и спорадической форм БА и повышать выживаемость нейронов [28]. Кроме того, известно, что этот белок обладает широким спектром действия, участвуя практически во всех ДНК- и мРНК-зависимых процессах в клетке. Он является системным регулятором экспрессии генов на разных уровнях как в ядре, так и в цитоплазме, участвует в регуляции формирования стрессовых гранул и, возможно, собственно клеточного

цитоскелета, а также в пролиферации и поддержании статуса стволовых клеток [28, 60].

В нашей работе впервые показано протекторное действие YB-1 на последствия блокады ACE2-рецепторов. В данном исследовании мы наблюдали позитивный эффект YB-1 на выживаемость нейронов в культурах, обработанных MLN-4760. Однако в большей степени его защитное действие проявилось в отношении астроцитов, о чем свидетельствует процент (%) повышения площади иммунопозитивности к GFAP (маркеру астроцитов) по сравнению с иммунопозитивностью к MAP2 (маркеру нейронов) в культурах, подвергнутых воздействию MLN-4760.

Увеличение площади, занимаемой астроцитами, происходило на фоне роста количества реактивных астроцитов, характеризующихся различной степенью гипертрофии клеточных тел и отростков. Мы полагаем, что позитивное действие YB-1 могло быть обусловлено его способностью проникать в клеточное ядро и активировать экспрессию генов, связанных с устойчивостью клеток к токсическим воздействиям [28, 59, 61], в частности, к действию блокатора ACE2, а в случае трансгенной культуры — и к A $\beta$ .

Наши результаты показали, что YB-1 может быть использован в качестве препарата, улучшающего состояние нейроглиальной культуры гиппокампа, после губительного действия блокады ACE2. Возможно, обнаруженное защитное действие YB-1, повышающее выживаемость гиппокампальной культуры, обусловлено стимуляцией сборки микротрубочек и восстановлением поврежденного цитоскелета [28, 59, 61]. Хотя в литературе отсутствуют прямые доказательства непосредственного взаимодействия YB-1 с ACE2, их функции могут пересекаться, так, при COVID-19 в мозге отмечается астроглиоз [62].

В литературе имеются данные о том, что стволовые клетки могут быть использованы в качестве терапевтического средства для лечения COVID-19 [63–65], также накоплен большой экспериментальный материал об эффективном их использовании на моделях нейродегенеративных заболеваний у животных [27, 29]. В наших опытах введение ММСК после блокады ACE2 привело к повышению иммунопозитивности нейронов и астроглии, восстановлению их морфологии, что важно для их дальнейшего функционирования. Терапевтическая эффективность ММСК изначально объяснялась их способностью мигрировать и приживляться в целевом участке. Возможно, эффект ММСК в культуре при блокаде рецепторов ACE2 обусловлен выделением нейротрофических

и ростовых факторов, таких как нейротрофический фактор, полученный из глиальной клеточной линии (GDNF), фактор роста нервов (NGF) и нейротрофический фактор мозга (BDNF), которые могут поддерживать выживание нейронов. Все эти факторы наряду с другими биологически активными соединениями могут не только секретироваться ММСК, но и выделяться ими в составе экзосом, обладающих большим потенциалом терапевтического действия.

Таким образом, в настоящей работе с применением специфического ACE2-ингибитора MLN-4760 была разработана клеточная модель COVID-19 на культуре гиппокампа 5xFAD мышей, модели семейной формы БА. Данная модель воспроизводит снижение активности ACE2, происходящее у больных в результате интернализации рецептора внутрь клетки при его связывании с коронавирусом. Воздействие MLN-4760 привело к драматическому снижению плотности астроцитов и нейронов, что сопровождалось разрушением культуры, при этом клетки Тг культуры оказались более чувствительны к действию блокатора. Результаты подтверждают, что БА может выступать в качестве фактора риска тяжелого течения COVID-19. В отличие от существующих моделей COVID-19 наша клеточная модель не требует специальных условий для работы с вирусами, и вместе с тем позволяет проводить тестирование средств с протекторной активностью. С этой целью были исследованы эффекты белка УВ-1 и ММСК. Их применение после ингибирования ACE2 хотя и не восстанавливало плотность нейронов и астроцитов до нормы, но достоверно увеличивало этот показатель в обоих видах культур, способствовало стимуляции роста нейритов на фоне активации астроглии, что приводило к восстановлению структуры клеточной культуры. Мы наблюдали улучшение состояния культур и морфологии клеток, рост астроцитарной и нейрональной плотностей. Полученные результаты свидетельствуют, что УВ-1 и клеточная терапия с использованием ММСК являются перспективным подходом к разработке новых эффективных методов лечения инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

