

УДК 615.21:615.272.4.014.425

А.К. Цой¹, Т.М. Шалахметова^{1*}, Ш.Н. Аскарлова², Б.А. Умбаев¹

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

²Назарбаев Университет, Казахстан, г. Астана

*E-mail: Tamara.Shalakhmetova@kaznu.kz

Влияние убаина на содержание р-селектина на поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов при воздействии β-амилоида

Аннотация. В настоящем исследовании было изучено влияние убаина на содержание Р-селектина на поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов при воздействии β-амилоида. Установлено, что убаин активирует процессы эндцитоза Р-селектина и регулирует его содержание на поверхности эндотелиоцитов.

Ключевые слова: убаин, Р-селектин, нейроваскулярные эндотелиоциты мозга крыс.

В предыдущем исследовании нами было показано, что β-амилоид (Аβ42) вызывает увеличение содержания Р-селектина на поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов и нарушает процесс рециркуляции данного рецептора клеточной адгезии [1]. Поскольку задержка Р-селектина на поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов может привести к трансмиграции воспалительных клеток через гематоэнцефалический барьер и вызвать нейродегенеративные изменения в мозге [2-4], возникает необходимость поиска препаратов, способствующих регуляции процессов эндцитоза рецепторов клеточной адгезии. Одним из таких веществ может быть убаин – сердечный гликозид, который, как известно, может регулировать клатрин-зависимый эндцитоз в клетках [5-7]. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния убаина на содержание Р-селектина на поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов мозга при воздействии Аβ42.

Культивирование нейроваскулярных эндотелиоцитов и их инкубирование с β-амилоидом. В настоящем исследовании использовалась культура нейроваскулярных эндотелиоцитов линии bEnd3 мышей (ATCC, США). Клетки культивировали на покровных стеклах в стандартной среде DMEM с добавлением 10% бычьей сыворотки и 1% пеницилин-стрептомицина в CO₂-инкубаторе (содержание CO₂ - 5%, температура - 370C) [8]. Для индукции клатрин-зависимого эндцитоза в

культуральную среду добавляли убаин (Sigma, Германия) в концентрации 50 нМ/л. Клетки, которые подвергались воздействию β-амилоида, инкубировали в такой же среде с добавлением Аβ42 в концентрации 5 мкМ. Для этого 5 мМ раствора β-амилоида (American Peptide Company, США) 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 370C в течение 2 часов [9].

Культура клеток была разбита на следующие группы: I – контроль (интактные клетки); II – клетки инкубировали только с убаином в течение 2-х часов; III, V, VII – клетки инкубировали с Аβ42 в течение 10, 30, 60 минут соответственно; IV, VI, VIII – клетки инкубировали с убаином в течение 2-х часов, а затем с Аβ42 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.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Для выявления Р-селектина использовали иммунофлуоресцентный метод. Для исключения неспецифического связывания антител после фиксации 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 40С, 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.

Количественная флуоресцентная микроскопия. Качественную визуальную и количественную оценку интенсивности свечения меченых маркеров, специфически связанных с Р-селектином, 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, время экспозиции составляло 400 миллисекунд. Количественную оценку производили путем определения интенсивности свечения меченых маркеров в условных единицах. Измерение производили в 500 клетках в каждой группе исследований.

Результаты иммунофлуоресцентного анализа содержания Р-селектина на поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов представлены на рисунке 1.

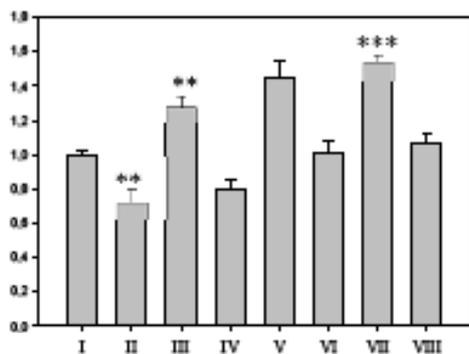


Рисунок 1 - Иммунофлуоресцентный анализ Р-селектина на поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов (усл.ед): I – контроль (без воздействия); II – клетки инкубировали только с убаином; III, V, VII – клетки инкубировали с Аβ42 в течение 10, 30, 60 минут соответственно; IV, VI, VIII – клетки инкубировали с убаином и Аβ42 в течение 10, 30, 60 минут, соответственно. ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Видно, что убаин снижает содержание Р-селектина на поверхности эндотелиоцитов на 27,3% по сравнению с контролем (рисунок

