

Оригинальные исследования



© МОРГУН А. В., КУВАЧЕВА Н. В., ХИЛАЖЕВА Е. Д., ПОЖИЛЕНКОВА Е. А., САЛМИНА А. Б.

УДК 616.896

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СОПРЯЖЕНИЯ И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА МОДЕЛИ НЕЙРОВАСКУЛЯРНОЙ ЕДИНИЦЫ *IN VITRO*

А. В. Моргун, Н. В. Кувачева, Е. Д. Хилажева, Е. А. Пожиленкова, А. Б. Салмина

ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, ректор – д. м. н., проф. И. П. Артюхов; кафедра педиатрии ИПО, зав. – д. м. н., проф. Т. Е. Таранушенко; кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, зав. – д. м. н., проф. А. Б. Салмина; НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, руководитель – д. м. н., проф. А. Б. Салмина.

Цель исследования. Изучение регулирующей роли коннексина 43 (Cx43) в межклеточных взаимодействиях в нейроваскулярной единице (НВЕ) *in vitro*.

Материалы и методы. Исследование проводилось на модели НВЕ *in vitro* с оценкой экспрессии Cx43 и CD38 в физиологических условиях и при подавлении экспрессии Cx43.

Результаты. Клетки-компоненты НВЕ *in vitro* экспрессируют Cx43 и CD38. Апликация siRNA приводит к снижению экспрессии Cx43 и CD38 на нейронах и эндотелиоцитах. Существует прямая корреляционная связь средней силы между экспрессией Cx43 и CD38.

Заключение. В ходе работы установлено, что существует функциональное сопряжение между молекулой CD38 и Cx43, различающееся по своим характеристикам в клетках НВЕ и свидетельствующее об их разной чувствительности к действию факторов, нарушающих метаболизм НАД⁺.

Ключевые слова: межклеточные взаимодействия, нейроваскулярная единица, коннексины.

RESEARCH OF THE METABOLIC CONJUGATION AND INTERCELLULAR INTERACTIONS ON THE MODEL OF NEUROVASCULAR UNIT *IN VITRO*

A. V. Morgun, N. V. Kuvacheva, E. D. Khilazheva, E. A. Pozhilenkova, A. B. Salmina

Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V. F. Voino-Yasenetsky

The aim of the research. To study the regulatory role of connexin 43 (Cx43) in intercellular interactions in the neurovascular unit (NVU) *in vitro*.

Materials and methods. The research was conducted on a model NVU *in vitro* with the evaluation of Cx43 and CD38 expression in physiological conditions and in the suppression of Cx43 expression.

Results. NVU cells-components *in vitro* express Cx43 and CD38. Application of siRNA reduces the expression of Cx43 and CD38 on neurons and endotheliocytes. There is a direct correlation of medium strength between expression of Cx43 and CD38.

Conclusion. During the work it was established that there is functional conjugation between the molecule CD38 and Cx43, distinguished by their characteristics in NVU cells and indicated of their different sensitivity to the action of factors that violate the metabolism of NAD⁺.

Key words: intercellular interactions, neurovascular unit, connexins.

Введение

Изучение механизмов функционирования головного мозга – одна из ключевых задач, решение которой имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Известно, что основой физиологической и патологической проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) является активность транспортных систем клеток нейроваскулярной единицы (НВЕ), причем изменения проницаемости носят избирательный характер и зачастую являются причиной неэффективной фармакотерапии [5]. Анатомические элементы, из которых складывается

структура барьера, защищают мозг и регулируют его жизнедеятельность, питание, выведение продуктов обмена веществ. Этими элементами являются функционально и анатомически связанные между собой эндотелиоциты капилляров головного мозга, астроциты, нейроны и перicyты [8]. Секреторная активность каждого типа клеток и работа широкого спектра транспортных систем, экспрессирующихся в них, определяют не только индивидуальный ответ клеток на действие регуляторных молекул, но и межклеточные взаимодействия, приводящие к согласованным изменениям метаболического статуса.

Метаболизм и транспорт НАД⁺ — одна из ключевых характеристик клеток астроглиальной, эндотелиальной и нейрональной природы, входящих в состав НВЕ. Экспрессия НАД⁺-синтезирующих и НАД⁺-метаболизирующих ферментов в клетках, а также сопряженных транспортных молекул (например, коннексинов и паннексинов) важна для нейрон-астроглиального метаболического сопряжения, глиоваскулярного контроля, реализации ответа клеток на действие повреждающих факторов (окислительный стресс, воспаление) и сложных форм межклеточной коммуникации в НВЕ. Коннексин 43 (Cx43) — трансмембранный белок — осуществляет транспорт АТФ и НАД⁺ между клетками в пределах астроглиального синцития и/или во внеклеточное пространство, где НАД⁺ становится субстратом для НАД⁺-гликогидролазы/CD38, синтезирующей циклическую АДФ-рибозу с кальций-мобилизующей активностью [2, 3].