**Источники финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 24-25-00465.

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

**Соответствие принципам этики.** Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akhtar A., Singh S., Kaushik R., Awasthi R., Behl T. 2024. Types of memory, dementia, Alzheimer's disease, and their various pathological cascades as targets for potential pharmacological drugs. *Ageing Res. Rev.* **96**, 102289.
2. Gholami A. 2023. Alzheimer's disease: The role of proteins in formation, mechanisms, and new therapeutic approaches. *Neurosci. Lett.* **817**, 137532.
3. Singh M. K., Shin Y., Ju S., Han S., Kim S.S., Kang I. 2024. Comprehensive overview of Alzheimer's disease: Etiological insights and degradation strategies. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 6901.
4. Tyagi K., Rai P., Gautam A., Kaur H., Kapoor S., Suttie A., Jaiswal P. K., Sharma A., Singh G., Barnwal R.P. 2023. Neurological manifestations of SARS-CoV-2: Complexity, mechanism and associated disorders. *Eur. J. Med. Res.* **28**, 307.
5. Swain S. P., Mahanta C.S., Maurya M., Mandal D., Parihar V., Ravichandiran V. 2024. Exploring SK/S1P/S1PR pathway as a target for antiviral drug development. *Health Sciences Review.* **11**, 100177.
6. Fan C., Wu Y., Rui X., Yang Y., Ling C., Liu S., Liu S., Wang Y. 2022. Animal models for COVID-19: Advances, gaps and perspectives. *Signal Transduct. Target. Ther.* **7**, 220.
7. Belotserkovskaya Y.G., Romanovskikh A.G., Smirnov I.P., Sinopalnikov, A.I. 2021. Long COVID-19. *Consilium medicum*, **23**, 261–268.
8. Hu C., Chen C., Dong X.P. 2021. Impact of COVID-19 pandemic on patients with neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci.* **13**, 664965.
9. Pulliam L., Sun B., McCafferty E., Soper S.A., Witek M.A., Hu M., Ford J.M., Song S., Kapogiannis D., Glesby M.J., Merenstein D., Tien P.C., Freasier H., French A., McKay H., Diaz M.M., Ofotokun I., Lake J.E., Margolick J.B., Kim E.-Y., Levine S.R., Fischl M.A., Li W., Martinson J., Tang, N. 2024. Microfluidic isolation of neuronal-enriched extracellular vesicles shows distinct and common neurological proteins in long COVID, HIV infection and Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 3830.
10. Rudnicka-Drożak E., Drożak P., Mizerski G., Zaborowski T., Ślusarska B., Nowicki G., Drożak M. 2023. Links between COVID-19 and Alzheimer's disease – What do we already know? *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **20**, 2146.
11. Griggs E., Trageser K., Naughton S., Yang E.J., Mathew B., Van Hyfte G., Hellmers L., Jette N., Estill M., Shen L., Fischer T., Pasinetti G. M. 2023.



