

Экспрессия Pgp в клетках нейроваскулярной единицы при перинатальном гипоксически-ишемическом повреждении головного мозга

А.В. Моргун, Т.Е. Таранушенко, Н.А. Малиновская, О.С. Окунева, С.И. Устинова, Л.Н. Карпова, А.Б. Салмина, Е.А. Пожиленкова,
Д.И. Лалетин, О.В. Фролова, Н.В. Реушева, Л.В. Труфанова

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого

В статье приведены результаты исследований, выполненных на 35 крысах возрастом 10 сут. Оценены особенности экспрессии Р-гликопротеина (Pgp) в клетках головного мозга нейрональной, астроцитарной и эндотелиальной природы после перенесенного перинатального гипоксически-ишемического повреждения. Обнаружено значимое увеличение экспрессии Pgp в астроцитах в первые 4 часа ишемии, в нейронах и эндотелиоцитах – в первые 12 часов ишемии. Обсуждается роль увеличения экспрессии Pgp в патогенезе ишемического повреждения головного мозга.

Ключевые слова: Р-гликопротеин/Pgp, перинатальное повреждение головного мозга, нейроваскулярная единица.

Введение

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-4818.2012.7.

Белок лекарственной устойчивости Р-гликопротеин (Pgp) является трансмембранным АТФ-зависимым насосом, удаляющим химические вещества из цитоплазмы клеток [7]. В центральной нервной системе Pgp в основном экспрессируется на эндотелиоцитах, входящих в состав гематоэнцефалического барьера, и локализуется на поверхности цитоплазматической мембраны, эндоплазматического ретикулума и мембранах комплекса Гольджи [4]. Показано, что при сокультивировании астроцитов и эндотелиоцитов *in vitro* локальный окислительный стресс, вызванный астроцитами, приводит к усилению экспрессии Pgp на эндотелиоцитах [5]. В некоторых работах указывается на локализацию Pgp на астроцитах и нейронах. Другие авторы не подтверждают локализацию Pgp на нейронах головного мозга [8, 11]. Это стимулирует исследования возможной роли Pgp в реализации функциональной активности клеток нейроваскулярной единицы, в т.ч. в контексте регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера в норме и при патологии.

Pgp относится к суперсемейству АВС-транспортёров (АТР-binding cassette). К АВС-семейству относят более сотни транспортных белков, обнаруженных у разных организмов – от бактерий до человека [10]. Белки этого суперсемейства транспортируют самые разнообразные субстраты – от неорганических ионов до полисахаридов и белков. Отмечается снижение в клетках с повышенной функцией Pgp накопления любого вещества, являющегося субстра-

том для Pgp. Такие вещества быстрее высвобождаются из Pgp-положительных клеток, в то же время ингибиторы функции Pgp тормозят процесс экстррузии препаратов. В литературе описано, что при гиперэкспрессии белка лекарственной устойчивости возникает полирезистентность к различным лекарственным препаратам при бронхиальной астме и при онкопатологиях (рабдомиосаркомы, остеосаркомы) [1–3].

Уровень экспрессии Pgp на эндотелиоцитах играет роль в биодоступности многих метаболитов и веществ для головного мозга. Было высказано предположение, что Pgp играет роль в элиминации Аβ белков при болезни Альцгеймера [6]. Однако роль Pgp в центральной нервной системе (ЦНС) при гипоксии-ишемии изучена не до конца. Известно, что, с одной стороны, Pgp предотвращает негативное влияние цитокинов на ЦНС, а с другой – препятствует проникновению лекарственных веществ в ЦНС и снижает эффективность терапевтических мероприятий [9].

Цель исследования: изучить особенности экспрессии Pgp в клетках головного мозга при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении.

