УДК 616-092.18

## ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛА СD38 И Cx43-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК В НЕЙРОВАСКУЛЯРНОЙ ЕДИНИЦЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2021 г. Е. Д. Хилажева<sup>1, \*</sup>, А. И. Мосягина<sup>1</sup>, А. В. Моргун<sup>1</sup>, Н. А. Малиновская<sup>1</sup>, Я. В. Горина<sup>1</sup>, Е. В. Харитонова<sup>1</sup>, О. Л. Лопатина<sup>1</sup>, А. Б. Салмина<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022 Россия

<sup>2</sup>Отдел исследований мозга Научного центра неврологии, Москва, 125367 Россия

\**E-mail: elena.hilazheva@mail.ru* Поступила в редакцию 06.08.2021 г. После доработки 19.08.2021 г. Принята к публикации 20.08.2021 г.

Известно, что митохондриальная дисфункция может являться триггером или сопутствующим механизмом при развитии болезни Альцгеймера. Также известно, что восстановление внутриклеточной митохондриальной активности нейронов и церебральных эндотелиоцитов возможно за счет переноса неповрежденных митохондрий из других клеток головного мозга, в частности, астроцитов, причем этот перенос митохондрий опосредован белком CD38 и функционально связанным с ним коннексином 43 (Cx43). Отсюда следует, что указанные молекулы перспективны для изучения как в отношении механизмов развития нейродегенерации, так и в отношении возможной модуляции их активности для коррекции неврологического дефицита. Цель настоящей работы заключалась в исследовании изменения числа CD38- и Cx43-иммунопозитивных клеток в составе нейроваскулярной единицы и гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера. Нами показано, что токсическое действие бета-амилоида приводит к значительному увеличению числа CD38- и Cx43-позитивных клеток как в гиппокампе животных *in vivo*, так и в составе модели ГЭБ *in vitro*. Также нами показано, что культивирование изолированных астроцитов в присутствии бета-амилоида приводит к увеличению содержания Cx43 в клетках, причем проницаемость этих полуканалов достоверно увеличивается.

*Ключевые слова:* астроциты, нейроны, эндотелиоциты, болезнь Альцгеймера, митохондрии, CD38, Cx43 **DOI:** 10.31857/S0041377121060067

Болезнь Альцгеймера (БА) является одной из наиболее распространенных нейродегенеративных болезней и находится в фокусе многочисленных исследований уже на протяжении многих лет. Однако многие клеточно-молекулярные звенья патогенеза БА до сих пор остаются малоизученными (Compagnoni et al., 2020), что крайне затрудняет разработку эффективных и безопасных методов профилактики и лечения.

В последнее время в исследованиях процессов нейродегенерации особое внимание привлекают нарушения митохондриальной динамики в клетках нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы. Известно, что в развитии нейродегенеративных процессов задействованы различные механизмы, связанные с митохондриями, в частности дефекты энергопродукции, мутации митохондриальной ДНК, изменения динамики митохондрий и аберрантный гомеостаз ионов Ca<sup>2+</sup> (Franco-Iborra et al., 2018).

Показано, что митохондриальная дисфункция может также являться триггером или сопутствующим механизмом при развитии БА (Swerdlow, 2018). К сожалению, к настоящему времени не разработаны способы фармакологической модуляции для восстанавления аберрантной активности митохондрий и митохондриальной динамики в клетках головного мозга. Однако некоторые исследования показывают, что восстановление митохондриальной активности нейронов и церебральных эндотелиоцитов возможно с использованием репаративного потенциала других клеток, входящих в состав нейроваскулярной единицы (НВЕ) и гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), например, астроцитов. В частности, было показано, что астроциты могут выступать в качестве доноров неповрежденных митохондрий при экспериментальной ишемии головного мозга, причем такой транспорт митохондрий связан с активностью CD38 в астроцитах, а также туннелирующих меж-

**Принятые сокращения:** АДФ и цАДФР – аденозиндифосфат и циклическая АДФ-рибоза соответственно; БА – болезнь Альцгеймера; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; НАД<sup>+</sup> и НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид и его фосфат соответственно; НВЕ – нейроваскулярная единица; А $\beta$  – бетаамилоид; Сх43 – коннексин 43; LY – Lucifer Yellow; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор.

клеточных нанотрубочек и экзосом (микровезикул) (Науакаwa et al., 2016).

CD38 – это трансмембранный гликопротеин, компонент клеточных сигнальных систем, сопряженных в клетках нервной системы с рецепторами многих нейротрансмиттеров. CD38 способен проявлять 2 типа ферментативной активности: АДФ-рибозилциклазную и цАДФ-рибозилгидролазную. Субстратами его являются НАД<sup>+</sup>, его фосфат НАДФ, а также цАДФ-рибоза. Кроме того, благодаря олигомерной структуре, CD38 может проявлять свою активность в качестве каталитически активного транспортера, ответственного за генерацию и вход цАДФ-рибозы в клетку. цАДФ-рибоза, генерируемая с помощью CD38, играет важную роль во многих биологических процессах в головном мозге и других тканях и органах. Примечательно, что такую же транспортную функциональную нагрузку дополнительно может нести и экспрессируемый в шитоплазматической мембране коннексин 43 (Сх43) (Салмина и др., 2012).

