

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов

СЕКРЕЦИЯ ЭКЗОСОМ И АУТОФАГИЯ ПРИ ВЫРАБОТКЕ УСТОЙЧИВОСТИ НЕЙРОНОВ К ЭКЗАЙТОТОКСИЧЕСКОМУ ПОВРЕЖДЕНИЮ

А.А. Яковлев^{1,2}, А.А. Лыжин³, О.П. Александрова³, Л.Г. Хаспеков³, Н.В. Гуляева^{1,2}*

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485, Москва, ул. Бутлерова, 5А; *эл. почта: al_yakovlev@rambler.ru

²Научно-практический психоневрологический центр имени З.П. Соловьева, 115419, Москва, ул. Донская, 43

³Отдел исследований мозга научного центра неврологии, 105064, Москва, пер. Обуха, 5

В модели выработки устойчивости нейронов к токсическому действию глутамата (предварительная депривация трофических факторов) продемонстрирована секреция экзосом. Секреция экзосом происходит на этапе выработки устойчивости при прекондиционировании и при последующей стадии закрепления выработанной устойчивости в течение суток после прекондиционирования, это было показано с использованием иммунохимического окрашивания внеклеточной жидкости на маркер экзосом белок CD63. Ингибитор аутофагии бафиломицин в концентрации 0,01 мкМ достоверно снижает выраженность секреции экзосом как на этапе выработки аутофагии, так и в течение первых суток после выработки. При этом ингибирование аутофагии во время депривации трофических факторов предотвращает выработку устойчивости, а ингибирование аутофагии в течение первых суток после депривации не влияет на выработку устойчивости. Мы предполагаем, что долговременные эффекты прекондиционирования могут быть опосредованы секрецией экзосом.

Ключевые слова: прекондиционирование; нейроны; депривация; экзосомы; аутофагия

DOI: 10.18097/PBMC20196505361

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость (толерантность) головного мозга к повреждению может быть временно увеличена за счёт так называемого прекондиционирования. Прекондиционированием называется применение такого стимула, который приводит к повреждениям в большой дозе, но в малой дозе активирует внутренние защитные резервы организма [1]. Одним из таких вариантов прекондиционирования является так называемое дистантное прекондиционирование. При дистантном прекондиционировании устойчивость какого-то органа к повреждению вырабатывается в результате серии коротких повторяющихся эпизодов неповреждающего воздействия на какой-то иной, дистантно удалённый орган [1]. Действенность этого подхода на людях была впервые показана в 2002 году [2]. Его значимость сразу бросается в глаза, и в настоящее время несколько групп учёных уже проводят предварительные испытания этого метода в клинике [3, 4]. В экспериментах на животных продемонстрирована применимость дистантного прекондиционирования для защиты мозга [5, 6].

Что за механизм лежит в основе выработки дистантной устойчивости, пока не ясно. Рассматриваются фактически все возможные варианты распространения сигнала с использованием нервной, гуморальной и иммунной систем [1]. Вероятно, все эти системы принимают участие в выработке дистантной устойчивости, хотя и непонятно, какая именно система играет ведущую роль. Совершенно точно установлено, что при прекондиционировании некоторые, пока не идентифицированные, растворимые

факторы выделяются в кровь и увеличивают устойчивость организма [7, 8]. Многие группы исследователей пытались установить природу этих факторов в экспериментах на животных, но полученные результаты не всегда подтверждаются в разных лабораториях (практически нет работ, подтвердивших участие одного и того же фактора в разных экспериментах) [9]. Судя по этим сложностям, начинать выявление защитных факторов нужно в самых простых клеточных моделях и только потом переходить к изучению действия этих факторов на животных, а затем и на человеке.

Мы предположили, что фактором, опосредующим выработку дистантной устойчивости, являются экзосомы. Экзосомы представляют собой везикулы небольшого размера (50-150 нм), которые секретируются практически всеми клетками организма [10]. Исследования последних лет ясно показывают, что экзосомы представляют собой систему направленного транспорта между разными клетками организма. При этом экзосома гораздо стабильнее во внеклеточном пространстве, чем низкомолекулярные лиганды, и можно предположить, что экзосомальный сигналинг вызывает более выраженный и более продолжительный ответ клеток по сравнению с растворимыми лигандами, что и продемонстрировано в некоторых случаях [11].