Материалы и методы

Объект исследования – белые беспородные крысы в возрасте 10 сут (P10) в количестве 35. Все животные были разделены на группы по семь особей: контрольная группа (ложнооперированные животные), четыре экспериментальных группы – через 4, 12, 24, 72 часа после моделирования гипоксии-ишемии (группы 1, 2, 3 и 4 соответственно). Моделирование перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга проводилось по

методу J. Rice (1989) путем постоянной окклюзии правой общей сонной артерии (ОСА) с последующим помещением крысят в атмосферу с низким содержанием кислорода (8%). Животных декапитировали после охлаждения на льду и производили забор лобных областей головного мозга справа. Условия содержания и обращения с экспериментальными животными соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. В работе соблюдались этические принципы, предьявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 2000).

Суспензию клеток получали путем ферментативной обработки (10 мг/мл трипсина, 1 мг/мл коллагеназы), затем готовили препараты по типу «толстой капли», высушивали при комнатной температуре и в последующем хранили при температуре -20°C до использования. Детекция экспрессии Pgp на клетках нейроваскулярной единицы проводилась на суспензии клеток путем одновременного или последовательного комбинированного окрашивания препарата антителами к следующим белкам: Pgp (белок лекарственной устойчивости, PE-метка), нейронспецифическая енолаза – NSE – маркер нейронов; глиальный фибриллярный кислый белок – GFAP – маркер астроцитов; CD31 – маркер эндотелиоцитов сосудов (FITC-метка) согласно стандартному протоколу двойного непрямого метода иммуноцитохимии. С помощью люминесцентной микроскопии при увеличении $\times 900$ в суспензии подсчитывали количество клеток, соэкспрессирующих Pgp, и маркер вида клеток (NSE, GFAP или CD 31) в % на 100 клеток при анализе не менее 10 полей зрения.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной ($M \pm \sigma$) и непараметрической статистики (критерий Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, Уилкоксона) при уровне значимости $p < 0,05$ (*).

Результаты

Фотографии клеток представлены на рис. 1, данные о количестве клеток нейроваскулярной единицы, экспрессирующих на своей поверхности белок лекарственной устойчивости – в табл. 1.

таблица 1: Количество Pgp-позитивных клеток (в % от общего количества клеток).

Группы животных	Нейроны (NSE*)	Астроциты (GFAP*)	Эндотелиоциты (CD31*)
Контрольная группа (n=7)	0	1,7 \pm 1,1	3,3 \pm 0,8
Экспериментальная группа 1 (гипоксия-ишемия 4 ч, n=7)	11,3 \pm 3,4*	16,3 \pm 4,9*	8,7 \pm 2,7*
Экспериментальная группа 2 (гипоксия-ишемия 12 ч, n=7)	19,8 \pm 5,2*	17,3 \pm 5,3*	18 \pm 1,1*
Экспериментальная группа 3 (гипоксия-ишемия 24 ч, n=7)	22 \pm 2,1*	27,1 \pm 5,6*	19 \pm 2,4*
Экспериментальная группа 4 (гипоксия-ишемия 72 ч, n=7)	18 \pm 5,5*	13,7 \pm 3,1*	20,8 \pm 1,7*

Примечание: * – уровень значимости $p < 0,05$.

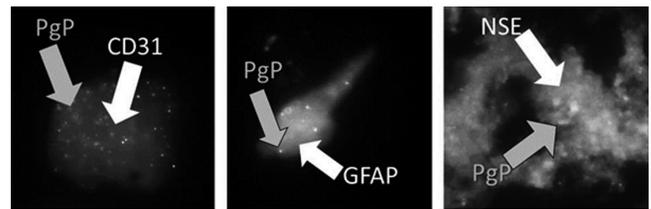


рис. 1: Иммуноцитохимическая детекция клеток, соэкспрессирующих Pgp и маркер вида клеток (люминесцентная микроскопия, $\times 900$):

слева – соэкспрессия Pgp и CD31 (маркера эндотелиоцитов), в центре – Pgp и GFAP (маркера астроцитов), справа – Pgp и NSE (маркера нейронов).