1 - II). Воздействие на клетки β-амилоида (Аβ42) приводит к увеличению содержания Р-селектина на поверхности эндотелиоцитов, причем с увеличением продолжительности воздействия - значительно: через 10 минут на 28%, через 30 минут на 46% и через 60 минут на 54% по сравнению с контролем (рисунок 1. III, V, VII). Напротив, содержание Р-селектина на поверхности клеток, которые инкубировали с убаином и с Аβ42, значительно снижалось: через 10 минут на 48%, через 30 минут на 45,9% и через 60 минут на 48% по сравнению с клетками которые подвергали воздействию только Аβ42 (рисунок 1. IV, VI, VIII).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Аβ42 индуцирует выход Р-селектина на поверхность нейроваскулярных эндотелиоцитов, а убаин регулирует его содержание на клеточной мембране, снижая уровень рецептора практически до нормы. Из данных литературы известно, что убаин может регулировать ряд физиологических процессов на клеточной поверхности: работу Na,K-АТФазы, проницаемость мембран и эндоцитоз веществ [5, 6, 10]. По-видимому, снижение содержания Р-селектина на поверхности нейроваскулярных эндотелиоцитов как в норме, так и при воздействии Аβ42, связано с вышеприведенными свойствами данного гликозида. Дальнейшее исследование процессов клатрин-зависимого эндоцитоза с помощью убаина, вероятно, позволит рекомендовать данный сердечный гликозид не только в кардиологии, но и для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Литература

- 1 Цой А.К., Шалахметова Т.М., Аскарлова Ш.Н., Умбаев Б.А. Концентрация Р-селектина на поверхности эндотелиоцитов линии bend3 и динамика его эндоцитоза // Вестник КазНУ. Серия Экологическая. - 2012. - №2(34). - С. 48-52.
- 2 Bradbury M.W. The blood-brain barrier. Transport across the cerebral endothelium // Circ Res. -1985. - V. 57. - P. 213-222.
- 3 Frijns C.J., Kappelle L.J. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease // Stroke. - 2002. - V. 33. – P. 2115-2122.
- 4 Coisne C., Favéu C., Delplace Y., Dehouck L., Miller F., Cecchelli R., Dehouck B. Differential expression of selectins by mouse brain capillary endothelial cells in vitro in response to distinct inflam-

matory stimuli // *Neurosci Letters*. - 2006. V. 392 - P. 216-220.

5 Jiang L., Man L., Lijun L., Deepak M., Zhi-an X., Shapiro J. I. Ouabain-induced endocytosis of the plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells requires caveolin-1 // *Kidney International*. - 2005. - 67(5). - P. 1844-1854.

6 Corley C., David M. S. and Murphy R. F. Regulation of endocytic pH by the Na⁺,K⁺-ATPase in living cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1989. - V. 86. - P. 544-548.

7 Neshor M., Shpolansky U., Viola N., Dvella M., Buzaglo N., Cohen Ben-Ami H. Ouabain attenuates cardiotoxicity induced by other cardiac steroids // *British Journal of Pharmacology*. - 2010. - V. 10. - P. 1476-1481.

8 Joubin K., Richardson A., Novoa N., Tu E.,

and J. Tomishima M. The endothelial cell line bend.3 maintains human pluripotent stem cells // *Stem. Cells Dev.* - 2012. - V.122. - P.1211-1224.

9 Fa M., Orozco I.J., Francis Y.I., 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. - V.14(41). - P.1884.

10 Nunez-Duran H., Riboni L., Ubaldo E., Kabela E., Barcenas-Ruiz L. Ouabain uptake by endocytosis in isolated guinea pig atria // *Am. J. Physiol.* - 1988. - V. 255. - P. 479-485.

11 Small A., McElroy H.W., Ide R.S. Studies of the electrocardiogram and the toxicity of cardiac glycosides in animals exposed to hyperbaric helium // *Toxicol Appl. Pharmacol.* - 1971. - V.20. - P. 44-56.

А.К. Цой, Т.М. Шалахметова, Ш.Н. Аскарова, Б.А. Умбаев
**Нейроваскулярлы эндотелиоциттердің бетіндегі
 P-селектиннің мөлшеріне β-амилоид және уабаиннің әсері**

Бұл зерттеулерде β-амилоидпен әсерленген нейроваскулярлы эндотелиоциттердің беткі бетіндегі P-селектиннің құрамына уабаиннің әсерін зерттеу жүргізілді. Уабаин P-селектиннің эндоцитоз процестерін белсендіретіні және эндотелиоциттердің беткі бетіндегі оның құрамын реттейтіні анықталынды.

Түйін сөздер: уабаин, P-селектин, егеуқұйрығының бас миындағы нейроваскулярлы эндотелиоциттер.

А.К. Tsoy, T.M. Shalahmetova, Sh.Y. Askarova, B.A. Umbayev
**Influence of ouabaine on the contents of P-selectin on the surface of the neurovascular
 endotheliocytes when exposed to β-Amyloid**

Influence of ouabain to the P-selectin expression on the surface of neurovascular endotheliocytes under exposure of amyloid- β was investigated in this research. It was shown that ouabain activate endocytosis and regulate amount of P-selectin on the cell surface.

Ключевые слова: ouabaine, P-selectin, neurovascular endotheliocytes of rat brain.