Лучшее понимание клеточных, молекулярных и (пато) биохимических механизмов регуляции метаболического статуса и межклеточной коммуникации в НВЕ позволяет определять новые направления развития высокоэффективных технологий нейропротекции и нейрорегенерации.

Цель работы: изучение регулирующей роли коннексина 43 (Cx43) в межклеточных взаимодействиях в нейроваскулярной единице *in vitro*.

Материалы и методы

Исследование проводилось с использованием клеточной модели *in vitro*, содержащей три вида клеток: нейроны, астроциты, эндотелиоциты. Материалом для создания модели НВЕ служили прогениторные клетки головного мозга 14-16 дневных эмбрионов крыс линии Wistar, из которых культивировали нейросферы с последующей дифференцировкой в астроциты и нейроны [1]. Эндотелиоциты выделялись из сосудов головного мозга крыс (самцов и самок) на 7-14 день постнатального развития. По достижении клетками НВЕ 70% конfluence проводили подавление экспрессии Cx43 трансфекцией специфичных малых интерферирующих молекул РНК (Cx43 siRNA, производитель SantaCruz, США, № в каталоге — sc-60008) с помощью набора реагентов siRNA Reagent system (производитель SantaCruz, США, № в каталоге — sc-45064) согласно стандартному протоколу фирмы-изготовителя. Процедуру трансфекции проводили в 6-луночных планшетах, каждая лунка содержала 1мл Transfection Medium, 60 пмоль Cx43 siRNA и 60 пмоль siRNA Transfection Reagent. В данной среде клетки инкубировали в течение 5 часов при 37°C в условиях CO₂-инкубатора, после чего проводили замену среды. Все исследования клеток проводили спустя 24 часа после трансфекции.

Таким образом, были получены две экспериментальные группы: 1) контроль (культивирование клеток в стандартных условиях); 2) клеточная культура с подавленной экспрессией Cx43 с помощью siRNA.

Для идентификации типа Cx43-позитивных клеток НВЕ определяли следующие молекулы-маркеры: нейронспецифическую енолазу (NSE) — маркер нейронов, глиальный

фибрилярный кислый протеин (GFAP) — маркер астроцитов, фактор Виллебранда (vWf) — маркер эндотелиоцитов. Экспрессию Cx43, CD38 и молекул-маркеров клеток NSE, GFAP и vWf оценивали с использованием двойного непрямого метода иммуноферментного окрашивания, согласно протоколу производителя, с использованием следующих антител: первичные антитела к CD38 в рабочем разведении 1:200 (производитель Santa-Cruz, США, № в каталоге — sc-7049), анти-Connexin-43 в рабочем разведении 1:100 (производитель Spring Bioscience, США, № в каталоге — E2740), анти-GFAP антитела в рабочем разведении 1:100 (производитель BioLegend, США, № в каталоге — 644702), анти-NSE антитела в рабочем разведении 1:200 (производитель Abcam, Великобритания, № в каталоге — ab134015), анти-vWf антитела в рабочем разведении 1:200 (производитель Abcam, Великобритания, № в каталоге — ab6994). В качестве вторичных антител использовались моноклональные антитела, меченые AlexaFluor 488 (производитель Abcam, Великобритания, № в каталоге — ab150117), AlexaFluor 647 (производитель Abcam, Великобритания, № в каталоге — ab150171), Cy 5 (производитель Abcam, Великобритания, № в каталоге — ab97077), AlexaFluor 555 (производитель Abcam, Великобритания, № в каталоге — ab150078) в разведении 1:400.

Статистическая обработка. Использовались методы непараметрической статистики. Для выявления различий между группами по количественным показателям применяли критерий Манна-Уитни. Описание количественных признаков представлено в виде $M \pm s$, где M — среднее арифметическое, s — стандартное отклонение. Корреляционный анализ проведен расчетом коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

При совместном культивировании клеток-компонентов НВЕ в физиологических условиях (рис. 1) установлено их соотношение: $24,3 \pm 1,7\%$ составляют GFAP-позитивные клетки (астроциты), $49,8 \pm 2,0\%$ — NSE-позитивные клетки (нейроны), $25,9 \pm 1,8\%$ — vWf-позитивные клетки (эндотелиоциты).