При изучении соэкспрессии NSE и Pgp на нейронах в образцах гомогената ткани головного мозга контрольной группы не было обнаружено клеток, экспрессирующих Pgp. Однако при перинатальной гипоксии-ишемии головного мозга отмечался статистически значимый ($p < 0,05$) рост количества нейронов, экспрессирующих Pgp, в сравнении с контролем: уже через 4 часа с момента моделирования гипоксии-ишемии – 11%, через 12 часов – почти 20%, далее отмечалась «стабилизация» этих значений в пределах 20%.

В контрольной группе мы обнаружили незначительное количество астроцитов и эндотелиоцитов, экспрессирующих на своей поверхности белок лекарственной устойчивости – около 2% астроцитов и 3% эндотелиоцитов. Подобно увеличению экспрессии Pgp, после перенесенной перинатальной гипоксии-ишемии количество Pgp-иммунопозитивных астроцитов и клеток эндотелия существенно возросло. Отмечался статистически значимый ($p < 0,05$) рост количества астроцитов и эндотелиоцитов, экспрессирующих Pgp, во всех группах при развитии перинатальной гипоксии-ишемии, в сравнении с соответствующими показателями контрольной группы: через 4 часа количество экспрессирующих Pgp-астроцитов увеличилось до 16%, эндотелиоцитов – до 9%, через 12 часов – около 17% астроцитов и 18% эндотелиоцитов, через 24 ч – 27% Pgp+ астроцитов и 20% эндотелиоцитов, через 72 ч – около 14% Pgp-экспрессирующих астроцитов и 21% эндотелиоцитов.

Обсуждение

Интересен тот факт, что процент Pgp+ эндотелиоцитов при развитии гипоксии-ишемии головного мозга достигает максимальных значений в пределах 18–20% уже к 12 часам, оставаясь стабильно высоким и через 24–72 ч с момента развития ишемии. Процент Pgp-экспрессирующих астроцитов достигает максимальных значений значительно позже (через 24 ч) с момента развития перинатальной гипоксии-ишемии, через 72 ч отмечалось снижение количества Pgp+ астроцитов до значений, близких к соответствующим показателям групп 1–2.

Можно предположить, что увеличение экспрессии Pgp играет защитную роль и отмечается спустя некоторое время с момента развития перинатальной гипоксии-ишемии головного мозга. На ее фоне развивается повышенная устойчивость к ксенобиотикам и продуктам метаболизма, что является защитной реакцией клеток головного мозга (в особенности нейронов) в условиях кислородного голодания.

Таким образом, первыми клетками, реагирующими на гипоксически-ишемическое повреждение, являются астроциты: Pgp+ астроциты появляются в большом количестве уже через 4 часа с момента развития гипоксии-ишемии, они же являются клетками, сильнее всего реагирующими на гипоксию-ишемию (отмечается максимальное количество Pgp+ астроцитов – около 30%, в отличие от максимального количества нейронов и эндотелиоцитов – по 20%). Затем реагируют эндотелиоциты и нейроны (экспрессия Pgp достигает субмаксимальных значений через 12 часов), причем эндотелиоциты являются клетками с самым длительным повышением экспрессии

белка лекарственной устойчивости (максимальное количество Pgp+ эндотелиоцитов отмечается через 72 часа).

Полученные нами результаты представляют особенный интерес с точки зрения астроглиального контроля экспрессии Pgp на эндотелиоцитах. Эти результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о том, что астроциты могут играть роль в усилении экспрессии Pgp на эндотелиоцитах [5], однако в этом процессе могут участвовать не только активные формы кислорода, вырабатываемые астроцитами, но и белок-транспортер Pgp, экспрессируемый на их поверхности.