Характерным маркером мембраны экзосом является белок CD63. Этот белок принадлежит к семейству тетраспанинов – маркерных белков экзосом – и участвует, в том числе, в процессе созревания экзосом [10]. Для проверки гипотезы о вовлечении экзосом в выработку устойчивости при прекондиционировании нейронов мы с помощью

биохимических методов проверили наличие характерного маркера экзосом, белка CD63, в культуральной среде и в солевом растворе, в которых инкубировали нейроны. Кроме того, мы проверили количество внеклеточных экзосом в среде инкубации нейронов при ингибировании аутофагии. Оказалось, что при preconditionировании экзосомы секретируются во внеклеточную среду, а ингибирование аутофагии приводит к снижению количества секретируемых экзосом.

МЕТОДИКА

Получение первичных нейрональных культур мозжечка

У трёх постнатальных 8-дневных крысят, подвергнутых эктаназии с помощью эфира, методом микродиссекции извлекали мозжечок и помещали его в раствор PBS ("Gibco", США). После удаления мозговых оболочек и 2-х кратной промывки в PBS мозжечок скальпелем разрезали на мелкие фрагменты и помещали их на 15 мин в термостат в 0,25% раствор трипсина ("Sigma", США). После этого действие трипсина нейтрализовали 2-х кратной промывкой в среде для культивирования, которая состояла из 10% эмбриональной сыворотки коров ("HyClone", США), около 86% минимальной среды Игла ("Gibco"), 10 mM HEPES ("Sigma"), 2 mM глутамата ("Gibco"), 25 mM KCl ("Sigma") и содержала 30 mM глюкозу. Фрагменты ткани мозжечка помещали в центрифужную пробирку, диссоциировали механически в растворе PBS с добавлением среды для культивирования путём пятикратного пропускания фрагментов через суженное отверстие пастеровской пипетки. После спонтанного осаждения оставшихся фрагментов мозжечка надосадочную жидкость с содержащимися в ней диссоциированными клетками переносили в другую центрифужную пробирку. Указанную процедуру повторяли 2-3 раза до полной диссоциации ткани. Полученную суспензию диссоциированных клеток центрифугировали при 400 g в течение 3-х мин. Супернатант удаляли, осажённые клетки ресуспендировали в среде для культивирования. Количество клеток в суспензии составляло 4-5 млн. в 1 мл (подсчитано с помощью автоматического счётчика клеток Countess ("Invitrogen", США)). Суспензию дозатором разливали в 24-луночный планшет ("Costar", США), предварительно обработанный раствором (0,5 мг/мл) полиэтиленimina ("Sigma"). Планшеты помещали в CO₂ инкубатор фирмы "Nuair" (США) и культивировали клетки при 35,5°C во влажной атмосфере с содержанием углекислоты 5%. В каждом эксперименте анализировали не менее 4-х параллельных образцов сестринских культур.

Preconditionирование к неблагоприятным условиям (депривация ростовых факторов и глюкозы) и токсическое воздействие глутамата

Ранее нами была разработана методика preconditionирования клеток-зёрен мозжечка с помощью депривации трофических факторов [12].

На 6-7 день *in vitro* клетки помещали в солевой буферный раствор (BSS), содержащий 5 mM HEPES pH 7,4, 143,4 mM NaCl, 25 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1,2 mM NaH₂PO₄, и выдерживали в CO₂ инкубаторе в течение 3,5 ч при 35,5°C. После этого культуры возвращали в питательную среду и через сутки к клеткам добавляли глутамат в концентрации 500 мкМ в BSS на 30 мин. Через сутки после этого считали погибшие нейроны с помощью окрашивания на пропидиум иодид. Клетки фотографировали и считали число пропидиум-позитивных клеток, приходящихся на одно поле зрения, с помощью специальной компьютерной программы ImageJ. Ингибитор аутофагии бафиломицин (БФ) ("Sigma") в концентрации 0,01 мкМ добавляли на разных этапах выработки устойчивости: либо во время депривации трофических факторов в BSS, либо уже после депривации во время возврата клеток в питательную среду.