- Recapitulation of pathophysiological features of AD in SARS-CoV-2-infected subjects. *Elife*. **12**, e86333.
12. Xia X., Wang Y., Zheng J. 2021. COVID-19 and Alzheimer's disease: How one crisis worsens the other. *Transl. Neurodegener.* **10**, 15.
  13. Gkouskou K., Vasiliogiannakopoulou T., Andreacos E., Davanos N., Gazouli M., Sanoudou D., Eliopoulos A. G. 2021. COVID-19 enters the expanding network of apolipoprotein E4-related pathologies. *Redox Biol.* **41**, 101938.
  14. Kotsev S. V., Miteva D., Krayselska S., Shopova M., Pishmisheva-Peleva M., Stanilova S. A., Velikova T. 2021. Hypotheses and facts for genetic factors related to severe COVID-19. *World J. Virol.* **10**, 137.
  15. Naughton S. X., Raval U., Pasinetti G. M. 2020. Potential novel role of COVID-19 in Alzheimer's disease and preventative mitigation strategies. *J. Alzheimers Dis.* **76**, 21–25.
  16. Bobkova N.V. 2021. The balance between two branches of RAS can protect from severe COVID-19 course. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. **15**, 36–51.
  17. Alenina N., Bader M. 2019. ACE2 in brain physiology and pathophysiology: Evidence from transgenic animal models. *Neurochem. Res.* **44**, 1323–1329.
  18. Mahajan S., Sen D., Sunil A., Srikanth P., Marathe S. D., Shaw K., Sahare M., Galande S., Abraham N.M. 2023. Knockout of angiotensin converting enzyme-2 receptor leads to morphological aberrations in rodent olfactory centers and dysfunctions associated with sense of smell. *Front. Neurosci.* **17**, 1180868.
  19. Panariello F., Cellini L., Speciani M., De Ronchi D., Atti A. R. 2020. How does SARS-CoV-2 affect the central nervous system? A working hypothesis. *Front. Psychiatry*. **11**, 582345.
  20. Saikarthik J., Saraswathi I., Al-Atram A. A. 2022. Does COVID-19 affect adult neurogenesis? A neurochemical perspective. In: *Recent advances in neurochemistry*. Eds Heinbockel T., Weissert R. UK: Intechopen, p. 134.
  21. Gross L.Z., Sacerdoti M., Piiper A., Zeuzem S., Leroux A. E., Biondi R. M. 2020. ACE2, the receptor that enables infection by SARS-CoV-2: Biochemistry, structure, allostery and evaluation of the potential development of ACE2 modulators. *ChemMedChem*. **15**, 1682–1690.
  22. Reveret L., Leclerc M., Emond V., Tremblay C., Loisele A., Bourassa P., Bennett D.A., Hébert S.S., Calon F. 2023. Higher angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) levels in the brain of individuals with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **11**, 159.
  23. Komatsu T., Suzuki Y., Imai J., Sugano S., Hida M., Tanigami A., Muroi S., Yamada Y., Hanaoka K. 2002. Molecular cloning, mRNA expression and chromosomal localization of mouse angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (mACE2). *DNA Sequence*, **13**, 217–220.
  24. Staroverov V., Galatenko A., Knyazev E., Tonevitsky A. 2024. Mathematical model explains differences in Omicron and Delta SARS-CoV-2 dynamics in Caco-2 and Calu-3 cells. *PeerJ*. **12**, e16964.
  25. Ye M., Wysocki J., Gonzales-Pacheco F.R., Salem M., Evora K., Garcia-Halpin L., Poglitsch M., Schuster M., Batlle D. 2012. Murine Recombinant ACE2: Effect on angiotensin II dependent hypertension and distinctive ACE2 inhibitor characteristics on rodent and human ACE2. *Hypertension*. **60**, 730.
  26. Clever S., Volz A. 2023. Mouse models in COVID-19 research: Analyzing the adaptive immune response. *Med. Microbiol. Immunol.* **212**, 165–183.
  27. Бобкова Н.В., Полтавцева Р.А., Самохин А.Н., Сухих Г.Т. 2013. Терапевтический эффект мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток на память животных с нейродегенерацией альцгеймеровского типа. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. **3**, 123–126.
  28. Bobkova N.V., Lyabin D.N., Medvinskaya N.I., Samokhin A.N., Nekrasov P.V., Nesterova I.V., Aleksandrova I.Y., Tatarnikova O.G., Bobylev A.G., Vikhlyantsev I.M., Kukharsky M.S., Ustyugov A.A., Polyakov D.N., Eliseeva I.A., Kretov D.A., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P. 2015. The Y-box binding protein 1 suppresses Alzheimer's disease progression in two animal models. *PLoS One*. **10**, e0138867.
  29. Chaplygina A.V., Zhdanova D.Y., Kovalev V.I., Poltavtseva R.A., Medvinskaya N.I., Bobkova N.V. 2022. Cell therapy as a way to correct impaired neurogenesis in the adult brain in a model of Alzheimer's disease. *J. Evol. Biochem. Physiol.* **58**, 117–137.
  30. Жданова Д.Ю., Полтавцева Р.А., Свирщевская Е.В., Бобкова, Н.В. 2020. Влияние интраназального введения экзосом мультипотентных мезенхимных стромальных клеток на память у мышей в модели болезни Альцгеймера. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. **4**, 289–296.
  31. Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Vassar R. 2006. Intraneuronal  $\beta$ -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 10129–10140.
  32. Kimura R., Ohno M. 2009. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol. Dis.* **33**, 229–235.
  33. Peters O.M., Shelkovnikova T., Tarasova T., Springe S., Kukharsky M.S., Smith G.A. 2013. Chronic administration of Dimebon does not ameliorate amyloid-beta pathology in 5xFAD transgenic mice. *J. Alzheimers Dis.* **36**, 589–596.
  34. Papasozomenos S.C., Binder L.I. 1986. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is present in astrocytes of the optic nerve but absent from astrocytes of the optic tract. *J. Neurosci.* **6**, 1748–1756.