Известно, что Сх43 функционально связан с CD38, выполняя функцию канала для поступления НАД<sup>+</sup> из цитозоля во внеклеточное пространство к активному сайту CD38, либо для поступления цАДФ-рибозы, синтезированной внеклеточно, в цитозоль для связывания с рианодиновыми рецепторами и индукции высвобождения кальция из внутриклеточных депо (Bruzzone et al., 2001; Song et al., 2011). Помимо этого, молекулы Сх43, находящиеся на поверхности астроцитов, обеспечивают формирование астроглиального синцития и могут служить в качестве каналов для секреции глиотрансмиттеров и ионов (Osipova et al., 2018). Показано, что в некоторых типах гликолитически активных клеток Сх43опосредованный механизм секреции и (или) транспорта лактата достаточно эффективен (Dovmark et al., 2017), что позволяет предположить его наличие в астроцитах головного мозга.

Интересно, что в условиях подавления гликолиза и окислительногофосфорилированияастроцитыснижают коммуникацию за счет Сх43-опосредованных межклеточных контактов (щелевых), но увеличивают активность Сх43-полуканалов, высвобождающих во внеклеточное пространство ионы и метаболиты (Contreras et al., 2002). Кроме того, несмотря на то, что экспрессия гена Сх43 долгое время считалась прерогативой астроцитов, существуют экспериментальные данные, демонстрирующие наличие этой молекулы в клетках нейрональной и эндотелиальной природы (Liu et al., 2012; Johnson et al., 2018), что может обеспечивать механизмы эффективной межклеточной коммуникации в пределах HBE головного мозга.

Вместе с тем, существуют экспериментальные данные, демонстрирующие повышение уровня содержания и активности белков CD38 и Cx43 при ряде нейродегенеративных заболеваний, что может говорить об их вкладе в развитие нейровоспаления и нейродегенерации (Camacho-Pereira, 2016; Yi et al., 2016).

ЦИТОЛОГИЯ том 63 № 6 2021

В соответствии с вышеперечисленными обстоятельствами, изучение CD38 и сопряженного с ним Cx43 является перспективным как в отношении исследования механизмов развития нейродегенерации, в том числе альцгеймеровского типа, так и в отношении возможной модуляции процессов трансфера митохондрий в клетках HBE/ГЭБ для коррекции неврологического дефицита.

Таким образом, целью настоящей работы стало исследование изменения числа CD38 и Cx43-иммунопозитивных клеток в составе HBE/ГЭБ головного мозга при экспериментальной БА.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты исследования. Животные. Для экспериментов *in vivo* использовали мышей-самцов линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. Животным с экспериментальной БА вводили бета-амилоид (Аβ) в СА1 зону гиппокампа. Контрольную группу составляли ложно-оперированные животные после введения в гиппокамп растворителя для  $A\beta$  – фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). Всего использовали 20 животных (n = 20). В экспериментах *in vitro* для получения первичных культур клеток использовали крыс линии Wistar. Общее число животных n = 14.

Животных содержали в клетках со свободным доступом к воде и корму при постоянной температуре 21  $\pm$  1°C и регулярном световом цикле 12 ч день и 12 ч ночь. Исследования на животных проводили в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС).

Клетки. Использовали первично-выделенные культуры клеток церебрального эндотелия, астроцитов и нейросфер (НСФ). Из НСФ путем направленной дифференцировки получали сокультуру астроцитов и нейронов. Контрольную группу составляли интактные клетки, экспериментальную — клетки, культивируемые в течение 1 сут в присутствии Аβ в конечной концентрации 100 нМ.

Моделирование нейродегенерации *in vivo*. Моделирование БА осуществляли интрагиппокампальным введением А $\beta$  билатерально по 1 мкл в зону CA1 по стереотаксическим координатам ML = ±1.3 мм, AP = 2.0 мм, DV = -1.9 мм (Epelbaum et al., 2015). А $\beta$  (Sigma-Aldrich, CША) перед введением животным растворяли в PBS до концентрации 50 мкМ с последующей агрегацией в термостате при 37°C в течение 7 сут. Оценку признаков БА проводили, начиная с 10-х сут (Sipos et al., 2007) после оперативного вмешательства. Модель БА верифицировали с помощью окрашивания тиофлавином S. После введения амилоида в ткани головного мозга наблюдали флуоресцирующие амилоидные бляшки зеленого цвета.

Приготовление срезов и иммуногистохимия. Для фиксации тканей осуществляли транскардиальную перфузию 4%-ным параформальдегидом с последующим забором головного мозга. Далее изолированный мозг фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине, после чего погружали в 20%-ный раствор сахарозы.

С помощью микротома Microm HM 650 (Thermo Scientific, США) изготавливали срезы толщиной 50 мкм. Наличие в образцах исследуемых маркеров определяли методом непрямой иммуногистохимии для свободно плавающих срезов (Encinas, Enikolopov, 2008).

После промывки в PBS срезы блокировали 3%-ным козьим сывороточным альбумином в PBS и 1%-ном Тритоне Х-100 в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим инкубированием в течение ночи с первичными антителами в разведении 1:1000 в 3%-ном BSA в PBS и 0.2%-ном Тритоне X-100 при 4°C. Использовали первичные моноклональные крысиные антитела к CD31 (MBS532307; MyBioSource.com, США). куриные поликлональные антитела к нейронспецифической енолазе (NSE) (GTX85462; GeneTex, США), мышиные моноклональные антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) (MBS8241552; MyBioSource.com, США), кроличьи поликлональные антитела к Cx43 (MBS9600634; Му-BioSource.com, США) и кроличьи поликлональные антитела к CD38 (GTX37752; GeneTex, США). После инкубации с первичными антителами срезы промывали и инкубировали со вторичными антителами в разведении 1:1000 в течение 2 ч при комнатной температуре. Использовали вторичные поликлональные антитела (все от Аbcam. Великобритания): ослиные, специфичные к кролику, Alexa Fluor 555 (ab150074); козьи, специфичные к курице, Alexa Fluor 647 (ab150171); козьи, специфичные к мыши, Alexa Fluor 647 (ab150115); козьи, специфичные к крысе, Alexa Fluor 647 (ab150159. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 10і (Япония). В срезах головного мозга в НВЕ считали абсолютное число клеток в поле зрения нейрональной (NSE-позитивные), астроглиальной (GFAP-позитивные) и эндотелиальной (CD31-позитивные) природы, имеющих целевые молекулы (Сх43, CD38) на различных уровнях в гиппокампе. Каждый эксперимент проводили в 10 повторностях. Оценивали не менее пяти полей зрения в каждом срезе гиппокампа.