Определение количества внеклеточных экзосом

Определение количества экзосом проводили с помощью дот-блота на белок мембран экзосом CD63. Внеклеточную жидкость собирали или непосредственно в начале preconditionирования через 10 мин нахождения нейронов в солевой среде (контрольная группа), или после preconditionирования (BSS, 3,5 ч инкубации) и после возвращения нейронов в питательную среду (DMEM, 24 ч инкубации). Образцы BSS по 500 мкл и образцы питательной среды по 100 мкл наносили на мембрану PVDF в ячейки специального аппарата для дот-блота ("Bio-Rad", США). Под действием вакуума пробы проходили через специальные отверстия и связывались с мембраной. Мембрану со связавшимися белками из внеклеточной жидкости инкубировали 30 мин в 5% сухом молоке для блокирования мест неспецифического связывания антител. После блокирования мембрану инкубировали с мышиными моноклональными антителами к белку CD63 (кат. номер 10628D, "Thermo Fisher Scientific", США) в течение 2 ч при комнатной температуре. Несвязавшиеся первичные антитела интенсивно отмывали в течение получаса, после чего инкубировали мембрану с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена ("Bio-Rad"). После отмывки места связывания антител проявляли с помощью хемилюминесцентного субстрата (SuperSignal West Femto, "Thermo Fisher Scientific") на приборе MicroChem ("DNR", Израиль). Проявленные пятна связавшихся антител фотографировали и сравнивали интенсивность связывания в разных пробах с помощью программы GelQuant Express Analysis.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе STATISTICA ver. 10, StatSoft Inc. Различия между группами определяли с помощью непараметрического теста Крускала-Уоллеса, после чего проводили множественные сравнения рангов, данные представлены в виде M±SD.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Депривация трофических факторов за сутки до воздействия глутамата в нашей модели снижает гибель нейронов примерно на 30% (рис. 1, группы контроль и депривация). Величина защитного эффекта служит мерой выраженности прекондиционирования,

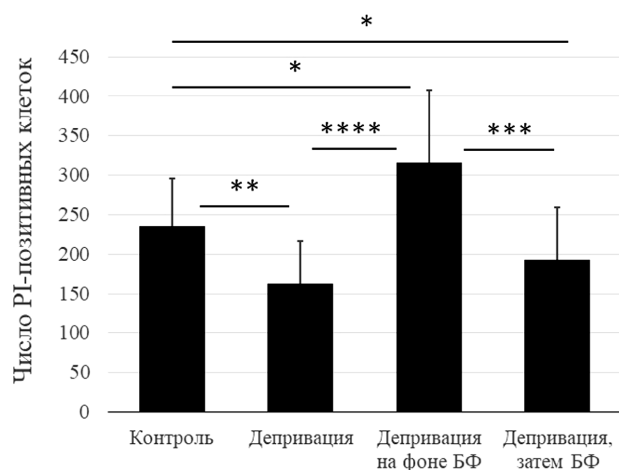
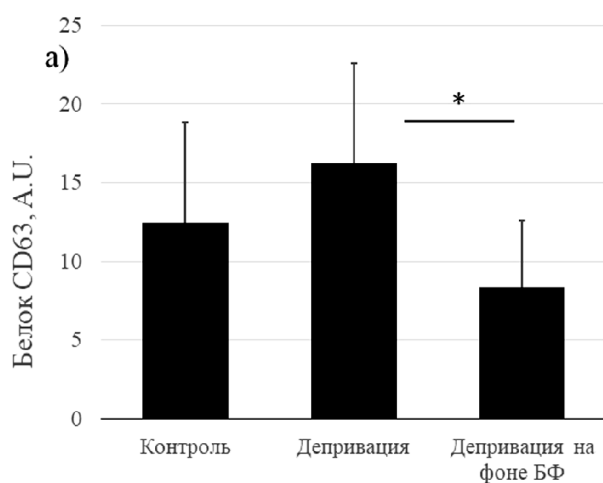