35. Geisert Jr.E.E., Johnson H.G., Binder L.I. 1990. Expression of microtubule-associated protein 2 by reactive astrocytes. *PNAS*. **87**, 3967–3971.
36. Muñoz-Fontela C., Widerspick L., Albrecht R.A., Beer M., Carroll M. W., de Wit E., Diamond M.S., Dowling W.E., Funnell S.G.P., García-Sastre A., Gerhards N.M., Jong R., Munster V.J., Neyts J., Perlman S., Reed D.S., Richt J.A., Riveros-Balta X., Roy C.J., Salguero F.J., Schotsaert M., Schwartz L.M., Seder R.A., Segalés J., Vasan S.S., Henao-Restrepo A.M., Barouch D.H. 2022. Advances and gaps in SARS-CoV-2 infection models. *PLoS Pathog.* **18**, e1010161.
37. Caly L., Druce J.D., Catton M.G., Jans D.A., Wagstaff K.M. 2020. The FDA approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antivir. Res.* **178**, 104787
38. Wyler E., Msbauer K., Franke V., Diag A., Landthaler M. 2021. Bulk and single-cell gene expression profiling of SARS-CoV-2 infected human cell lines identifies molecular targets for therapeutic intervention. *iScience*. **24**, 102151
39. Huang J., Song W., Huang H., Sun Q. 2020. Pharmacological therapeutics targeting RNA-dependent RNA polymerase, proteinase and spike protein: from mechanistic studies to clinical trials for COVID-19. *J. Clin. Med.* **9**, 1131.
40. Shajahan A., Archer-Hartmann S., Supekar N. T., Gleinich A. S., Heiss C., Azadi P. 2021. Comprehensive characterization of N-and O-glycosylation of SARS-CoV-2 human receptor angiotensin converting enzyme 2. *Glycobiology*. **31**, 410–424.
41. Yinda C. K., Port J.R., Bushmaker T., Offei Owusu I., Purushotham J.N., Avanzato V.A., Fischer R.J., Schulz J.E., Holbrook M.G., Hebner M.J., Rosenke R., Thomas T., Marzi A., Best S.M., de Wit E., Shaia C., Doremalen N., Munster V.J. 2021. K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19. *PLoS Pathog.* **17**, e1009195.
42. Zheng J., Wong L.Y.R., Li K., Verma A. K., Ortiz M. E., Wohlford-Lenane C., Leidinger M. R., Knudson C. M., Meyerholz D. K., McCray Paul B., Perlman S. 2021. COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice. *Nature*. **589**, 603–607.
43. Bao L., Deng W., Huang B., Gao H., Liu J., Ren L., Wei Q., Yu P., Xu Y., Qi F., Qu Y., Li F., Lv Q., Wang W., Xue J., Gong S., Liu M., Wang G., Wang S., Song Z., Zhao L., Liu P., Zhao L., Ye F., Wang H., Zhou W., Zhu N., Zhen W., Yu H., Zhang X., Guo L., Chen L., Wang C., Wang Y., Wang X., Xiao Y., Sun Q., Liu H., Zhu F., Ma C., Yan L., Yang M., Han J., Xu W., Tan W., Peng X., Jin Q., Wu G., Qin, C. 2020. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature*. **583**, 830–833.
44. Wu Y., Wang F., Shen C., Peng W., Liu L. 2020. A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2. *Science*. **368**, eabc2241
45. Wang C.W., Chuang H.C., Tan T.H. 2023. ACE2 in chronic disease and COVID-19: Gene regulation and post-translational modification. *J. Biomed. Sci.* **30**, 71.
46. Garg M., Royce S.G., Tikellis C., Shallue C., Batu D., Velkoska E., Burrell L.M., Patel S.K., Beswick L., Jackson A., Britto K., Lukies M., Sluka P., Wardan H., Hirokawa Y., Tan C.W., Faux M., Burgess A.W., Hosking P., Monagle S., Thomas M., Gibson P.R., Lubel J. 2020. Imbalance of the renin-angiotensin system may contribute to inflammation and fibrosis in IBD: A novel therapeutic target? *Gut*. **69**, 841–851.
47. Delpino M.V., Quarleri J. 2020. SARS-CoV-2 pathogenesis: Imbalance in the renin-angiotensin system favors lung fibrosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 340.
48. Gao Y. L., Du Y., Zhang C., Cheng C., Yang H. Y., Jin Y.F., Duan G-C., Chen S.Y. 2020. Role of renin-angiotensin system in acute lung injury caused by viral infection. *Infect. Drug Resist.* **13**, 3715–3725.
49. Chen R., Wang K., Yu J., Howard D., French L., Chen Z., Wen C., Xu Z. 2021. The spatial and cell-type distribution of SARS-CoV-2 receptor ACE2 in the human and mouse brains. *Front. Neurol.* **11**, 573095.
50. Qiao J., Li W., Bao J., Peng Q., Wen D., Wang J., Sun B. 2020. The expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 and CD147, and protease TMPRSS2 in human and mouse brain cells and mouse brain tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **533**, 867–871.
51. Xu J., Lazartigues E. 2022. Expression of ACE2 in human neurons supports the neuro-invasive potential of COVID-19 virus. *Cell Mol Neurobiol.* **42**, 305–309.
52. Morgun A.V., Salmin V.V., Boytsova E.B., Lopatina O.L., Salmina, A. B. 2020. Molecular mechanisms of proteins—targets for SARS-CoV-2. *Современные технологии в медицине*. **12** (6), 98–108.
53. Netland J., Meyerholz D.K., Moore S., Cassell M., Perlman S. 2008. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J. Virol.* **82**, 7264–7275.
54. Scoppettuolo P., Borrelli S., Naeije G. 2020. Neurological involvement in SARS-CoV-2 infection: A clinical systematic review. *Brain Behav. Immun. Health.* **5**, 100094.
55. Song E., Zhang C., Israelow B., Lu-Culligan A., Prado A.V., Skriabine S., Lu P., Weizman O.E., Liu F., Dai Y., Szigeti-Buck K., Yasumoto Y., Wang G., Castaldi C., Heltke J., Ng E., Wheeler J., Alfajaro M.M., Levavasseur E., Fontes B., Ravindra N.G., Van Dijk D., Mane S., Gunel M, Ring A., Kazmi S.A.J., Zhang K., Wilen C.B., Horvath T.L., Plu I., Haik S., Thomas J.L., Louvi A., Farhadian S.F., Huttner A., Seilhean D., Renier N., Bilguvar K., Iwasaki A. 2021. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J. Exp. Med.* **218**, e20202135.

