

УДК 616.8.018.74-002-092.4

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-242-249

Для цитирования: Салмина А.Б., Бойцова Е.Б., Моргун А.В., Панина Ю.А., Горина Я.В., Писарева Н.В., Нода М., Кутищева И.А., Мартынова Г.П. Экспрессия NLRP3 инфламмасом церебрального эндотелия при воспалении вирусного генеза *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 242–249.

Экспрессия NLRP3 инфламмасом церебрального эндотелия при воспалении вирусного генеза *in vitro*

Салмина А.Б.¹, Бойцова Е.Б.¹, Моргун А.В.¹, Панина Ю.А.¹, Горина Я.В.¹,
Писарева Н.В.¹, Нода М.², Кутищева И.А.¹, Мартынова Г.П.¹

¹Красноярский государственный медицинский университет (КГМУ) имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

² Университет Кюшу Япония, 812-8582, г. Фукуока, Maidashi Higashi-ku, 3-1-1

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Изучить влияние индукторов нейровоспаления вирусного генеза на экспрессию NLRP3 и структурную целостность эндотелиальных клеток головного мозга *in vitro*.

Материал и методы. Исследование проведено на клеточной культуре церебральных эндотелиоцитов. Источником клеток служил головной мозг крыс линии Wistar. К культуре эндотелиальных клеток добавляли полиинозиновую-полицитидиловую кислоту (PolyI:C) – 20 мкг/мл. В качестве группы сравнения использовали культуру эндотелиоцитов, к которым в культуральную среду добавляли спинномозговую жидкость, полученную от пациента с энтеровирусным менингитом (100 мкл). Ликвор был стандартизирован по концентрации белка методом Лоури. Концентрация белка составила 1 мкг/мл. В качестве контроля использовались эндотелиоциты, культивируемые в стандартной культуральной среде. Культивирование осуществляли с использованием культуральных вставок для 12-луночных планшетов. Через 24 и 72 ч культивирования во всех группах регистрировали трансэндотелиальное сопротивление. Через 24 ч оценивали экспрессию молекул NLRP3 с использованием двойного непрямого метода иммуноферментного окрашивания согласно протоколу производителя. Первичные антитела к NLRP3 (Abcam, США, ab51952) – разведение 1 : 100. Вторичные антитела меченые Alexa Fluor 488 (Abcam, США, ab150117) – разведение 1 : 200. Визуализация проводилась с помощью конфокальной лазерной микроскопии на микроскопе Olympus FV10i (Olympus, Япония).

Результаты. Через 24 ч культивирования эндотелиоцитов с PolyI:C и вирусным ликвором наблюдается снижение показателей трансэндотелиального сопротивления по сравнению с контролем. Через 72 ч трансэндотелиальное сопротивление оставалось значимо более низким по сравнению с группой контроля. Установлено, что количество эндотелиальных клеток, экспрессирующих молекулу NLRP3, максимально в культуре с добавлением патологического ликвора. После инкубации клеток с PolyI:C количество NLRP3-иммунопозитивных эндотелиоцитов увеличилось по сравнению с контролем, но было ниже, чем в группе сравнения.

Заключение. Влияние PolyI:C и патологически измененного ликвора приводит к нарушению структурной целостности эндотелиального монослоя, что проявляется в уменьшении показателя трансэндотелиального сопротивления. Одновременно с этим увеличивается количество эндотелиоцитов, которые

✉ Бойцова Елизавета Борисовна, e-mail: elizaveta.boicova@mail.ru.