При подавлении экспрессии Cx43 малыми интерферирующими РНК не обнаружено статистически значимых отличий в соотношении клеток различной природы ($23,3 \pm 1,7\%$; $48,4 \pm 2,0\%$; $28,3 \pm 1,8\%$, соответственно) (рис. 2).

Мы обнаружили, что все клетки-компоненты НВЕ обладают способностью экспрессировать Cx43 и функционально сопряженную молекулу CD38 *in vitro*, причем уровень экспрессии во всех трех типах клеток сопоставим (табл. 1). Следует отметить, что применение указанного протокола подразумевает использование молодых клеток, дифференцированных из эмбриональной ткани головного мозга, что, вероятнее всего, определяет наличие Cx43 — иммунопозитивного материала не только в астроцитах, но и в клетках нейрональной и эндотелиальной природы.

При применении протокола подавления экспрессии Sx43 siRNA мы зарегистрировали наряду с ожидаемым уменьшением экспрессии Sx43 ($p < 0,05$) статистически значимое снижение экспрессии CD38 на нейронах и эндотелиальных клетках ($p < 0,05$). При этом, экспрессия CD38 в астроцитах практически не менялась. Корреляционный анализ позволил установить, что существует прямая корреляционная связь средней силы ($r = 0,62$; $p < 0,05$) между экспрессией Sx43 и CD38 в физиологических условиях в клетках-компонентах гематоэнцефалического барьера. При подавлении экспрессии Sx43 корреляция сохраняется, что свидетельствует о сопряжении транспортной молекулы Sx43 и CD38.

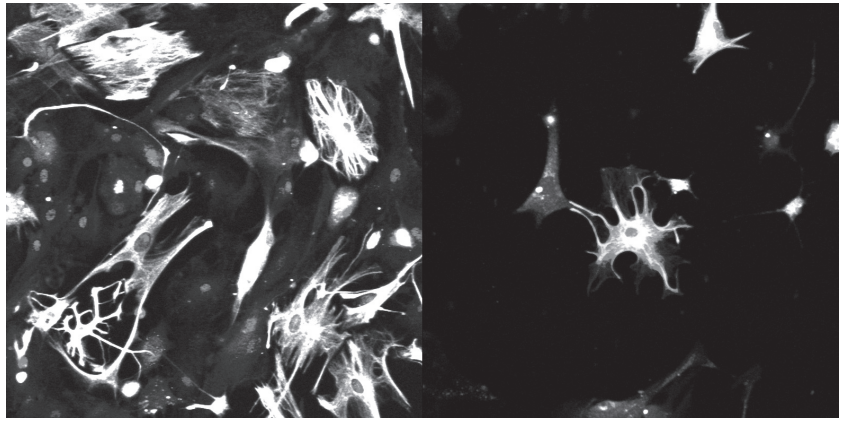


Рис. 1. Конфокальная микроскопия клеток НВЕ: GFAP-экспрессирующие клетки (астроциты) (зеленая метка слева, синяя справа), NSE-экспрессирующие клетки (нейроны) (синяя метка слева), vWf-экспрессирующие клетки (эндотелиоциты) (красная метка справа). Увеличение 250х.

Известно, что снижение экспрессии Sx43 может способствовать реализации цитотоксического потенциала разнообразных повреждающих факторов, а увеличение экспрессии Sx43 в астроцитах, напротив, демонстрирует цитопротективный характер, например, при ишемии головного мозга [6]. Интересно, что только нейроны и эндотелиоциты в наших условиях эксперимента продемонстрировали подавление экспрессии CD38 вследствие снижения уровня Sx43, тогда как астроциты сохранили исходный уровень экспрессии CD38. Это вполне соотносится с данными о большей резистентности астроцитов к действию факторов, повреждающих энергетический метаболизм [4]: сохранение экспрессии и активности НАД⁺-гликогидролазы/CD38 в астроцитах даже на фоне снижения экспрессии Sx43 свидетельствует о сохраняющейся биодоступности НАД⁺ как субстрата для ферментативной активности CD38, что, в свою очередь, может быть связано с высоким уровнем гликолитической активности в клетках астроглиальной природы по сравнению с нейронами и эндотелиоцитами. С учетом данных о том, что подавление экспрессии Sx43 в астроцитах стимулирует активность HIF-1-зависимых механизмов [7], активация гликолиза в астроцитах обеспечивает достаточный уровень регенерации НАД⁺ и не приводит к драматическим последствиям в экспрессии НАД⁺-гликогидролазы/CD38.

