

УДК 577.112.6.083.3:615.371.

А.К. Цой<sup>1</sup>, Т.М. Шалахметова<sup>1</sup>, Ш.Н. Аскарлова<sup>2</sup>, Б.А. Умбаев<sup>1</sup>

### Концентрация Р-селектина на поверхности эндотелиоцитов линии bEnd3 и динамика его эндоцитоза

<sup>1</sup>Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Nazarbayev University, Астана

**Аннотация.** В настоящей работе изучено влияние  $\beta$ -амилоида (А $\beta$ 42) на динамику содержания Р-селектина на поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов (линия bEnd3) и на его везикулярный транспорт. Было показано, что А $\beta$ 42 индуцирует выход Р-селектина на поверхность нейроваскулярных эндотелиоцитов в течение одного часа. Вместе с тем А $\beta$ 42, в известной степени, блокирует процесс эндоцитоза Р-селектина с поверхности клеток.

*Ключевые слова:*  $\beta$ -амилоид, Р-селектин, эндоцитоз, эндотелиоциты, рецепторный комплекс, культура клеток.

Болезнь Альцгеймера (БА), среди нейродегенеративных заболеваний является распространенным заболеванием среди пожилых людей, которым страдают примерно 60% пациентов с деменцией [1]. Болезнь Альцгеймера, как известно, характеризуется значительной атрофией холинэргических и глутаматэргических участков мозга, связанной с нарушением синаптических контактов, потерей нейронов и наличием в паренхиме головного мозга так называемых синильных бляшек и нейроваскулярных отложений, основным компонентом которых является  $\beta$ -амилоид (А $\beta$ ) [2].

Известно, что А $\beta$  приводит к дисфункции гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), характеризующейся увеличением трансмиграции клеток крови через ГЭБ и развитием воспалительных процессов [3]. Важнейшая функция ГЭБ – транспорт веществ из кровеносного русла к нейронам и другим клеткам головного мозга с активным участием эндотелиоцитов. В норме стенки сосудов головного мозга не имеют фенестраций, в отличие от капилляров других органов, где транспорт возможен через межклеточные промежутки. Перенос веществ из кровотока в паренхиму мозга через эндотелиоциты осуществляется за счет везикулярного, активного и пассивного транспорта. Как известно, транспорт крупных

молекул (гормоны, трансферины, липопротеины и др. пептиды) осуществляется только с помощью везикулярного транспорта (абсорбцио-, рецептор-опосредованный эндоцитоз) [4]. Нарушение везикулярного транспорта приводит к ухудшению целого ряда функций ГЭБ: дезорганизуется транцитоз веществ, увеличивается проницаемость ГЭБ для антител и лейкоцитов. Увеличение уровня трансмиграции клеток крови в паренхиму мозга в свою очередь может привести к усилению воспалительных процессов [4].

Основным компонентом рецепторного комплекса, ответственным за иницирующие стадии трансмиграции клеток крови через ГЭБ, является белок Р-селектин. В эндотелиоцитах Р-селектин содержится в специальных гранулах – тельца Вейбеля-Паладе. Он появляется на люминальной поверхности эндотелиоцитов уже в первые минуты после активации (например, гистамином) путем экзоцитоза телец Вейбеля-Паладе [5]. Было показано, что через 10 минут после активации на поверхности эндотелиоцитов отмечается максимальная концентрация Р-селектина. Наоборот, через 30 минут его количество на поверхности клеток минимально [5,6]. Р-селектин элиминируется с поверхности эндотелиоцитов посредством клатрин-зависимого эндоцитоза. При этом дальнейший транспорт и

метаболизм клатриновых везикул, содержащих Р-селектин, проходит через стадию ранних эндосом, после чего данный рецептор либо переваривается в клетке, либо обратно встраивается в клеточную мембрану для выполнения своих функций [7].

Таким образом, концентрация Р-селектина на клеточной поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов определяет интенсивность трансмиграции клеток крови через ГЭБ. Его количество на поверхности эндотелиоцитов напрямую зависит от интенсивности процессов эндоцитоза.

Вопрос о том, как Аβ42 влияет на уровень эндоцитоза в динамике и какова его корреляция с содержанием Р-селектина на клеточной поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов, практически не изучен. В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось определение содержания Р-селектина на клеточной поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов и уровня процессов эндоцитоза в эндотелиоцитах мозга при воздействии β-амилоида в динамике.