экспрессируют NLRP3, что дает право предполагать участие этих механизмов в повреждении гематоэнцефалического барьера при нейроинфекции.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, трансэндотелиальное сопротивление, воспаление, вирусный менингит, эндотелиальные клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Полиинозиновая-полицитидиловая кислота (PolyI:C) – синтетический двухцепочечный полирибонуклеотид, который широко применяется в экспериментальных исследованиях как индуктор воспаления для создания модели вирусного воспаления [1]. PolyI:C взаимодействует в клетках с рецепторами TLR и способствует формированию инфламмосом NLRP3 [2]. Активация инфламмосом может играть определенную роль в защите организма против вирусной инфекции [3]. Вирусные инфекции индуцирует выработку интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) и интерлейкина-18 (ИЛ-18) в макрофагах путем активации каспазы-1. Стимулирование макрофагов PolyI:C индуцирует секрецию ИЛ-1 β и ИЛ-18 криопирин-зависимым путем (криопирин – основной компонент интерлейкина-1 инфламмосомы NLRP3) [4]). В исследовании T.D. Kanneganti (2006) в модели *in vitro* была показана роль криопирин в образовании ИЛ-1 β в ответ на воздействие PolyI:C в интактных условиях. NLRP3 активирует каспазу-1 и каспазу-5. В макрофагах, которые не содержат криопирин, не происходит активации каспаз, ИЛ-1 β и ИЛ-18 под влиянием вирусной РНК или PolyI:C. Авторы доказали, что заражение Сендай вирусом (парамиксовирус) и вирусом гриппа активирует NLRP3. Позднее подобный эффект был зарегистрирован для всех РНК-содержащих вирусов. Также авторы показали необходимость NLRP3 для синтеза ИЛ-1 β в ответ на воздействие PolyI:C *in vivo* [5]. В других исследованиях изучение активации инфламмосом с использованием PolyI:C и бактериальной РНК показали индуцирование ИЛ-1 β после длительного воздействия (24 ч) [6, 7].

Повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) – одно из ключевых событий при вирусных нейроинфекциях. Обнаружены различные эффекты PolyI:C в клетках ГЭБ. Так, в работе L.N. Pan et al. (2012) представлены данные о том, что инкубирование астроцитов с PolyI:C заметно ослабляет повреждения, вызванные кислородной депривацией, значительно повышает жизнеспособность клеток и снижает утечку лактатдегидрогеназы.

PolyI:C значительно усиливает экспрессию TRIF, сопровождающуюся уменьшением образования интерферона β (IFN β). Кроме того, PolyI:C значительно подавляет образование провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухолей (ФНО α) и ИЛ-6. Доказан дозозависимый эффект PolyI:C на увеличение продукции ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α , IFN β [8].

В последнее время все большее внимание уделяется роли инфламмосомы NLRP3 в центральной нервной системе (ЦНС), которая играет значимую роль в патогенезе невровоспалительных заболеваний. Доказано, что микроглия, астроциты, нейроны и эндотелиоциты экспрессируют NLRP3 [9]. Одним из механизмов активации инфламмосомного комплекса NLRP3 является экзогенный путь, который реализуется в результате инфекционного воздействия, повреждения тканей и метаболических нарушений [10]. Участие NLRP3 в развитии невровоспаления не подвергается сомнению. Например, в исследовании T. Hoegen et al. (2011) обнаружено снижение тяжести заболевания пневмококковым менингитом у мышей нокаутных по NLRP3 в десятки раз [11]. Логично предполагать, что инфламмосомо-опосредованные механизмы могут играть роль в нарушении структурно-функциональной целостности ГЭБ при вирусных менингитах.

Цель исследования – изучить влияние индукторов невровоспаления вирусного генеза на экспрессию NLRP3 и структурную целостность эндотелиальных клеток головного мозга *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Источником клеток служила кора головного мозга крыс линии Wistar возрастом 10 сут. Выделение церебральных эндотелиоцитов проводилось по модифицированному протоколу Y. Liu et al. (2013). Выделение мозга с удалением мозговых оболочек и крупных церебральных сосудов осуществлялось с помощью роллинга на асептической фильтровальной бумаге. Выделяли кору головного мозга и удаляли крупные сосуды в хо-

лодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия). Центрифугирование мелко нарезанной коры головного мозга проводили в пробирке объемом 15 мл в течение 3 мин при 150 g и комнатной температуре. Следующие этапы включали: 1) добавление к осадку в двухкратном объеме 25% FBS (Fetal Bovine Serum, HyClone, South America), тритурирование в количестве 25 раз пипеткой объемом 5 мл с последующим центрифугированием гомогената в течение 10 мин при 600 g при комнатной температуре; 2) забор самого нижнего слоя и перенос в новую коническую пробирку. Затем этапы тритурирования, центрифугирования повторяли три раза, после чего проводилась ферментативная обработка пеллета в двухкратном объеме (по отношению к объему пеллета) 0,1%-й коллагеназой II (ПанЭко, Россия) в течение 35 мин при +37 °C с периодическим перемешиванием. Умеренное ресуспензирование осадка с последующим центрифугированием осуществляли при 150 g в течение 5 мин, культивирование фрагментов и отдельных эндотелиальных клеток при +37 °C, 5% CO₂ в культуральных флаконах, предварительно покрытых желатином (Gelatin Solution 0,1%, Biological Industries, США) в культуральной среде: DMEM/F12 (HyClone, South America) + 20% FBS (HyClone, South America), 3 мг/мл глюкозы (Sigma Aldrich), 0,58 мг/мл глутамина (Sigma Aldrich), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (HyClone, South America). Смена среды проводилась каждые 3 дня. При достижении 90% конfluence среды удаляли. Клетки во флаконе промывались дважды раствором Хенкса (ПанЭко, Россия) и обрабатывались раствором 0,25%-го трипсина и ЭДТА (Gibco, США).

Культивирование эндотелиоцитов осуществляли в культуральных 12-луночных планшетах в присутствии PolyI:C, 20 мкг/мл, 24 ч, в бесывороточной среде (Pan, 2012), а также в присутствии ликвора (100 мкл), полученного от пациентов с энтеровирусным менингитом. Ликвор был стандартизирован по концентрации белка методом Лоури. Концентрация белка составила 1 мкг/мл. В качестве контроля использовались эндотелиоциты, культивируемые в интактной среде.

Для измерения трансэндотелиального сопротивления эндотелиоциты культивировали на поликарбонатных мембранных фильтрах-вставках в 12-луночных планшетах (0,4 мкм – размер пор, вставка 12 мм, Transwell 3493, Costar, США). Через 24 и 72 ч культивирования производилась регистрация ТЭС с помощью эпителиального вольт-

метра EVOM2 с использованием электрода STX2 (World Precision Instruments, США). Экспрессию молекул NLRP3 оценивали с использованием двойного непрямого метода иммуоферментного окрашивания согласно протоколу производителя с использованием следующих антител: первичные антитела к NLRP3 в рабочем разведении 1 : 100 (Abcam, США, ab51952). В качестве вторичных антител использовались антитела, меченые Alexa Fluor 488 (Abcam, США, ab150117). Визуализация проводилась с помощью конфокальной лазерной микроскопии на микроскопе Olympus FV10i (Olympus, Япония).

Статистическая обработка. Использовались методы описательной статистики. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – ошибка среднего. Использовались методы непараметрической статистики. Для оценки межгрупповых различий значений трансэндотелиального сопротивления, имеющих непрерывное распределение, применяли критерий Краскела – Уоллиса с последующим парным сравнением групп с использованием критерия Манна – Уитни. Для оценки различий экспрессии NLRP3 эндотелиоцитами использовался критерий χ^2 . Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При измерении трансэндотелиального сопротивления через 24 ч культивирования эндотелиальных клеток с PolyI:C обнаружено статистически значимое снижение показателей сопротивления во всех группах по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Также зарегистрировано статистически значимое снижение трансэндотелиального сопротивления при культивировании эндотелия в присутствии ликвора, полученного от пациента с вирусным менингитом, $p < 0,01$ (рис. 1).

В дальнейшем измерение ТЭС проводили через 72 ч. Установлено, что на 3-и сут происходило незначительное повышение ТЭС в культуре клеток с добавлением ликвора от пациента с вирусным менингитом, но статистически значимое уменьшение снижения ТЭС в культуре клеток с добавлением PolyI:C, $p < 0,01$ (рис. 2).

При регистрации экспрессии NLRP3 в культуре эндотелиальных клеток обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии в опытных группах в сравнении с контролем, особенно это увеличение видно в группе вирусного ликвора, $p < 0,01$ (рис. 3).

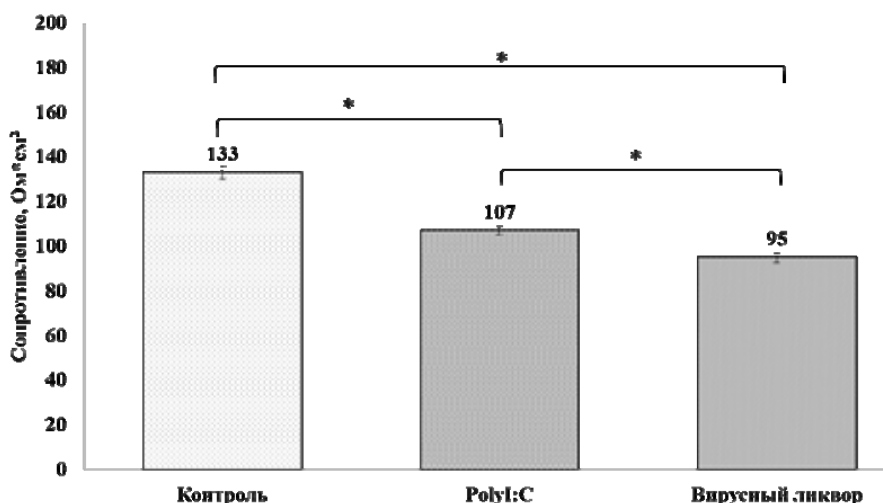


Рис. 1. Показатели трансэндотелиального сопротивления церебральных эндотелиоцитов при инкубации с PolyI:C, вирусным ликвором в течение 24 ч

* статистически значимые различия $p < 0,01$ (критерий Манна – Уитни).

Fig. 1. Measurements of transendothelial resistance of cerebral endotheliocytes during the incubation with PolyI:C, cerebrospinal fluid within 24 hours

* statistically significant differences $p < 0,01$ (Mann – Whitney test).

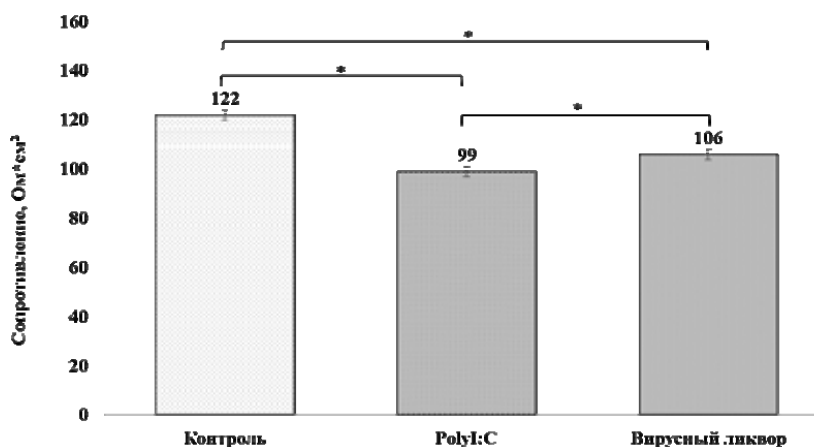


Рис. 2. Показатели трансэндотелиального сопротивления церебральных эндотелиоцитов при инкубации с PolyI:C, вирусным ликвором в течение 72 ч

* статистически значимые различия $p < 0,01$ (критерий Манна – Уитни).

Fig. 2. Measurements of transendothelial resistance of cerebral endotheliocytes during the incubation with PolyI:C, cerebrospinal fluid within 72 hours

* statistically significant differences $p < 0,01$ (Mann – Whitney test).

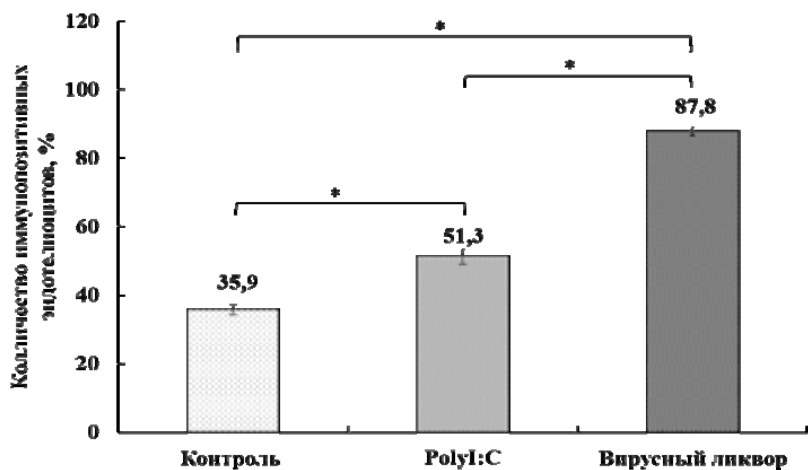


Рис. 3. Уровень экспрессии NLRP3 в церебральных эндотелиоцитах *in vitro*

* статистически значимые различия $p < 0,01$ (критерий χ^2).

Fig. 3. NLRP3 expression level in cerebral endotheliocytes *in vitro*

* statistically significant differences $p < 0,0$ (χ^2 test).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании показано, что при действии PolyI:C нарушается структурная целостность эндотелиального монослоя, что проявляется в уменьшении показателя трансэндотелиального сопротивления. Одновременно с этим увеличивается количество эндотелиоцитов, которые экспрессируют NLRP3. Отмечен более выраженный эффект влияния ликвора, полученного от пациентов с вирусным менингитом, по сравнению с PolyI:C.

Снижение трансэндотелиального сопротивления можно объяснить нарушением межэндотелиальных плотных контактов, сформированных белками окклюдинами, клаудинами и др. Ранее в работе L.Y. Huang et al. [12] показано, что при воздействии вирусов, а также PolyI:C наблюдается изменение экспрессии эндотелиальными клетками легких белков плотных контактов, снижается трансэндотелиальное сопротивление и увеличивается проницаемость монослоя пульмональных эндотелиоцитов. Учитывая, что плотные контакты играют особую роль в формировании ГЭБ, изменения, вызванные вирусными патогенами или PolyI:C в церебральном эндотелии, могут носить более выраженный характер.

Разницу в выраженности изменений, которые превалируют в группе клеток, культивируемых с патологическим ликвором, можно объяснить следующим образом. Известно, что увеличение экспрессии инфламмасом *in vivo* происходит не только за счет эндотелиоцитов, но и астроцитов, нейронов, клеток микроглии [13, 14]. NLRP3, в свою очередь, приводит к увеличению синтеза ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α , продуктов метаболизма арахидоновой кислоты. Таким образом, можно предположить, что более выраженное влияние ликвора связано с наличием в нем остатков вирусных частиц, провоспалительных цитокинов, которые оказывают свое провоспалительное и повреждающее действие.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что двухцепочечная РНК повреждает клетки эндотелия церебральных микрососудов и индуцирует формирование инфламмасом *in vitro*, и эти эффекты могут быть воспроизведены при действии спинномозговой жидкости, полученной от пациентов с острым вирусным менингитом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о

вкладе авторов. Салмина А.Б. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, окончательное утверждение для публикации рукописи. Бойцова Е.Б. – выполнение практической части исследования, написание основного текста рукописи. Моргун А.В. – анализ и интерпретация данных, написание и проверка рукописи. Панина Ю.А. – выполнение практической части исследования. Горина Я.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Нода М. – анализ и интерпретация данных. Кутищева И.А. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Мартынова Г.П. – анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в НИИ молекулярной медицины и патобиохимии при финансовой поддержке гранта РФФИ и ККФПНИНТД (проект № 16-44-243073, оценка повреждения барьера), гранта УМНИК (проект № 0020121, разработка и применение модели барьера).

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 66 от 15.12.2015 г.)