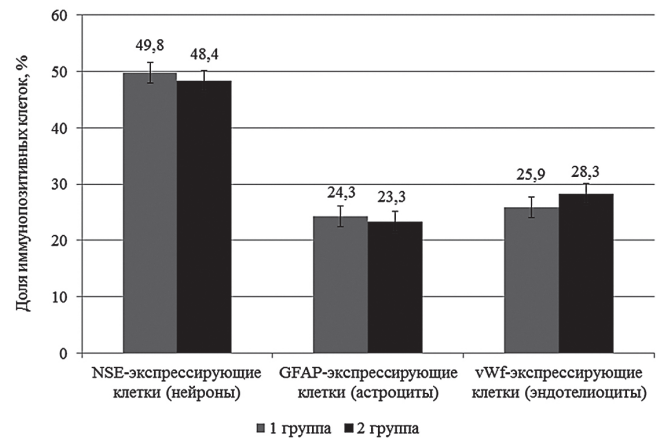


Рис. 2. Доля иммунопозитивных клеток в модели НВЕ in vitro в физиологических условиях (группа 1) и при подавлении экспрессии коннексиновых транспортных систем (группа 2).

Заключение

В ходе работы зарегистрирован специфичный для клеток астроглиальной, нейрональной и эндотелиальной природы характер сопряжения экспрессии НАД⁺ транспортирующей молекулы Sx43 и НАД⁺-метаболизирующей молекулы CD38 in vitro.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ_ККФПНУНТД (конкурс региональных проектов «Сибирь», № 13-04-98091).

Таблица 1

Молекулы-транспортёры и регуляторы метаболического сопряжения клеток НВЕ в физиологических условиях in vitro (%)

Маркер	NSE-экспрессирующие клетки (нейроны)		GFAP-экспрессирующие клетки (астроциты)		vWf-экспрессирующие клетки (эндотелиоциты)	
	1 группа	2 группа	1 группа	2 группа	1 группа	2 группа
Sx43	5,7±1,8	1,7±0,9*	6,3±3,4	2,3±1,9*	9,5±1,0	3,7±0,7*
CD38	6,2±1,5	3,4±0,9*	10,5±1,9	8,9±1,6	24±2,5	8,2±1,5*

Примечания: * – уровень значимости различий между средними соответствующих групп по сравнению с группой контроля (+) ($p < 0,05$), критерий Манна-Уитни.

Литература

1. Моргун А.В., Кувачева Н.В., Комлева Ю.К., Салмина А.Б., Кутищева И.А., Окунева О.С., Дробушевская А.И., Хилажева Е.Д. Дифференцировка эмбриональных прогениторных клеток мозга крыс в астроциты и нейроны // Сибирское медицинское обозрение. – 2013. – № 6. – С. 9-12.
2. Салмина А.Б., Инжутова А.И., Моргун А.В., Окунева О.С., Малиновская Н.А., Лопатина О.Л., Петрова М.М., Таранушенко Т.Е., Фурсов А.А., Кувачева Н.В. НАД⁺-конвертирующие ферменты в клетках нейрональной и глияльной природы: CD38 как новая молекула-мишень для нейропротекции // Вестник РАМН. – 2012. – № 10. – С. 29-37.
3. Салмина А.Б., Малиновская Н.А., Кувачева Н.В., Моргун А.В., Хилажева Е.Д., Горина Я.В., Пожиленкова Е.А., Фролова О.В. Коннексиновые и паннексиновые транспортные системы в клетках нейроваскулярной единицы головного мозга // Нейрохимия. – 2014. – Т. 31, № 2. – С. 122-133.
4. Chen Y., Swanson R.A. Astrocytes and brain injury // *Cereb. Blood Flow Metab.* – 2003. – № 2. – P. 137-149.
5. Lu C.T., Zhao Y.Z., Wong H.L., Cai J., Peng L., Tian X.Q. Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers // *Int. J. Nanomedicine.* – 2014. – № 9. – P. 2241-2257.
6. Nakase T., Maeda T., Yoshida Y., Nagata K. Ischemia alters the expression of connexins in the aged human brain // *J. of Biomedicine and Biotechnology.* – 2009. – № 2009. – Article ID 147946.
7. Valle-Casuso J.C., González-Sánchez A., Medina J.M., Tabernero A. HIF-1 and c-Src mediate increased glucose uptake induced by endothelin-1 and connexin43 in astrocytes // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 2. – e32448.
8. Zehendner C.M., White R., Hedrich J., Luhmann H.J. A neurovascular blood-brain barrier in vitro model // *Methods Mol Biol.* – 2014. – № 1135. – P. 403-413.