Список литературы

1. Андрианов А.В., Моргун А.В., Таранушенко Т.Е., Салмина А.Б. Значение маркеров прогрессии при остеосаркомах у детей. Сибирск. онкологич. журн. 2008; 5: 37–40.
2. Демко И.В., Салмина А.Б., Моргун А.В., Малиновская Н.А. Экспрессия Р-гликопротеина на лимфоцитах периферической крови при тяжелых формах бронхиальной астмы и его роль в определении чувствительности к терапии глюкокортикостероидами. Пульмонолог. 2007; 3: 41–46.
3. Моргун А.В., Таранушенко Т.Е., Салмина А.Б. Значение уровня экспрессии Р-гликопротеина при остеосаркомах у детей. Врач-аспирант 2006; 15: 519–524.
4. Chan H.S., Grogan T.M., Haddad G. et al. P-glycoprotein expression: Critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy. J. Natl. Cancer Inst. 1997; 89: 1706–1715.
5. Gaillard P.J., Van Der Sandt I.C., Voorwinden L.H. et al. Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier. Pharm. Res. 2000; 17 (10): 1198–1205.
6. Kuhnke D., Jedlitschky G., Grube M. et al. MDR1-P-glycoprotein (ABCB1) mediates transport of Alzheimer's amyloid-O1 peptides - Implications for the mechanisms of A β clearance at the blood-brain barrier. Brain Pathol. 2007; 17 (4): 347–353.
7. Putman M., van Veen H.W., Konings W.N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000; 64: 672–693.
8. Ronaldson P.T., Bendayan M., Gingras D. et al. Cellular localization and functional expression of P-glycoprotein in rat astrocyte cultures. J. Neurochem. 2004; 3: 788–800.
9. Salmina A.B., Inzhutova A.I., Malinovskaya N.A., Petrova M.M. Endothelial dysfunctions and repair in Alzheimer-type neurodegeneration: neuronal and glial control. J. Alzheimers Dis. 2010; 22 (1): 17–36.
10. Sarkadi B., Homolya L., Szakacs G., Varadi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: Participation in a chemoinnity defense system. Physiol. Rev. 2006; 86: 1179–1236.
11. Volka H.A., Burkhardt K., Potschka H. et al. Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures. Neurosci. 2004; 123 (3): 751–759.

Expression of Pgp in cells of neurovascular unit in perinatal hypoxic-ischemic brain injury

A.V. Morgun, T.E. Taranushenko, N.A. Malinovskaya, O.S. Okuneva, S.I. Ustinova, L.N. Karpova, A.B. Salmina, E.A. Pozhilenkova, D.I. Laletin, O.V. Frolova, N.V. Reusheva, L.V. Trufanova

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

Keywords: P-glycoprotein/Pgp, perinatal brain injury, neurovascular unit.

We have studied peculiarities of P-glycoprotein (Pgp) expression on neuronal, astroglial and endothelial cells in newborn rats (P10) underwent perinatal hypoxic-ischemic brain damage. Expression of Pgp was markedly elevated in all the cells tested reaching the

highest levels in astrocytes (4 hrs after injury) followed by increased levels in neuronal and endothelial cells (12 hrs after injury). The possible role of Pgp in pathogenesis of perinatal brain injury is discussed.

Контактный адрес: Малиновская Наталия Александровна – канд. мед. наук, науч. сотр. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, доц. каф. биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. 660022, Красноярск, ул. П. Железняка, д. 1.
Тел.: +7 (391) 228-07-69, факс: +7 (391) 228-08-60; reg.kgmu@gmail.com;

Моргун А.В. – асс. каф. педиатрии Института последипломного образования;

Таранушенко Т.Е. – зав. каф. педиатрии Института последипломного образования;

Окунева О.С. – науч. сотр. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, старш. препод. каф. биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии;

Устинова С.И. – доц. каф. педиатрии Института последипломного образования;

Карпова Л.Н. – асс. каф. педиатрии Института последипломного образования;

Салмина А.Б. – проректор по инновационному развитию и международной деятельности, зав. каф. биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии;

Пожиленкова Е.А. – исп. директор НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, доц. каф. биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии;

Лалетин Д.И. – врач-хирург операционного отделения Красноярской краевой клинической больницы;

Фролова О.В. – науч. сотр. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии;

Труфанова Л.В. – декан фармацевтического факультета, доц. каф. биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии.