

## ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИМИ БЕЛКАМИ ( $\beta$ -АМИЛОИДАМИ А $\beta$ 1-40, А $\beta$ 1-42, ТАУ-БЕЛКОМ) МОДИФИКАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН АСТРОЦИТОВ *IN VITRO*

*Асташинок А.Н.<sup>1</sup>, Полещук Н.Н.<sup>1</sup>, Квачева З.Б.<sup>2</sup>, Гузов С.А.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии,

<sup>2</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии  
Национальной академии наук»,

<sup>3</sup>Белорусский государственный медицинский университет  
Минск, Беларусь

*В данной статье в разработанной модели *in vitro* рассмотрены особенности влияния на цитоплазматическую мембрану астроцитов патологических белков – амилоидов А $\beta$ 1-40, А $\beta$ 1-42, тау-белка, выделенных из ткани мозга пациентов, умерших от болезни Альцгеймера. В ходе исследования выявлены различия в количестве рецепторных кластеров и разнородности их распределения (параметры  $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_z$ ), а также в модуле Юнга цитоплазматической мембраны, трансформированных астроцитов. Полученная модель позволяет проводить оценку структурно-модификационных преобразований клеток макроглии ЦНС при действии различных наноразмерных патологических белковых структур.*

**Ключевые слова:** астроциты, амилоиды, тау-белок, атомно-силовая микроскопия, модуль жесткости.

## MODIFICATIONS OF ASTROCYTIC PLASMA MEMBRANES INDUCED BY PATHOLOGICAL PROTEINS ( $\beta$ -AMYLOIDS А $\beta$ 1-40, А $\beta$ 1-42, TAU-PROTEIN) MODEL IN VITRO

*Astashonok A.N., Poleshchuk N.N., Kvacheva Z.B., Guzov S.A.*

<sup>1</sup>Republican Research & Practical Centre for  
Epidemiology & Microbiology,

<sup>2</sup>Institute of Biophysics and Cell Engineering  
of National Academy of Sciences,

<sup>3</sup>Belorussian State Medical University,  
Minsk, Belarus

*The article describes the peculiarities of the effect on the cytoplasmic membrane of astrocytes in model *in vitro* of the pathological proteins - А $\beta$ 1-40, А $\beta$ 1-42 amyloids, tau protein, isolated from the brain tissue of patients who had died of Alzheimer's disease. The study revealed differences in the number of receptor clusters and the heterogeneity of their distribution (parameters  $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_z$ ), as well as in the*

*Young's modulus of the cytoplasmic membrane, transformed astrocytes. The resulting model allows for the evaluation of structural-modification transformations of macroglial cells of the CNS under the action of various nanoscale pathological protein structures.*

**Keywords:** *astrocytes, amyloids, tau protein, atomic force microscopy, Young's modulus.*

**Введение.** Астроциты – один из наиболее значимых компонентов центральной нервной системы, которые участвуют в нейромедиаторных процессах, синаптогенезе, развитии нейрональных сетей, привлечении клеток за счет высвобождения хемокинов, поддержании общего метаболизма мозговой ткани и антиоксидантной защиты гематоэнцефалического барьера. При болезни Альцгеймера (БА) и ряде других заболеваний ЦНС астроциты вовлекаются в патологический процесс, претерпевая ряд структурно-модификационных преобразований (появление амебоидной и реактивной астроглии, усиление экспрессии глиального кислого фибриллярного белка, аккумуляция промежуточных филаментов в виде своеобразных тяжей и др.) [1]. Ключевым звеном в патогенезе БА является каскад нейродегенеративного процесса, при котором происходит отложение  $\beta$ -амилоидов А $\beta$ 1-40, А $\beta$ 1-42 в виде бляшек в паренхиме мозга и избыточная гиперпродукция белка тау, что приводит к необратимым деструктивным изменениям в ЦНС [2]. Однако функциональная роль астроцитов при патологических процессах исследована не в полной мере. Вызывают ли  $\beta$ -амилоиды, тау-белок структурно-модификационные преобразования в цитоплазматической мембране астроцитов и других клеток ЦНС также остается неизвестным.

**Цель работы.** Используя светооптический анализ в сочетании с атомно-силовой микроскопией оценить реакцию астроцитов в ответ на введение *in vitro* различных патологических белков ( $\beta$ -амилоидов А $\beta$ 1-40, А $\beta$ 1-42, тау-белка).

**Материалы и методы.** *Аутопсийный материал.* Анализу подвергнуты образцы ткани мозга людей (n=4, возраст – 69-82 года), умерших с клинически подтвержденным диагнозом деменция альцгеймеровского типа. Выделение патологических белков ( $\beta$ -амилоидов) проводили по протоколу [3]. Концентрацию выделенных из образцов мозга  $\beta$ -амилоидов определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for amyloid beta peptide 1-42 (Cloud-clone Corp., США) и Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for amyloid beta peptide 1-40 (Cloud-clone Corp., США). Чистоту выделенной фракции патологических белков контролировали на сконструированных «биочипах» согласно разработанному ранее подходу [4].

**Культура клеток.** Использовали перевиваемые культуры клеток: глиомы крысы (С6) и глиобластомы мыши (EPNT-5), полученные из коллекции культур Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Способ культивирования –

монослойный. Условия культивирования – использование культуральных флаконов со специальными стеклышками и питательной средой следующего состава: среда DMEM или DMEM/F12, 5% эмбриональная телячья сыворотка, антибиотик гентамицин (100 мкг/мл). Для культивирования клеток линии при пересеве клеток использовали 0,025 % трипсин.

Внесение в опытные культуры С6, EPNT-5 Аβ-амилоидов осуществляли в логарифмической фазе роста клеток, добавляя во флаконы 40 мкл фракции, содержащей белки в концентрациях 330-12,35 пг/мл (шаг разведения  $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ). Для сравнения исследования использовали стандартный рекомбинантный таубелок (Sigma, США), который предварительно разделяли на серию аликвот в концентрациях от 31,25 до 250 пг/мл, шаг разведения  $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ). Флаконы с культурами инкубировали при 37°C в течение 12-24 ч., ежедневно наблюдая и отмечая целостность, плотность клеточного монослоя и морфологию клеток.

*Атомно-силовая микроскопия.* Анализ проводили на микроскопе Nanoscope IIIa MultiMode (Bruker, США), оборудованном J-сканером. Использовали полуконтактные зонды из кремния с резонансной частотой ~190-315 кГц. Для морфометрического анализа оценивали параметры шероховатости поверхности ( $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_z$ ) цитоплазматической мембраны и модуль ее жесткости и упругости (модуль Юнга).

**Результаты и обсуждение.** Культуры клеток С6, EPNT-5, находящиеся в логарифмической фазе роста, были представлены преимущественно длинноручистыми звездчатыми клетками униполярной, треугольной или ромбовидной формы, соответствующие астроцитарному фенотипу (~85-90%). Анализу подвергались астроциты, имеющие звездчатую форму с хорошо развитыми длинноручистыми отростками.

*Наблюдение за морфологическими изменениями клеток после внесения Аβ-амилоидов.* Через 12 ч. после внесения в культуру глиомы С6 мозговой фракции, содержащей Аβ-амилоиды (в независимости от шага разведения) в зоне роста культур наблюдалось разрежение структуры монослоя, кроме «звездчатых» астроцитов появлялись дистрофически измененные клетки с редукцией отростков, округленными цитоплазматическими телами и гипохромными ядрами.

Отличительными ультраструктурными особенностями этого процесса являлось появление на ранних стадиях (первые 12 ч) в цитоплазме астроцитов длинных активно-ветвящихся «филаментоподобных» или розетка-подобных структур. Параллельно происходило сморщивание органелл (главным образом митохондрий и цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулама) и дезинтеграция цитоплазмы. Хроматин конденсировался у ядерной мембраны, однако его компактные массы были менее однородны и значительно менее четко очерчены по краям ядра. После образования этих масс происходило разрушение клеточных и внутриклеточных мембран, в том числе и мембран

лизосом, что приводило к высвобождению лизосомальных ферментов, протеолизу и разрушению клетки.

С целью получения более полной информации о структуре цитоскелета использовали силовую спектроскопию и измерение локальных значений модуля Юнга как в интактных, так и опытных культурах. Силовые кривые снимали в точках, расположенных вдоль цитоскелета (10-20 точек). Установлено, что в культуре С6 для интактных астроцитов диапазон значений модуля Юнга имел меньший разброс значений (5,4–6,7 кПа). Эти показатели характерны для большинства активно-пролиферирующих эукариотических клеток. В отношении интактной культуры EPNT-5 значения модуля Юнга не имели резких колебаний (2,2-3,4 кПа).

В тоже время модуль Юнга, подвергшихся трансформации Аβ-амилоидами имел значительный разброс значений (1,9–8,6 кПа). Более высокие значения модуля Юнга отмечались для астроцитов, у которых после внесения Аβ-амилоидами значительно снизилась доля цитоскелета по сравнению с ядерным индексом

При действии тау-белка, информацию об упруго-механических свойствах (значениях модуля Юнга) астроцитов (линия С6) и фибробластоподобных клеток (линия EPNT-5) не удалось получить, в связи с практически полной их цитодеструкцией. Тау-белок вне зависимости от дозы разведения вызывал стойкий лизис элементов цитоскелета клеток. Лишь в популяции культуры EPNT-5 выявлялись единичные «гигантские» (50-95 мкм) многоядерные веретенovidные клетки, характеризующиеся аномально-низким модулем жесткости и упругости цитоплазматической мембраны, не превышающем величины 1,1-1,5 кПа. Вероятно, выживание подобных типов клеток связано с инвазивностью фенотипа и метастатическим потенциалом данной популяции опухолевых клеток, а также редукцией в их цитоскелете актиновых стресс-фибрилл, в норме повышающих локальный модуль жесткости и упругости.

**Заключение.** Установлено, что выделенные из ткани мозга олигомерные формы Аβ-амилоидов при внесении в культуру С6, EPNT-5 нарушают целостность клеточного монослоя, изменяют морфологию «звездчатых» астроцитов, вследствие блокирования энергетического обеспечения и биосинтетической активности клеток. По параметрам жесткости и упругости выявлены количественные показатели, свидетельствующие о возрастании модуля Юнга цитоплазматической мембраны трансформированных астроцитов, что указывает на прямое влияние наноразмерных патологических белковых компонентов (Аβ-амилоидов Аβ1-40, Аβ1-42) на структуру поверхностных рецепторных кластеров и характер их распределения.

#### Список литературы

1. Verkhatsky, A Astrocytes in Alzheimer's disease / A. Verkhatsky [et al.] // J. Neurotherapeutics. – 2010. – Vol. 7. – P. 399-412.

2. Brena, B  $\beta$ -amyloid peptides are cytotoxic to astrocytes in culture: A role for oxidative stress / B. Brena [et al.] // J. Neurobiology. – 2000. – Vol. 7. – P. 395-405.

3. Rostagno, A. Isolation and biochemical characterization of amyloid plaques and paired helical filaments / A. Rostagno, J. Ghiso // Curr. Protoc. Cell Biol. – 2009. – Vol. 1. – P. 1-31.

4. Асташонок, А Выявление белков-маркеров нейродегенерации у пациентов с когнитивными нарушениями и детекция протеазоустойчивого прионного белка (PrP<sup>27-30</sup>) при различных дементных состояниях / А. Асташонок [и др.] // Психиатрия, психотерапия и клиническая психология. – 2015. – № 2. – С.11-21.

РЕПОЗИТОРИЙ