References

1. Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Komleva Yu.K., Salmina A.B., Kutischeva I.A., Okuneva O.S., Drobushevskaya A.I., Khilazheva E.D. Differentiation of embryonic progenitor cells of rat brain in astrocytes and neurons // *Siberian Medical Review.* – 2013. – № 6. – P. 9-12.
2. Salmina A.B., Inzhutova A.I., Morgun A.V., Okuneva O.S., Malinovskaya N.A., Lopatina O.L., Petrova M.M., Taranushenko T.E., Fursov A.A., Kuvacheva N.V. NAD⁺-converting enzymes in cells of neuronal and glial nature: CD38 as a new target molecule for neuroprotection // *Bulletin of RAMS.* – 2012. – № 10. – P. 29-37.
3. Salmina A.B., Malinovskaya N.A., Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Khilazheva E.D., Gorina Ya.V., Pozhilenkova E.A., Frolova O.V. Connexin and pannexin transport systems in the cells of the brain neurovascular unit // *Neurochemistry.* – 2014. – Vol. 31, № 2. – P. 122-133.
4. Chen Y., Swanson R.A. Astrocytes and brain injury // *Cereb. Blood Flow Metab.* – 2003. – № 2. – P. 137-149.
5. Lu C.T., Zhao Y.Z., Wong H.L., Cai J., Peng L., Tian X.Q. Current approaches to enhance CNS delivery of drugs

across the brain barriers // *Int. J. Nanomedicine.* – 2014. – № 9. – P. 2241-2257.

6. Nakase T., Maeda T., Yoshida Y., Nagata K. Ischemia alters the expression of connexins in the aged human brain // *J. of Biomedicine and Biotechnology.* – 2009. – № 2009. – Article ID 147946.
7. Valle-Casuso J.C., González-Sánchez A., Medina J.M., Tabernero A. HIF-1 and c-Src mediate increased glucose uptake induced by endothelin-1 and connexin43 in astrocytes // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 2. – e32448.
8. Zehendner C.M., White R., Hedrich J., Luhmann H.J. A neurovascular blood-brain barrier in vitro model // *Methods Mol Biol.* – 2014. – № 1135. – P. 403-413.

Сведения об авторах

Моргун Андрей Васильевич – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры педиатрии ИПО, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, г. 1; тел. 8 (391) 2433952; e-mail: 441682@mail.ru.

Кувачева Наталья Валерьевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, г. 1; тел. 8 (391) 2280769; e-mail: natalya.kuvacheva@gmail.com.

Хилажева Елена Дмитриевна – научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, г. 1; тел. 8 (391) 2280769; e-mail: elena.hilazheva@mail.ru.

Пожиленкова Елена Анатольевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, г. 1; тел. 8 (391) 2280769; e-mail: elena.a.pozhilenkova@gmail.com.

Салмина Алла Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, г. 1; тел. 8 (391) 2280769; e-mail: allasalmina@mail.ru.

Authors

Morgun Andrei Vasil'evich – Cand. Med. Sc., Assistant of Pediatric Department of Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation.

Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russia, 660022; Phone: 8(391) 243-39-52; e-mail: 441682@mail.ru.

Kuvacheva Natalya Valerievna, Cand.Farm.Sc., Associate Professor of the Department of Biological Chemistry with the Course of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation.

Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russia, 660022; Phone: 8(391) 228-07-69; e-mail: natalya.kuvacheva@gmail.com.

Khilazheva Elena Dmitrievna - Assistant of the Department of Biological Chemistry with the Course of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russia, 660022; Phone: 8 (391) 228-07-69; e-mail: elena.hilazheva@mail.ru.

Pozhilenkova Elena Anatol'evna – Cand.Biol.Sc., Associate Professor of the Department of Biological Chemistry with the Course of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russia, 660022; Phone: 8(391) 228-07-69; e-mail: elena.a.pozhilenkova@gmail.com.

Salmina Alla Borisovna – PhD, Dr.Med.Sc., Professor, Head of the Department of Biological Chemistry with the Course of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation.

Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russia, 660022; Phone: 8(391) 228-07-69; e-mail: allasalmina@mail.ru.