Выделение и культивирование церебральных эндотелиоцитов. Использовали модифицированный протокол (Liu et al., 2013). Выделение мозга с удалением мозговых оболочек и крупных церебральных сосудов осуществляли с помощью роллинга на фильтровальной бумаге. Выделяли кору головного мозга и удаляли крупные сосуды в холодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия). Мелконарезанную кору головного мозга центрифугировали в пробирке объемом 15 мл в течение 3 мин при 150 g и комнатной температуре. Последующие этапы включали:

1) добавление к осадку в двукратном объеме 25%ной FBS (HyClone, CША), тритурирование 25 раз пипеткой 5 мл с последующим центрифугированием гомогената в течение 10 мин при 600 g при комнатной температуре;

 забор самого нижнего слоя и перенос в новую коническую пробирку 15 мл; 3) повторение этапов тритурирования и центрифугирования три раза, после чего проводили ферментативную обработку пеллета в растворе 0.1%-ной коллагеназы II (ПанЭко, Россия) в течение 35 мин при  $37^{\circ}$ С с периодическим перемешиванием и дальнейшим центрифугированием в течение 5 мин при 200 g;

4) умеренное ресуспензирование осадка в питательной среде и посев в культуральные флаконы.

Культивирование эндотелиальных клеток осуществляли при 37°С, 5% СО<sub>2</sub> в культуральных флаконах, предварительно покрытых 0.1%-ным раствором желатина (Biological Industries, США) в культуральной среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 20% FBS (Ну-Clone, США), а также 0.58 мг/мл глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Смену среды проводили каждые 3 сут.

Выделение и культивирование нейросфер. Животных декапитировали после охлаждения на льду и производили забор головного мозга. Мозг помещали в ледяной раствор 2%-ной глюкозы в PBS (ПанЭко, Россия). Выделяли интересующие регионы (гиппокамп, стенки боковых желудочков) и иссекали до размеров 1 мм<sup>3</sup>. После окончания диссекции выделенную ткань переносили в свежий раствор 2%-ной глюкозы в PBS (в конической пробирке 14 мл) на 1 мин. После осаждения ткани удаляли супернатант. Оставшуюся ткань ресуспензировали в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США). Проводили тритурацию ткани (25-30 раз) стерильным пластиковым наконечником до получения однородной суспензии клеток. К полученной суспензии добаляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation. Через 2 мин после осаждения неразделенных кусочков ткани под силой тяжести собирали супернатант и переносили его в новую стерильную пробирку объемом 14 мл. Собранный супернатант центрифугировали при 150 g в течение 5 мин, после чего удаляли супернатант и добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation с последующей тритурацией. Полученную клеточную суспензию переносили в культуральные флаконы Т-75 см<sup>2</sup> с 25 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation. Культивирование осуществляли в условиях инкубатора при 5% СО<sub>2</sub> и 37°С. Через 24-48 ч после выделения наблюдали образование нейросфер.

Получение культуры астроцитов. Использовали направленную дифференцировку нейросфер в среде Astrocyte Medium (ScienCell, США) следующего состава: базальная среда (Basal Medium, ScienCell, США), 10% FBS (HyClone, США), AGS (ScienCell, США), раствор пенициллина-стрептомицина (ScienCell, США) в конечной концентрации 50 ед./мл (Хилажева и др., 2015). Через 7–9 сут наблюдали образование монослоя астроцитов.

Получение сокультуры астроцитов и нейронов. Нейросферы направленно дифференцировали в астроциты и нейроны. Нейросферы ресуспендировали в культуральной среде NeuroCult NS-A Differentiation Kit (StemCell, США) и засевали в культуральные флаконы Т-75 см<sup>2</sup>. Через 5—7 сут наблюдали образование сокультуры астроцитов и нейронов.

Получение модели ГЭБ in vitro. Для получения модели ГЭБ сокультуру астроцитов и нейронов засевали на дно лунок культурального планшета, затем в лунки устанавливали культуральные вставки (Corning-Costar, США), на которые помещали эндотелиоциты. Соотношение количества эндотелиоцитов, астроцитов и нейронов составляло 1 : 2 : 1 соответственно. Смесь клеток культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 20% FBS (HyClone, США), а также 0.58 мг/мл глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (все от ПанЭко, Россия) в условиях инкубатора при 37°С и 5% СО<sub>2</sub>.

Оценка Сх43-опосредованного транспорта в астроцитах в присутствии и в отсутствие А $\beta$ . Астроциты засевали в 12-луночный культуральный планшет по  $2.5 \times 10^5$  клеток на 1 лунку. После достижения 95% конфлюентности производили замену культуральной среды на среду с А $\beta$  в конечной концентрации 100 нМ. Через 1 сут культивирования в среде с А $\beta$ оценивали Сх43-опосредованный транспорт в астроцитах с использованием красителя Lucifer Yellow (LY), а также иммуноцитохимически с использованием Сх43-антител.