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sato-Kasai M., Kato T.A., Ohgidani M., Mizoguchi Y., Sagata N., Inamine S., Horikawa H., Hayakawa K., Shimokawa N., Kyuragi S., Seki Y., Monji A., Kanba S. Aripiprazole inhibits polyI:C-induced microglial activation possibly via TRPM7 // *Schizophrenia Research*. 2016; Sep 7. DOI: 10.1016/j.schres.2016.08.022.
2. Rajan J.V., Warren S.E., Miao E.A., Aderem A. Activation of the NLRP3 inflammasome by intracellular polyI:C // *FEBS Letters*. 2010; Nov. 19; 584 (22): 4627–4632. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.10.036.
3. Thomas P.G., Dash P., Aldridge J.R. Jr., Ellebedy A.H., Reynolds C., Funk A.J., Martin W.J., Lamkanfi M., Webby R.J., Boyd K.L., Doherty P.C., Kanneganti T.D. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1 // *Immunity*. 2009; Apr. 17; 30 (4): 566–575. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.02.006.
4. Levy R., Gerard L., Kummerle-Deschner J., Lachmann H.J., Kone-Paut I., Cantarini L., Woo P., Naselli A., Bader-Meunier B., Insalaco A., Al-Mayouf S.M., Ozen S., Hofer M., Frenkel J., Modesto C., Nikishina I., Schwarz T., Martino S., Meini A., Quartier P., Martini A., Ruper-ton N., Neven B., Gattorno M. Phenotypic and genotypic

- characteristics of cryopyrin-associated periodic syndrome: a series of 136 patients from the Eurofever Registry // *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2015; Nov. 74 (11): 2043–2049. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204991.
5. Kanneganti T.D., Body-Malapel M., Amer A., Park J.H., Whitfield J., Franchi L., Taraporewala Z.F., Miller D., Patton J.T., Inohara N., Nunez G. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA // *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; Dec. 1; 281 (48): 36560–36568. DOI: 10.1074/jbc.M607594200.
 6. Kanneganti T.D., Ozoren N., Body-Malapel M., Amer A., Park J.H., Franchi L., Whitfield J., Barchet W., Colonna M., Vandenabeele P., Bertin J., Coyle A., Grant E.P., Akira S., Nunez G. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3 // *Nature*. 2006; Mar. 9; 440 (7081): 233–236. DOI: 10.1038/nature04517.
 7. Kanneganti T.D., Body-Malapel M., Amer A., Park J.H., Whitfield J., Franchi L., Taraporewala Z.F., Miller D., Patton J.T., Inohara N., Nunez G. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA // *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; Dec 1; 281 (48): 36560–36568. DOI: 10.1074/jbc.M607594200.
 8. Pan L.N., Zhu W., Li C., Xu X.L., Guo L.J., Lu Q. Toll-like receptor 3 agonist Poly I:C protects against simulated cerebral ischemia in vitro and in vivo // *Acta Pharmacologica Sinica*. 2012; Oct. 33 (10): 1246–1253. DOI: 10.1038/aps.2012.122.
 9. Hanamsagar R., Torres V., Kielian T. Inflammasome activation and IL-1beta/IL-18 processing are influenced by distinct pathways in microglia // *Journal of Neurochemistry*. 2011; Nov. 119 (4): 736–748. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07481.x.
 10. Koizumi Y., Toma C., Higa N., Nohara T., Nakasone N.; Suzuki T. Inflammasome activation via intracellular NLRs triggered by bacterial infection // *Cellular Microbiology*. 2012; Feb. 14 (2): 149–154. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01707.x.
 11. Hoegen T., Tremel N., Klein M., Angele B., Wagner H., Kirschning C., Pfister H.W., Fontana A., Hammerschmidt S., Koedel U. The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md: 1950). 2011; Nov. 15; 187 (10): 5440–5451. DOI: 10.4049/jimmunol.1100790.
 12. Huang L.Y., Stuart C., Takeda K., D'Agnillo F., Golding B. Poly(I:C) Induces Human Lung Endothelial Barrier Dysfunction by Disrupting Tight Junction Expression of Claudin-5 // *PLoS One*. 2016; 11 (8): e0160875. DOI: 10.1371/journal.pone.0160875.
 13. Lammerding L., Slowik A., Johann S., Beyer C., Zendedel A. Poststroke Inflammasome Expression and Regulation in the Peri-Infarct Area by Gonadal Steroids after Transient Focal Ischemia in the Rat Brain // *Neuroendocrinology*. 2016; 103 (5): 460–475. DOI: 10.1159/000439435.
 14. Lu M., Sun X.L., Qiao C., Liu Y., Ding J.H., Hu G. Uncoupling protein 2 deficiency aggravates astrocytic endoplasmic reticulum stress and nod-like receptor protein 3 inflammasome activation // *Neurobiology of Aging*. 2014; Feb. 35 (2): 421–430.