Рисунок 1. Число пропидиум иодид-позитивных клеток в поле зрения (отражает интенсивность гибели нейронов) после воздействия глутамата. Подробности эксперимента в разделе “МЕТОДИКА”. Обозначения групп: контроль – без прекондиционирования, депривация – после 3,5 ч прекондиционирования в BSS, депривация на фоне БФ – после 3,5 ч прекондиционирования в BSS в присутствии 0,01 мкМ БФ, депривация, затем БФ – после 3,5 ч прекондиционирования в BSS, 0,01 мкМ БФ добавлен в питательную среду после прекондиционирования. Достоверность отличий * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,0005$, **** – $p < 0,00005$.



и изменение этой выраженности под действием БФ является основным параметром, измеряемым в нашей работе. Если вносить БФ в концентрации 0,01 мкМ в BSS во время депривации трофических факторов, то устойчивость не только не развивается, но даже снижается по сравнению с контролем более чем на 30% (рис. 1, группа депривация на фоне БФ). При этом если депривация уже закончена, то БФ никак не влияет на устойчивость нейронов к дальнейшему повреждению (рис. 1, группа депривация, затем БФ). Полученные результаты хорошо согласуются с полученными нами ранее результатами [13]. В предыдущем эксперименте мы использовали другой ингибитор аутофагии – 3-метиладенин – но зависимость выработки устойчивости нейронов от аутофагии во время депривации трофических факторов подтвердилась и при использовании БФ.

При запуске депривации трофических факторов во внеклеточную среду начинают секретироваться экзосомы (рис. 2а). Уже через 10 мин после начала депривации во внеклеточной среде детектируются экзосомы (рис. 2а, группа контроль) и за 3,5 ч их количество увеличивается незначительно (рис. 2а, группа депривация). Количество секретируемых экзосом снижается, если в среде присутствует ингибитор аутофагии БФ (рис. 2а, группа депривация на фоне БФ). После депривации трофических факторов нейроны возвращали в питательную среду, в которой инкубировали ещё сутки. Через сутки во внеклеточной среде вновь обнаруживаются экзосомы (рис. 2б). Вне зависимости от депривации трофических факторов, экзосомы секретируются на некотором базальном уровне (рис. 2б, группы контроль и 24 ч после депривации). В присутствии БФ секречия существенно падает (рис. 2б, группа через 24 ч после депривации на фоне БФ).

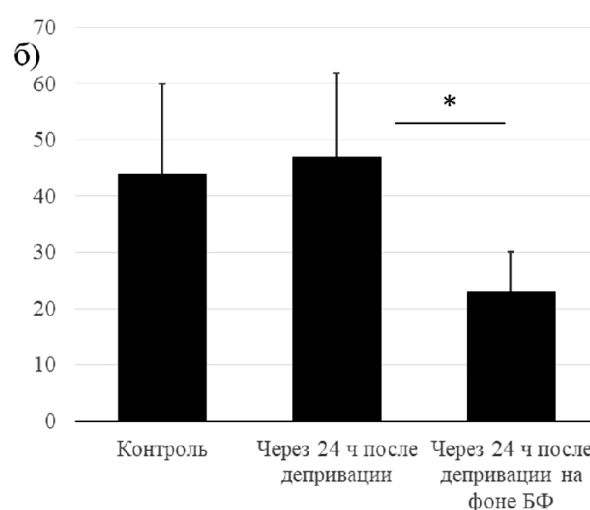


Рисунок 2. Количество белка CD63 в экстраклеточной жидкости (пропорционально количеству секретируемых экзосом). Подробности эксперимента в разделе методы. а) во время депривации трофических факторов. Обозначения групп: контроль – BSS через 10 мин после начала прекондиционирования, депривация – BSS через 3,5 ч после начала прекондиционирования, депривация на фоне БФ – BSS через 3,5 ч после начала прекондиционирования в присутствии 0,01 мкМ БФ. б) через сутки после окончания депривации и помещения нейронов в питательную среду. Обозначение групп: контроль – среда через 24 ч от клеток без прекондиционирования, через 24 ч после депривации – среда через 24 ч после возврата клеток в среду после депривации трофических факторов, через 24 ч после депривации на фоне БФ – среда через 24 ч после возврата клеток в среду в присутствии 0,01 мкМ БФ после депривации трофических факторов. Достоверность отличий * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,0005$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В работе подтверждён факт вовлечения аутофагии в выработку устойчивости нейронов к повреждению глутаматом. Ранее мы показали это с помощью ингибитора аутофагии 3-метиладенина [13], и подтвердили в данном исследовании с помощью функционально отличающегося от 3-метиладенина ингибитора аутофагии БФ. Также в работе впервые на модели нейронов в культуре показана секреция экзосом при депривации трофических факторов и подавление этой секреции ингибитором аутофагии. Ранее было показано, что в биогенезе экзосом в клетке и в их секреции могут принимать участие те же белки, которые принимают участие в созревании аутофагосом при аутофагии [14]. Возможно, ингибирование аутофагии одновременно приводит и к подавлению биогенеза, и к секреции экзосом. Пока в литературе не представлены какие-то более конкретные механизмы связи аутофагии и секреции экзосом, но можно предполагать, что в ближайшее время эта тема будет интенсивно исследована.

Таким образом, во время депривации трофических факторов в клетках запускается необходимая для выработки устойчивости аутофагия и зависящая от аутофагии секреция экзосом. Мы предполагаем, что экзосомы могут переносить во внеклеточной среде факторы, обеспечивающие долговременную устойчивость клеток. Некоторые данные литературы подтверждают наше предположение: в клеточных моделях астроциты секретируют экзосомы, защищающие нейроны от повреждения [15], и экзосомы от перенёсших ишемию животных защищают непрекondиционированных животных от ишемии [16]. Дальнейшая работа поможет понять механизмы выработки устойчивости нейронов и роль экзосом в этом процессе.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование проведено в соответствии с соблюдением общепринятых правил и норм гуманного обращения с экспериментальными животными.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по теме Государственного задания ИВНД и НФ РАН № 0129-2014-0002 “Мультидисциплинарное исследование молекулярно-генетических механизмов пластичности нервных клеток и нейродегенерации”

ЛИТЕРАТУРА

1. Hess D.C., Blauenfeldt R.A., Andersen G., Hougaard K.D., Hoda M.N., Ding Y.C., Ji X.M. (2015) *Nat. Rev. Neurol.*, **11**, 698-710.
2. Kharbanda R.K., Mortensen U.M., White P.A., Kristiansen S.B., Schmidt M.R., Hoschitzky J.A., Vogel M., Sorensen K., Redington A.N., MacAllister R. (2002) *Circulation*, **106**, 2881-2883.
3. Hoole S.P., Heck P.M., Sharples L., Khan S.N., Duehmke R., Densem C.G., Clarke S.C., Shapiro L.M., Schofield P.M., O'Sullivan M., Dutka D.P. (2009) *Circulation*, **119**, 820-827.
4. Zarbock A., Schmidt C., van Aken H., Wempe C., Martens S., Zahn P.K., Wolf B., Goebel U., Schwer C.I., Rosenberger P., Haeblerle H., Gorlich D., Kellum J.A., Meersch M., Renal R.I. (2015) *J. Am. Med. Assoc.*, **313**, 2133-2141.
5. Hahn C.D., Manliot C., Schmidt M.R., Nielsen T.T., Redington A.N. (2011) *Stroke*, **42**, 2960-2962.
6. Jensen H.A., Loukogeorgakis S., Yannopoulos F., Rimpilainen E., Petzold A., Tuominen H., Lepola P., MacAllister R.J., Deanfield J.E., Makela T., Alestalo K., Kiviluoma K., Anttila V., Tsang V., Juvonen T. (2011) *Circulation*, **123**, 714-721.
7. Shimizu M., Tropak M., Diaz R.J., Suto F., Surendra H., Kuzmin E., Li J., Gross G., Wilson G.J., Callahan J., Redington A.N. (2009) *Clin. Sci.*, **117**, 191-200.
8. Konstantinov I.E., Li J., Cheung M.M., Shimizu M., Stokoe J., Kharbanda R.K., Redington A.N. (2005) *Transplantation*, **79**, 1691-1695.
9. Zhou D., Ding J.Y., Ya J.Y., Pan L.Q., Wang Y., Ji X.M., Meng R. (2018) *Aging-Us*, **10**, 1825-1855.
10. van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. (2018) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 213-228.
11. Stenqvist A.C., Nagaeva O., Baranov V., Mincheva-Nilsson L. (2013) *J. Immunol.*, **191**, 5515-5523.
12. Яковлев А.А., Лыжин А.А., Александрова О.П., Хаспеков Л.Г., Гуляева Н.В. (2016) *Биомед. химия*, **62**, 656-663. [Yakovlev A.A., Lyzhin A.A., Aleksandrova O.P., Khaspekov L.G., Gulyaeva N.V. (2016) *Biomed. khimiya*, **62**, 656-663.]
13. Яковлев А.А., Лыжин А.А., Александрова О.П., Хаспеков Л.Г., Гуляева Н.В. (2018) *Асимметрия*, **12**, 552-557. [Yakovlev A.A., Lyzhin A.A., Aleksandrova O.P., Khaspekov L.G., Gulyaeva N.V. (2018) *Asymmetry*, **12**, 552-557.]
14. Xu J., Camfield R., Gorski S.M. (2018) *J. Cell Sci.*, **131**, 1-11.
15. Xu L.L., Cao H., Xie Y., Zhang Y., Du M.Y., Xu X.H., Ye R.D., Liu X.F. (2019) *Brain Res.*, **1717**, 66-73.
16. Li Y., Ren C.H., Li H.Y., Jiang F., Wang L., Xia C.Q., Ji X.M. (2019) *Neuroreport*, **30**, 834-841.

Поступила в редакцию: 03. 09. 2019.
После доработки: 10. 09. 2019.
Принята к печати: 11. 09. 2019.

EXOSOMES SECRETION AND AUTOPHAGY IN LONG-TERM PROTECTION OF NEURONS FROM EXCITOTOXIC DAMAGE

A.A. Yakovlev^{1,2}, A.A. Lyzhin³, O.P. Aleksandrova³, L.G. Khaspekov³, N.V. Gulyaeva^{1,2}*

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 5A Butlerova str., Moscow, 117485 Russia; *e-mail: al_yakovlev@rambler.ru

²Soloviev Moscow Research & Clinical Center for Neuropsychiatry, 43 Donskaya str., Moscow, 115419 Russia

³Brain Research Center at Research Center of Neurology, 5 Obukha lane, Moscow, 105064 Russia

In the model of induced neuronal resistance to the toxic effect of glutamate (deprivation of trophic factors), exosome secretion is demonstrated. Exosomes are secreted at the development of resistance during deprivation and at the first 24 h after preconditioning, as was shown by dot blot of extracellular fluid using anti-CD63 antibody. The autophagy inhibitor bafilomycin (0.01 μ M) significantly reduces the quantity of the secreted exosomes at the stage of autophagy induction and at 24 h after induction. At the same time, inhibition of autophagy during the deprivation of trophic factors prevents the development of resistance, but inhibition of autophagy during the first 24 h after deprivation does not affect the development of resistance. We suggest that the long-term effects of preconditioning may be mediated by exosome secretion.

Key words: preconditioning; neurons; deprivation; autophagy; exosomes

Funding. The work was carried out on the topics of government order: IHNA RAS order No. 0129-2014-0002 “Multidisciplinary study of the molecular and genetic mechanisms of neuronal plasticity and neurodegeneration” and Research Center of Neurology order No. 116012610014 “Study of the cellular and molecular mechanisms of the pathogenesis of neurodegenerative forms of cerebral pathology during their experimental modeling using modern cell technologies”.

Received: 03.09.2019, revised: 10.09.2019, accepted: 11.09.2019.