Для оценки Сх43-опосредованной проницаемости астроциты культивировали в среде, содержащей флуоресцентный краситель LY в конечной концентрации 50 мкМ. Через 24 ч среду с LY убирали, клетки промывали раствором PBS и оценивали интенсивность флуоресценции красителя в астроцитах с помощью флуоресцентного микроскопа ZOE (Bio-Rad, США).

Иммуногистохимическое выявление белков CD38 и **Сх43 в культурах** *in vitro*. Клетки фиксировали в 4%ном параформальдегиде в течение 15 мин, после чего отмывали раствором PBS. Наличие в клетках исследуемых маркеров определяли методом непрямой иммуногистохимии. Использовали первичные поликлональные антитела: к белкам плотных контактов ZO1 (козлиные sc-8147; Santa Cruz, США и кроличьи orb11587; Biorbyt, Великобритания); куриные к GFAP (LS-B6299; LSBio, США); мышиные к нейрон-специфичному ядерному белку NeuN (MAB377; Merck Milliроге, США); кроличьи к CD38 (LS-C331640; LSBio, США), кроличьи к Сх43 (ab11370; Abcam, США). Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1:300. Время инкубации составляло 18 ч при 4°С. После инкубации производили 2-х кратную отмывку клеток раствором PBS.

Вторичные поликлональные антитела от Abcam, Великобритания: ослиные, специфичные к мыши, Alexa Fluor 488 (ab150117); ослиные, специфичные к кролику, Alexa Fluor 555 (ab150077) и козьи, специфичные к курице Alexa Fluor 647 (ab150171), а также ослиные, специфичные к козе, Alexa Fluor 488 (A11055; Life Technologies, США). Антитела использовали в разведении 1: 500, время инкубации составляло 2 ч при 37°С. Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (Віо-Rad, США). Наличие изучаемых маркеров изучали в клетках эндотелия (ZO1-позитивные), нейронах (NeuN-позитивные) и астроцитах (GFAP-позитивные). Каждый эксперимент проводили в 6 повторностях. В каждой экспериментальной лунке не менее, чем в пяти полях зрения, считали долю клеток (%) нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы, несущих целевые молекулы.

Статистический анализ. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программ GraphPad Prizm 8.0.1 (версия 8.0, США) и Statplus Professional (AnalystSoft Inc, США), сборка 5.9.8.5/Соге v.5.9.33 и GraphPad 6.0 (США). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова–Смирнова. При отсутствии условий нормальности распределения для сравнения выборок применяли U-критерий Манна–Уитни. Различия принимали значимыми при  $P \leq 0.05$ . Результаты представлены в виде средних значений M и их стандартных отклонений *SD*.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы обнаружили, что у животных с экспериментальной БА регистрируется значимое (P < 0.05) увеличение числа Сх43-позитивных клеток нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Так, абсолютное число нейронов гиппокампа, несущих Сх43, у мышей с моделью БА оказалось выше почти в 2 раза, чем у контрольных животных, а число Сх43позитивных астроцитов — выше в 2.5 раза. Также зарегистрировано значимое увеличение числа эндотелиоцитов, несущих Сх43, у животных с БА (табл. 1).

Выявленное однонаправленное увеличение числа Cx43-позитивных клеток может являться результатом подавления метаболической активности клеток нейроваскулярной единицы (гликолиза, митохондриальной дисфункции), а также быть проявлением нейровоспаления в участках аккумуляции Аβ, вызванного активированными астроцитами.

Далее мы провели иммуноцитохимическое исследование содержания Cx43 в астроцитах и изучение проницаемости коннексиновых полуканалов в астроцитах в условиях *in vitro* с использованием красителя LY. При исследовании содержания Cx43 в астроцитах нами установлено, что число коннексиновых полуканалов в астроцитах при культивировании в присутствии А $\beta$  статистически значимо возрастает по сравнению с контрольной группой ( $P \le 0.05$ , рис. 1*a*). При этом средняя площадь коннексиновых полуканалов в астроцитах экспериментальной группы оказалась в 1.5 раза меньше, чем в интактных астроцитах ( $P \le 0.05$ , рис. 1*б*).

Для оценки Сх43-опосредованной проницаемости астроцитов в культуральную среду вносили флуоресцентный краситель LY и через 24 ч оценивали интенсивность флуоресценции красителя в астроцитах. Известно, что захват этого флуоресцентного

ЦИТОЛОГИЯ том 63 № 6 2021

красителя из внеклеточного пространства в Cx43<sup>+</sup>клетках опосредуется именно активностью Cx43-полуканалов (Lagos-Cabré et al., 2018). В результате исследования нами было выявлено, что в астроцитах, культивированных в присутствии A $\beta$ , интенсивность флуоресценции красителя LY была в 1.5 раза выше, чем в интактных астроцитах ( $P \le 0.05$ , рис. 2).

Таким образом, астроциты гиппокампа демонстрируют увеличение числа Cx43 в ответ на токсическое действие  $A\beta$  *in vitro*, причем проницаемость этих полуканалов значимо увеличивается. С учетом данных о том, что метаболическое повреждение астроцитов вызывает активацию Cx43-полуканалов, эти данные могут быть интерпретированы и как доказательство нарушения процессов продукции энергии в аффектированных астроцитах в результате развития митохондриальной дисфункции, и как свидетельство их активации, необходимой для развития нейровоспаления.

Далее нами исследовано число CD38-позитивных клеток в гиппокампе животных с экспериментальной БА, т.е. клеток, несущих молекулу, потенциально сопряженную (в функциональном аспекте) с Cx43. В результате, было выявлено статистически значимое снижение CD38<sup>+</sup>-нейронов в гиппокампе головного мозга животных после интрагиппокампального введения АВ по сравнению с ложно-оперированными животными (Р≤0.05, табл. 2). В клетках эндотелиальной природы, напротив, отмечали двукратное увеличение числа CD38<sup>+</sup>-клеток в группе с экспериментальной БА относительно группы контроля ( $P \le 0.05$ , табл. 1). Однако не было выявлено статистически значимых отличий при сравнении количества CD38<sup>+</sup>-астроцитов в гиппокампе животных контрольной и экспериментальной групп.

Причиной увеличения числа CD38-позитивных клеток может быть их повреждение, а также дисфункция митохондрий, косвенным подтверждением чего является увеличение содержания Cx43 как маркера метаболического ингибирования. Ранее было показано, что повреждение митохондрий вызывает открытие мегаканалов (MPT) в местах контакта их

Таблица 1. Число Сх43- и СD38-позитивных клеток на срезах гиппокампа мышей контрольных и с экспериментальной БА

Условия	Число клеток, ед. ( $M \pm SD$ )		
	нейроны	астроциты	эндотелиоциты
Cx43 <sup>+</sup>			
Контроль	$6.81 \pm 1.22$	$2.94\pm0.39$	$6.63 \pm 1.05$
БА	$11.27 \pm 1.41$	$7.36\pm0.76$	$8.25\pm0.93$
	(P = 0.0018)	$(P \le 0.0001)$	(P = 0.0361)
CD38 <sup>+</sup>			
Контроль	$8.6\pm0.84$	$8.73\pm0.89$	$4.2 \pm 1.8$
БА	$4.75\pm0.42$	$8.11\pm0.81$	$7.1 \pm 0.46$
	(P = 0.0003)		(P = 0.0361)

внутренней и внешней мембран, что вызывает высвобождение в цитозоль НАД<sup>+</sup> (выступающего в качестве субстрата для CD38) и белков с проапоптотической активностью (Alano et al., 2007). В этом контексте вполне объяснимо, почему астроциты не демонстрируют значимого увеличения содержания CD38 *in vivo*:

1) астроциты являются более устойчивыми к повреждению в силу того, что максимально экипированы ферментами гликолиза и могут продуцировать АТФ даже при значимом подавлении активности митохондрий; 2) они имеют минимальное количество митохондрий по сравнению с нейронами и эндотелиоцитами, что позволяет им избегать выраженного окислительного стресса; 3) они имеют высокую концентрацию НАД<sup>+</sup>, причем преимущественно в цитозоле, тогда как нейроны и эндотелиоциты имеют меньшие уровни НАД<sup>+</sup>, который, в основном, аккумулируется в митохондриях; 4) они имеют высокий уровень содержания Сх43 и могут благодаря этому регулировать биодоступность НАД<sup>+</sup> для других астроцитов в составе астроглиального синцития (Alano et al., 2007).

Далее мы проверили, насколько это справедливо для клеток HBE головного мозга при токсическом



**Рис. 1.** Содержание Сх43 в астроцитах *in vitro* в физиологических условиях в контроле и в присутствии Аβ (100 нМ). *a* – Число коннексиновых полуканалов, *б* – средняя площадь сигнала флуоресценции.



**Рис. 2.** Интенсивность захвата красителя Lucifer Yellow астроцитами из среды культивирования *in vitro* в контрольных условиях и в присутствии 100 нМ Аβ. ИΦ – интенсивность флуоресценции.

действии  $A\beta$  *in vitro*. Мы оценили количество Cx43позитивных и CD38-позитивных клеток эндотелия, нейронов и астроцитов, культивируемых совместно в течение 24 и 48 ч в статической модели ГЭБ *in vitro* в присутствии и в отсутствие  $A\beta$ .

Так, при культивировании клеток ГЭБ в присутствии А $\beta$  через 24 ч было выявлено статистически значимое увеличение количества CD38-позитивных эндотелиоцитов, которое сохранялось в течение 48 ч культивирования ( $P \le 0.05$ , рис. 3*a*). К этому же времени (48 ч) было зафиксировано и статистически значимое увеличение в присутствии А $\beta$  количества астроцитов и нейронов, несущих CD38 ( $P \le 0.05$ , рис. 3*б*, *в*).

При анализе количества Сх43-позитивных клеток в составе ГЭБ при культивировании в присутствии А $\beta$  было выявлено статистически значимое увеличение числа Сх43<sup>+</sup>-астроцитов ( $P \le 0.05$ , рис. 4 $\delta$ ), которое сохранялось на протяжении всего времени наблюдения (24 и 48 ч). Также было зафиксировано увеличение количества Сх43<sup>+</sup>-эндотелиоцитов и нейронов (48 ч культивирования с А $\beta$ ) ( $P \le 0.05$ , рис. 4a, e).

Таким образом, нами выявлено, что токсическое действие  $A\beta$  *in vitro* приводит к значительному увеличению количества Cx43-позитивных и CD38-позитивных клеток в составе модели ГЭБ. Это соответствует изменениям, зарегистрированным нами при исследовании действия  $A\beta$  *in vivo*.