#### **Материалы и методы исследований** **Культивирование нейроваскулярных** **эндотелиоцитов и их инкубирование** **с β-амилоидом**

В настоящем исследовании использовалась культура нейроваскулярных эндотелиоцитов линии bEnd3 мышей (фирма ATCC). Клетки культивировали на покровных стеклах в стандартной среде DMEM с добавлением 10% бычьей сыворотки и 1% пеницилин-стрептомицина в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (содержание CO<sub>2</sub> – 5%, температура – 37°C). Клетки, которые подвергались воздействию β-амилоида, инкубировали в такой же среде с добавлением Аβ42 в концентрации 5 мкМ [8]. Для этого 5 мМ раствора β-амилоида (American Peptide Company) и растворителя DMSO разводили до концентрации 100 мкМ в ледяной культуральной среде Ham, а затем обрабатывали ультразвуком в течение минуты для получения мономеров Аβ42. Далее для получения из мономеров β-амилоида олигомеры, которые, как известно, являются наиболее токсичными для клеток, их инкубировали при температуре 37°C в течение 2 часов [9].

Культура клеток была разбита на следующие группы: I – контроль (интактные клетки); II, III, IV – опыт (клетки, которые инкубировали с β-

амилоидом (5 мкМ) в течение 10, 30, 60 минут, соответственно). Культуру клеток в контроле и опыте промывали фосфатным буфером при pH 7,4, а затем фиксировали в течение 30 минут в 5% формалине. Затем их снова промывали фосфатным буфером и проводили пермеабиллизацию 0,1% раствором Triton-X100 в течение 3 минут [10].

#### **Иммунофлуоресцентное окрашивание**

Для выявления Р-селектина и маркера ранних эндосом использовали метод иммунофлуоресценции. Для исключения неспецифического связывания антител, после фиксации, до пермеабиллизации, клетки инкубировали в 5% растворе сывороточного альбумина в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем метили Р-селектин первичными антителами (Santa Cruz, 1:200) в течение 12 часов при температуре 4°C, после чего клетки промывали фосфатным буфером 3 раза в течение 10 минут и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флюорофором (Invitrogen, Alexa 594, 1:1000) в течение 1 часа при комнатной температуре. После пермеабиллизации клетки снова промывали фосфатным буфером и инкубировали в 5% растворе сывороточного альбумина, затем с антителами специфичными к маркеру ранних эндосом EEA1 (Abcam, 1:500) в тех же условиях что и для Р-селектина, после чего клетки инкубировали с вторичными антителами (Invitrogen, Alexa 488, 1:1000) в течение 1 ч при комнатной температуре.

#### **Количественная флуоресцентная** **микроскопия**

Качественную визуальную и количественную оценку интенсивности свечения меченных маркеров специфически связанных с Р-селектином и белком ранних эндосом EEA1 производили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon TE-2000 U снабженного ПЗС-фотокамерой и программой Meta View. Для получения флуоресцентных изображений Р-селектина использовали фильтр с экстинкцией 540 нм и эмиссией 620 нм. Для визуализации маркера ранних эндосом EEA1 использовали фильтр с экстинкцией 480 нм и эмиссией 535 нм. Для получения иммунофлуоресцентных снимков меченого Р-селектина и маркера ранних

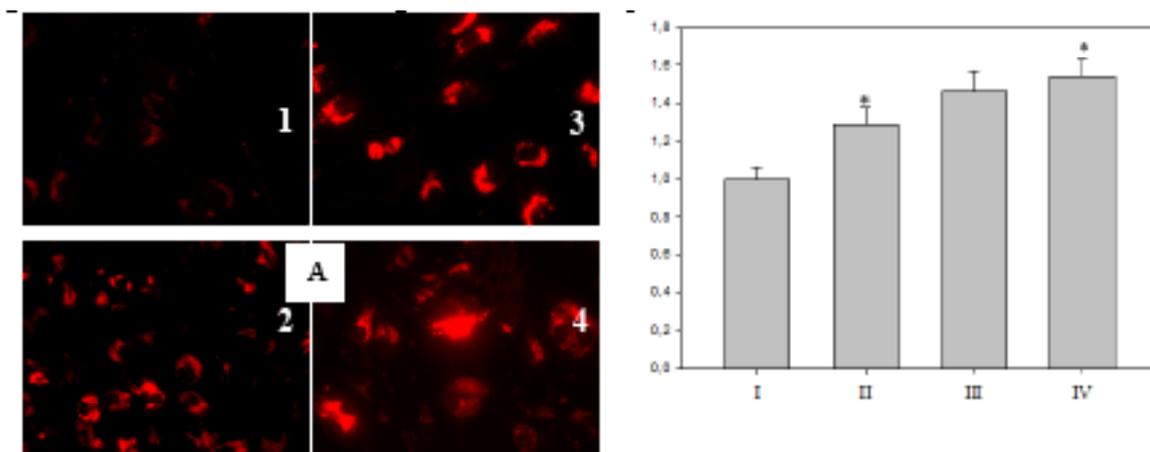
эндосом EEA1 использовали одинаковые параметры экспозиции 400 миллисекунд. Количественную оценку производили путем определения интенсивности свечения меченых маркеров в условных единицах. Измерение производили в 500 клетках в каждой группе исследований.