56. Agulhon C., Petracz J., McMullen A.B., Sweger E.J., Minton S.K., Taves S.R., Casper K.B., Fiacco T.A., McCarthy K.D. 2008. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron*. **59**, 932–946.
57. Mitroshina E.V., Pakhomov A.M., Krivonosov M.I., Yarkov R.S., Gavrish M.S., Shkirin A.V., Ivanchenko M.V., Vedunova M.V. 2022. Novel algorithm of network calcium dynamics analysis for studying the role of astrocytes in neuronal activity in Alzheimer's disease models. *Int J Mol Sci*. **23**, 15928.
58. Calvo-Rodríguez M., de la Fuente C., García-Durillo M., García-Rodríguez C., Villalobos C., Núñez L. 2017. Aging and amyloid  $\beta$  oligomers enhance TLR4 expression, LPS-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses, and neuron cell death in cultured rat hippocampal neurons. *J Neuroinflammation*. **14**, 24.
59. Calvo-Rodríguez M., García-Durillo M., Villalobos C., Núñez L. 2016. Aging enables  $\text{Ca}^{2+}$  overload and apoptosis induced by amyloid- $\beta$  oligomers in rat hippocampal neurons: Neuroprotection by non-steroidal anti-inflammatory drugs and R-flurbiprofen in aging neurons. *J. Alzheimers Dis*. **54**, 207–221.
60. Елисева И.А., Ким Е.Р., Гурьяно, С.Г., Овчинников Л.П., Лябин, Д.Н. 2011. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) и его функции. *Успехи биол. химии*. **51**, 65–163.
61. Stavrovskaya A., Stromskaya T., Rybalkina E., Moiseeva N., Vaiman A., Guryanov S., Ovchinnikov L., Guens, G. 2012. YB-1 protein and multidrug resistance of tumor cells. *Curr. Signal Transduct. Ther.* **7**, 237–246.
62. Steardo L., Steardo L.Jr., Zorec R., Verkhatsky A. 2020. Neuroinfection may contribute to pathophysiology and clinical manifestations of COVID-19. *Acta Physiol. (Oxf)*. **229**, e13473.
63. Esquivel D., Mishra R., Soni P., Seetharaman R., Mahmood A., Srivastava A. 2021. Stem cells therapy as a possible therapeutic option in treating COVID-19 patients. *Stem cell reviews and reports*. **17**, 144–152.
64. Musial C., Gorska-Ponikowska M. 2021. Medical progress: Stem cells as a new therapeutic strategy for COVID-19. *Stem Cell Research*. **52**, 102239.
65. Kebria M.M., Milan P. B., Peyravian N., Kiani J., Khatibi S., Mozafari M. 2022. Stem cell therapy for COVID-19 pneumonia. *Mol. Biomed*. **3**, 6.

## Positive Effect of YB-1 and Mesenchymal Stromal Cells on Primary Hippocampal Culture under Conditions of ACE2 Receptor Blockade

**D. Yu. Zhdanova<sup>1,\*</sup>, A. V. Chaplygina<sup>1</sup>, N. V. Bobkova<sup>1</sup>, R. A. Poltavtseva<sup>2</sup>, G. T. Sukhikh<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biophysics, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

<sup>2</sup>*National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia*

\*e-mail: ddzhdanova@mail.ru

Although the current COVID-19 incidence situation is not an emergency, more new strains of SARS-CoV-2 coronavirus continue to emerge worldwide, some of which are more virulent than the original virus. Studies have shown that patients with Alzheimer's disease (AD) had a high risk of severe COVID-19, but the molecular and cellular mechanism of this predisposition is not fully elucidated. In this study, we developed a cellular model of the initial stage of COVID-19 on primary hippocampal culture of 5xFAD mice, a familial AD model, using a specific ACE2 receptor inhibitor, MLN-4760. This model is based on the experimentally proven decrease in ACE2 receptor activity observed in COVID-19 patients due to internalization of the receptor inside the cell after binding to coronavirus. Using immunohistochemical staining with specific antibodies to detect neurons (marker MAP2) and astroglia (marker GFAP), it was found that 24 h after the addition of MLN-4760 (0.2 nmol per 1 mL of medium) to the culture medium, there was a decrease in the density of astrocytes and neurons, a change in their morphology with a sharp reduction in the length and density of neurites, which led to the death of the cell culture. The transgenic culture was more sensitive to the effect of the inhibitor compared to the control hippocampal culture of native mice. In the second part of the study the possibilities of preventing the destructive effect of MLN-4760 on the hippocampal culture condition were studied. It was shown that administration of YB-1, an endogenous polyfunctional stress protein, promoted restoration of cell culture structure and resulted in stimulation of neurite growth and astroglia activation. Introduction of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) after ACE2 blockade was also accompanied by improved culture survival, restoration of cell morphology, and increased density of astrocytes and neurons. The obtained results indicate that YB-1 and cell therapy using MMSCs are promising options for the development of new effective methods to prevent the pathological effect of the virus on brain tissue, which is an important link in the treatment of infection caused by SARS-CoV-2 virus.

**Keywords:** Alzheimer's disease, COVID-19, ACE2, multipotent mesenchymal stromal cells of the Wharton jelly of the human umbilical cord, YB1