Между тем известно, что выраженное увеличение экспрессии CD38 в клетках может приводить к значительному истощению уровня НАД<sup>+</sup> (Camacho-Pereira et al., 2016), поэтому увеличение количества CD38-иммунопозитивных нейронов и эндотелиоцитов способно усугублять последствия митохондриальной дисфункции и активировать механизмы клеточной гибели. Снижение уровня НАД<sup>+</sup> может быть одной из причин возрастных дисфункций, оказывающих влияние на процесс развития болезни Альцгеймера (Lautrup et al., 2019). Отмечается, что процесс старения сопровождается увеличением экспрессии в клетках CD38, контролирующего уровень НАД<sup>+</sup> (Chini, 2009). Известно, что у мышей экспрессия и активность CD38 увеличиваются во время старения, а CD38 вносит значительный вклад в связанное с возрастом истощение НАД<sup>+</sup> и митохондриальную дисфункцию, по крайней мере частично за счет ингибирования активности НАД<sup>+</sup>-зависимых сиртуинов (гистоновых деацетилаз) (Camacho-Pereira et al, 2016). Нокдаун CD38 у мышей линии APP/PS1 уменьшает аккумуляцию АВ и уровни растворимого АВ, а также восстанавливает пространственное обучение, возможно, за счет повышения уровня НАД+ в мозге (Blacher et al., 2015). Выявлено (Camacho-Pereira et al., 2016), что экспрессия и активность CD38 при нейродегенеративных заболеваниях возрастают, что является первым косвенным доказательством участия CD38 в нейродегенерации и нейровоспалении.

С другой стороны, в экспериментальной модели гипоксии на клеточных культурах доказано, что CD38 участвует в переносе митохондрий от астроцитов к нейронам после инсульта (Hayakawa et al., 2016), что позволяет рассматривать CD38-экспрессирующие астроциты в качестве клеток-доноров митохондрий для нейронов и эндотелиоцитов при нейродегенерации, индуцированной токсическим действием Аβ.

Также известно, что содержание Сх43 увеличивается в астроцитах, окружающих амилоидные бляшки, как в головном мозге пациентов с БА (Nagy et al., 1996), так и в головном мозге мышей с генетической моделью БА линии APP/PS1 (Yi et al., 2016), тем самым способствуя снижению жизнеспособности нейронов и развитию синаптической дисфункции. В культуре клеток АВ не только запускает активацию Сх43-полуканалов, но и глиальных глутаматных и пуринергических рецепторов; последние, в свою очередь, высвобождают АТФ и глутамат, что способствует повреждению и гибели нейронов (Koulakoff et al., 2012). Кроме того, Сх43-опосредованное высвобождение  $AT\Phi$ , зарегистрированное у мышей линии APP/PS1, провоцирует дальнейшее прогрессирование нейродегенерации (Delekate et al., 2014). Интересно, что уменьшение уровня содержания Сх43 или его фармакологическое ингибирование у мышей линии APP/PS1 приводит к выраженному снижению дистрофических изменений нейритов, уменьшению митохондриального окислительного стресса, а также препятствует прогрессированию когнитивных нарушений на фоне отсутствия видимого уменьшения отложения  $A\beta$  в головном мозге (Ren et al., 2018).

Сдругой стороны, ряд исследований показывает, что Сх43обладаетнейропротекторнымэффектом (Kozorizet al., 2010a; Le et al., 2013). Согласно недавно полученным данным (Kajiwara et al., 2018), экспрессия Сх43 при аккумуляции А $\beta$  вткани головного мозга защищает клетки от альтерации. В этом контексте важно отметить, что Сх43 экспрессируется и на мембранах митохондрий, чтобыло убедительно показано для клеток миокарда (Rodríguez-Sinovas et al., 2018), жировой ткани (Kim et al., 2017) и астроцитов (Kozoriz et al., 2010b). Выяснение, насколько

ЦИТОЛОГИЯ том 63 № 6 2021



**Рис. 3.** Количество CD38-позитивных клеток в модели ГЭБ *in vitro* при культивировании в контрольных условиях и в присутствии 100 нМ Аβ. *a* – Эндотелиоциты, *б* – астроциты, *в* – нейроны.



**Рис. 4.** Количество Сх43-позитивных клеток в модели ГЭБ *in vitro* при культивировании в контрольных условиях и в присутствии 100 нМ Аβ. *a* – Эндотелиоциты, *δ* – астроциты, *в* – нейроны.

ЦИТОЛОГИЯ том 63 № 6 2021

митохондриальнаялокализация Сх43актуальнадля клеток НВЕ при экспериментальной БА, требует дальнейшего экспериментального исследования.

Таким образом, белки CD38 и Cx43 можно рассматривать в качестве перспективных мишеней для фармакологической модуляции при нейродегенерации, в том числе альцгеймеровского типа.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена при финансовой поддержке Программы Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ (РФ НШ-2547.2020.7).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных проведены в соответствии с общепринятыми этическими международными нормами с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/EC) и требованиями приказа Минздрава России № 267 от 19.06.2003 "Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации".