### Результаты исследований и их обсуждение

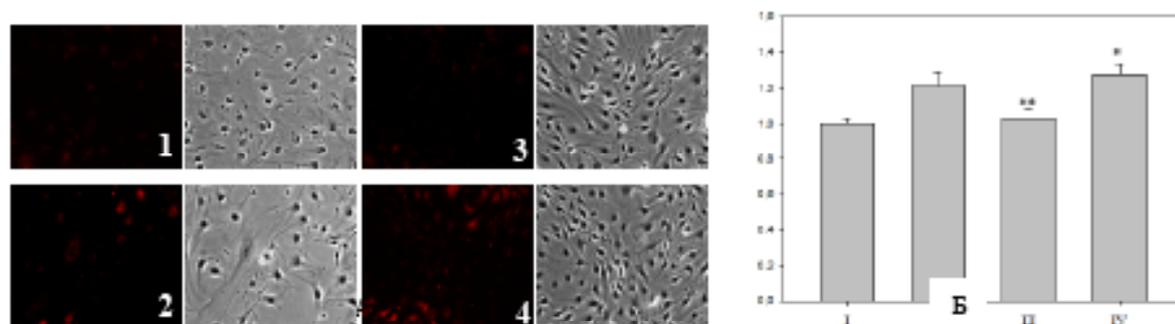
Результаты иммунофлуоресцентного анализа уровня Р-селектина на поверхности эндотелиоцитов у исследуемых групп представлены на рисунке 1(А,Б). Видно, что интенсивность свечения поверхности интактных клеток минимальна (рисунок 1,А-1), а при воздействии Аβ42 она возрастает (рисунок 1,А-2-4), причем с увеличением продолжительности воздействия – значительна. Количественный флуоресцентный анализ интенсивности свечения на поверхности подтвердил

данное визуальное наблюдение (рисунок 1,Б). Было установлено, что содержание Р-селектина на поверхности эндотелиоцитов возрастает в зависимости от продолжительности воздействия Аβ42: через 10 минут – на 28%, 30 минут – на 46%, 60 минут – на 54% (рисунок 1,Б).

Результаты количественного иммунофлуоресцентного определения маркера ранних эндосом в эндотелиоцитах линии bEnd3 представлены на рисунке 2. Видно, что по сравнению с контролем через 10 минут воздействия β-амилоидом (Аβ42) уровень ранних эндосом возрастал на 22%, что свидетельствует об увеличении уровня эндоцитоза. Через 30 минут интенсивность флуоресценции маркера ранних эндосом снижалась, но не достигала контрольного уровня. Через 1 час воздействия Аβ42 количество ранних эндосом вновь увеличивалось, на 28% по сравнению с контролем.



**Рисунок 1.** Иммунофлуоресценция Р-селектина на поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов (А) и его содержание (усл.ед) в зависимости от длительности воздействия Аβ (Б): I – контроль (без воздействия); II – в течение 10 минут; 3) III группа – в течение 30 минут; 4) IV группа – в течение 60 минут. \*  $P \leq 0,05$ .



**Рисунок 2.** Иммунофлуоресценция маркера EEA1 ранних эндосом в нейроваскулярных эндотелиоцитах (А) и их содержание в зависимости от длительности воздействия Аβ (Б): I – контроль (без воздействия); II – в течение 10 минут; 3) III группа – в течение 30 минут; 4) IV группа – в течение 60 минут. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ .

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что Аβ42 индуцирует выход Р-селектина на поверхность нейроваскулярных эндотелиоцитов в течение всего периода воздействия. Вместе с тем, Аβ42, в известной степени, блокирует процесс эндоцитоза Р-селектина с поверхности клеток, о чем свидетельствует увеличение его уровня через 60 минут воздействия. По-видимому, наблюдаемое также увеличение образования ранних эндосом (на 28%) через 60 минут после воздействия Аβ42 явно недостаточно для полной элиминации рецепторного белка с поверхности. Вероятно, β-амилоид нарушает нормальную работу внутриклеточных механизмов регуляции Р-селектина и в том числе клаптин-зависимого эндоцитоза.

Как уже отмечалось ранее, наличие на поверхности данного белка способствует трансмиграции клеток крови через ГЭБ, что может привести к развитию воспалительных процессов в мозге. Установление механизмов эндоцитоза Р-селектина в нейроваскулярных эндотелиоцитах может позволить разработать новые способы лечения болезни Альцгеймера на ранних этапах.

## Литература

1 Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. Principles of Neural Science Fourth Edition. - 2000. - 1423 p.

2 Gonsalves D., Jovanovic K., Da Costa Dias B., Weiss SF., Global Alzheimer Research Summit: Basic and clinical research: Present and future Alzheimer research. // Prion. – 2012. - № 6 (1)7 – P. 7-10.

3 Bell, R., Zlokovic, B., 2009. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease // Acta Neuropathologica. – 2008.

- № 4 (118). – С.103-113.

4 Bradbury, M.W. The blood-brain barrier. Transport across the cerebral endothelium // Circ Res. - 1985. - № 57. – P. 213-222.

5 Alon, R., Hammer, D.A., Springer, T.A., Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow // Nature. - 1995. - № 374. – P. 539-542.

6 Frijns, C.J., Kappelle, L.J., Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease // Stroke. - 2002. - № 33. - p.2115-2122.

7 Jones, D.A., Abbassi, O., McIntire, L.V., McEver, R.P., Smith, C.W. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells // Biophysical J. - 1993. - № 65. - P. 1560-1569.

8 Katherine Joubin, Amelia Richardson, Natalia Novoa, Edmund Tu, and Mark J. Tomishima. The Endothelial Cell Line bEnd.3 Maintains Human Pluripotent Stem Cells // Stem Cells Dev. – 2012. - Feb 21. – P.1345-1356.

9 Fa M, Orozco IJ, Francis YI, Saeed F, Gong Y, Arancio O. Preparation of oligomeric beta-amyloid 1-42 and induction of synaptic plasticity impairment on hippocampal slices // J Vis Exp. – 2010. – Jul. №14 (41). – P.1884-1895.

10 Jamur MC, Oliver C. Permeabilization of cell membranes // Methods Mol Biol. - 2010. -№588. –P.63-69.

11 Coisne, C., Faveeuw, C., Delplace, Y., Dehouck, L., Miller, F., Cecchelli, R., Dehouck, B., 2006. Differential expression of selectins by mouse brain capillary endothelial cells in vitro in response to distinct inflammatory stimuli // Neurosci Letters. – 1992. - №3(46). – P.216-220.

12 Vestweber, D., Blanks, J.E., 1999. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands // Physiol Rev. – 2009. - № 79. – P.181-213.

**Цой А.К., Шалахметова Т.М., Аскарова Ш.Н., Умбаев Б.А.**

**ВEnd3 тізбегінің бетіндегі эндотелиоциттердің Р-селектин концентрация және оның эндоцитоз динамикасы**

Бұл жұмыс β-амилоидтың (Аβ42) нейроваскулярлы эндотелиоциттің беткі бетіндегі Р-селектиннің құрамының динамикасына және оның везикулярлы тасымалдануына әсерін зерттеуге арналған. Жұмыста көрсетілгендей, Аβ42 Р-селектиннің бір сағат ішінде нейроваскулярлы эндотелиоциттің беткі бетіне шығуын белсендіреді. Сонымен қатар Аβ42 клетканың беткі бетіне Р-селектиннің эндоцитоз процесін тежейді.

**Tzoi A.K., Salakhmetova T.M., Askarova Sh.N., Umbayev B.A.**

**Concentration of P-selectine on the surface of bEnd3 endotheliocytes line and dynamics of its endocytosis**

Influence of Aβ42 to the dynamic of expression of P-selectin in neurovascular endotheliocyte's surface (bEnd3) and vesicular transport of this receptor investigated in this research. It was shown that Aβ42 induce expression of P-selectin on the neurovascular endotheliocyte's surface during 1hr of treatment. At the same time, Aβ42 inhibit endocytosis of P-selectin from the cell surface.