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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. 2012. НАД<sup>+</sup>конвертирующие ферменты в клетках нейрональной и глиальной природы: CD38 как новая молекула-мишень для нейропротекции. Вестник Росс. акад. мед. наук. Т. 67. № 10. С. 29. (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.A. Kuvacheva N.V. 2012. NAD<sup>+</sup>-converting enzymes in neuronal and glial cells: CD38 as a novel target for neuroprotection. Ann. Russ. Acad. Med. Sci. V. 67. № 10. Р. 29.)
- Хилажева Е.Д., Бойцова Е.Б., Пожиленкова Е.А., Солончук Ю.Р., Салмина А.Б. 2015. Получение трехклеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro*. Цитология. Т. 57. № 10. С. 710. (*Khilazheva E.D., Boytsova E.B., Pozhilenkova E.A., Solonchuk Yu.R., Salmina A.B.* 2015. The model of neurovascular unit *in vitro* consisting of three cells types. Tsitologiya. V. 57. № 10. Р. 710.)
- Alano C.C., Tran A., Tao R., Ying W., Karliner J.S., Swanson R.A. 2007. Differences among cell types in NAD(+) compartmentalization: a comparison of neurons, astrocytes, and cardiac myocytes. J. Neurosci. Res. V. 85. P. 3378. https://doi.org/10.1002/jnr.21479
- Blacher E., Dadali T., Bespalko A., Haupenthal V.J., Grimm M.O., Hartmann T., Lund F.E., Stein R., Levy A. 2015. Alzheimer's disease pathology is attenuated in a CD38-deficient mouse model. Ann. Neurol. V. 78. P. 88. https://doi.org/10.1002/ana.24425
- Bruzzone S., Franco L., Guida L., Zocchi E., Contini P., Bisso A., Usai C., De Flora A. 2001. A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD<sup>+</sup> and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts.

ЦИТОЛОГИЯ том 63 № 6 2021

J. Biol. Chem. V. 276. P. 48300.

https://doi.org/10.1074/jbc.M107308200

- Camacho-Pereira J., Tarrago M.G., Chini C.C.S., Nin V., Escande C., Warner G.M., Puranik A.S., Schoon R.A., Reid J.M., Galina A., Chini E.N. 2016. CD38 Dictates age-related NAD decline and mitochondrial dysfunction through an SIRT3-dependent mechanism. Cell Metab. V. 23. P. 1127. https://doi.org/1016/j.cmet.2016.05.006
- *Chini E.N.* 2009. CD38 as a regulator of cellular NAD: A novel potential pharmacological target for metabolic conditions. Curr. Pharm. Des. V. 15. P. 57. https://doi.org/10.2174/138161209787185788
- Compagnoni G.M., Fonzo A.D., Corti S., Comi G.P. 2020. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: The lesson from Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Mol. Neurobiol. V. 57. P. 2959. https://doi.org/10.1007/s12035-020-01926-1
- Contreras J.E., Sánchez H.A., Eugenin E.A., Speidel D., Theis M., Willecke K., Bukauskas F.F., Bennett M.V., Sáez J.C. 2002. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 99. P. 495. https://doi.org/10.1073/pnas.012589799
- Delekate A., Füchtemeier M., Schumacher T., Ulbrich C., Foddis M., Petzold G.C. 2014. Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. Nat. Commun. V. 5. https://doi.org/10.1038/ncomms6422
- Dovmark T.H., Saccomano M., Hulikova A., Alves F., Swietach P. 2017. Connexin-43 channels are a pathway for discharging lactate from glycolytic pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Oncogene. V. 36. P. 4538. https://doi.org/10.1038/onc.2017.71
- *Encinas J.M., Enikolopov G.* 2008. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. Methods Cell. Biol. V. 85. P. 243. https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)85011-X
- *Epelbaum S., Youssef I., Lacor P.N., Chaurand P., Duplus E., Brugg B., Duyckaerts C., Delatour B.* 2015. Acute amnestic encephalopathy in amyloid-β oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion in vivo. Neurobiol. Aging. V. 36. P. 2043.

https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.005

- Franco-Iborra S., Vila M., Perier C. 2018. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases: Focus on Parkinson's disease and Huntington's disease. Front. Neurosci. V. 12. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00342
- Hayakawa K., Esposito E., Wang X., Terasaki Y., Liu Y., Xing C., Ji X., Lo E.H. 2016. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. Nature. V. 535. P. 551. https://doi.org/10.1038/nature18928
- Johnson A.M., Roach J.P., Hu A., Stamatovic S.M., Zochowski M.R., Keep R.F., Andjelkovic A.V. 2018. Connexin 43 gap junctions contribute to brain endothelial barrier hyperpermeability in familial cerebral cavernous malformations type III by modulating tight junction structure. FASEB J. V. 32. P. 2615.

https://doi.org/10.1096/fj.201700699R

- Kajiwara Y., Wang E., Wang M., Sin W.C., Brennand K.J., Schadt E., Naus C.C., Buxbaum J., Zhang B. 2018. GJA1 (connexin43) is a key regulator of Alzheimer's disease pathogenesis. Acta Neuropathol. Commun. V. 6. P. 144. https://doi.org/10.1186/s40478-018-0642-x
- Kim S.N., Kwon H.J., Im S.W., Son Y.H., Akindehin S., Jung Y.S., Lee S.J., Rhyu I.J., Kim I.Y., Seong J.K., Lee J., Yoo H.C.,

*Granneman J.G., Lee Y.H.* 2017. Connexin 43 is required for the maintenance of mitochondrial integrity in brown adipose tissue. Sci. Rep. V. 7. P. 7159.

https://doi.org/10.1038/s41598-017-07658-y

- Koulakoff A., Mei X., Orellana J.A., Sáez J.C., Giaume C. 2012. Glial connexin expression and function in the context of Alzheimer's disease. Biochim. Biophys. Acta. V. 1818. P. 2048. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.001
- Kozoriz M.G., Bechberger J.F., Bechberger G.R., Suen M.W., Moreno A.P., Maass K., Willecke K., Naus C.C. 2010a. The connexin43 C-terminal region mediates neuroprotection during stroke. J. Neuropathol. Exp. Neurol. V. 69. P. 196. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181cd44df
- Kozoriz M.G., Church J., Ozog M.A., Naus C.C., Krebs C. 2010b. Temporary sequestration of potassium by mitochondria in astrocytes. J. Biol. Chem. V. 285. P. 31107. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082073
- Lagos-Cabré R., Brenet M., Díaz J., Pérez R.D., Pérez L.A., Herrera-Molina R., Quest A.F.G., Leyton L. 2018. Intracellular Ca<sup>2+</sup> increases and connexin 43 hemichannel opening are necessary but not sufficient for Thy-1-Induced astrocyte migration. Int. J. Mol. Sci. V. 19. P. 2179. https://doi.org/10.3390/ijms19082179
- Lautrup S., Sinclair D.A., Mattson M.P., Fang E.F. 2019. NAD<sup>+</sup> in brain aging and neurodegenerative disorders. Cell Metab. V. 30. P. 630. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.09.001
- Le H.T., Sin W.C., Lozinsky S., Bechberger J., Vega J.L., Guo X.Q., Sáez J.C., Naus C.C. 2013. Gap junction intercellular communication mediated by connexin43 in astrocytes is essential for their resistance to oxidative stress. J. Biol. Chem. V. 289. P. 1345.

https://doi.org/10.1074/jbc.M113.508390

- *Liu X., Sun L., Torii M., Rakic P.* 2012. Connexin 43 controls the multipolar phase of neuronal migration to the cerebral cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 109. P. 8280. https://doi.org/10.1073/pnas.1205880109
- Liu Y., Xue Q., Tang Q., Hou M., Qi H., Chen G., Chen W., Zhang J., Chen Y., Xu X. 2013. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells. Microvasc. Res. V. 90. P. 199. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.08.004

- *Nagy J.I., Li W., Hertzberg E.L., Marotta C.A.* 1996. Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease. Brain Res. V. 717. P. 173. https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01526-4
- Osipova E.D., Semyachkina-Glushkovskaya O.V., Morgun A.V., Pisareva N.V., Malinovskaya N.A., Boitsova E.B., Pozhilenkova E.A., Belova O.A., Salmin V.V., Taranushenko T.E., Noda M., Salmina A.B. 2018. Gliotransmitters and cytokines in the control of blood-brain barrier permeability. Rev. Neurosci. V. 29. P. 567. https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0092
- Ren R., Zhang L., Wang M. 2018. Specific deletion connexin43 in astrocyte ameliorates cognitive dysfunction in APP/PS1 mice. Life Sci. V. 208. P. 175. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.07.033
- Rodríguez-Sinovas A., Ruiz-Meana M., Denuc A., García-Dorado D. 2018. Mitochondrial Cx43, an important component of cardiac preconditioning. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. V. 1860. P. 174. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.011
- Sipos E., Kurunczi A., Kasza A., Horvath J., Felszeghya K., Laroche S., Toldi J., Parducz A., Penke B., Penke Z. 2007. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease. Neurosci. V. 147. P. 28. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.04.011
- Song E.K., Rah S.Y., Lee Y.R., Yoo C.H., Kim Y.R., Yeom J.H., Park K.H., Kim J.S., Kim U.H., Han M.K. 2011. Connexin-43 hemichannels mediate cyclic ADP-ribose generation and its Ca<sup>2+</sup>-mobilizing activity by NAD<sup>+</sup>/cyclic ADP-ribose transport. J. Biol. Chem. V. 286. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.307645
- Swerdlow R.H. 2018. Mitochondria and mitochondrial cascades in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. V. 62. P. 1403. https://doi.org/10.3233/JAD-170585
- Yi C., Mei X., Ezan P., Mato S., Matias I., Giaume C., Koulakoff A. 2016. Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease. Cell Death Differ. V. 23. P. 1691. https://doi.org/10.1038/cdd.2016.63

## Changes in the Number of CD38 and Cx43-Immunopositive Cells in the Neurovascular Unit of the Brain in Experimental Alzheimer's Disease

# E. D. Khilazheva<sup>*a*, \*</sup>, A. I. Mosiagina<sup>*a*</sup>, A. V. Morgun<sup>*a*</sup>, N. A. Malinovskaya<sup>*a*</sup>, Ya. V. Gorina<sup>*a*</sup>, E. V. Kharitonova<sup>*a*</sup>, O. L. Lopatina<sup>*a*</sup>, and A. B. Salmina<sup>*a*, *b*</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia

<sup>b</sup> Brain Research Department, Research Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia

\*e-mail: elena.hilazheva@mail.ru

It is known that mitochondrial dysfunction can be a trigger or a concomitant mechanism in the development of Alzheimer's disease. It is also known that the restoration of intracellular mitochondrial activity of neurons and cerebral endotheliocytes is possible due to the transfer of intact mitochondria from other brain cells, in particular, astrocytes, and this transfer of mitochondria is mediated by the CD38 protein and functionally associated with it Cx43, which makes these proteins promising for study both in relation to the study of the mechanisms of development of neurodegeneration, and in relation to the possible modulation of their activity for the correction of neurological deficits. The aim of this work was to study changes in the number of CD38 and Cx43-immunopositive cells in the neurovascular unit and the blood-brain barrier of the brain in experimental Alzheimer's disease. We have shown that the toxic effect of beta-amyloid leads to a significant increase in the number of CD38- and Cx43-positive cells both in the hippocampus of animals in an in vivo experiment and as part of an in vitro blood-brain barrier model. We also showed that the cultivation of isolated astrocytes in the presence of beta-amyloid leads to an increase in the content of Cx43 in cells, and the permeability of these half-channels significantly increases.

Keywords: astrocytes, neurons, endotheliocytes, Alzheimer's disease, mitochondria, CD38, Cx43