Поступила в редакцию 10.05.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Салмина Алла Борисовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Бойцова Елизавета Борисовна, аспирант, кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Моргун Андрей Васильевич, канд. мед. наук, ассистент, кафедра педиатрии ИПО, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Панина Юлия Анатольевна, канд. мед. наук, ассистент, кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Горина Яна Валерьевна, канд. фарм. наук, доцент, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Писарева Наталья Валерьевна, канд. фарм. наук, доцент, кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Кутищева Ирина Александровна, канд. мед. наук, доцент, кафедра детских инфекционных болезней с курсом ПО, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Нода Маами, доцент, лаборатория патофизиологии, факультет фармации, Университет Кюсю, г. Фукуока, Япония.

Мартынова Галина Петровна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой детских инфекционных болезней с курсом ПО, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

(✉) Бойцова Елизавета Борисовна, e-mail: elizaveta.boicova@mail.ru.

УДК 616.8.018.74-002-092.4

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-242-249

For citation: Salmina A.B., Boytsova E.B., Morgun A.V., Panina Yu.A., Gorina Ya.V., Pisareva N.V., Kutishcheva I.A., Noda M., Martynova G.P. Expression of cerebral endothelial NLRP3 inflammasome in viral inflammation *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 242–249.

Expression of cerebral endothelial NLRP3 inflammasome in viral inflammation *in vitro*

Salmina A.B.¹, Boytsova E.B.¹, Morgun A.V.¹, Panina Yu.A.¹, Gorina Ya.V.¹, Pisareva N.V.¹, Kutishcheva I.A.¹, Noda M.², Martynova G.P.¹

¹ Krasnoyarsk State Medical University (KSMU) named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

² Kyushu University 3-1-1, Maidashi Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582, Japan

ABSTRACT

The goal is to study the effects of pro-inflammatory agents on the expression of NLRP3 and the structural integrity of cerebral microvessel endothelial cells *in vitro*.

Materials and methods. The study was conducted on a culture of cerebral endothelial cells. The cells were isolated from Wistar rat brains. Polyinosinic-polycytidylic acid (PolyI:C) – 20 µg / ml was added to cerebral microvessel endothelial cells. In another series of experiments, cells incubated with cerebrospinal fluid (CSF) obtained from patients with enteroviral meningitis (100 µl) were used as a comparison group. CSF was standardized for protein concentration by the Lowry method. The protein concentration was 1 µg / ml. As a control group, cerebral endothelial cells have been cultured in a standard medium. We used the culture insert for 12-well plates. After 24 and 72 h of culturing, we measured transendothelial electrical resistance (TEER) in the endothelial layer. Expression of NLRP3 inflammasomes was assessed with immunocytochemistry 24 hrs from the beginning of cell culture. We used double indirect immunoenzymatic staining method according to the manufacturer's protocol. Primary antibodies to NLRP3 (Abcam, USA, ab51952) in 1: 100 dilution, secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 488 (Abcam, USA, ab150117) in dilution 1: 200 have been applied. Visualization was performed by confocal laser microscopy microscope Olympus FV10i (Olympus, Japan).

Results. TEER decreased in PolyI:C and CSF-treated cells after 24 hr from the beginning of incubation. After 72 hours, TEER was significantly lower in these groups compare to the control one. NLRP3 expression was maximal in the cells treated with CSF. After incubation of the cells with PolyI:C, NLRP3 expression in cerebral endothelial cells was elevated compare to the control group, but did not reached the level seen in CSF-treated cells.

Conclusion. PolyI:C and CSF obtained from the patients with viral meningitis induce disruption of cerebral microvessels endothelial layer integrity with the corresponding rise in NLRP3 expression in the cells, thereby suggesting mechanism of blood-brain barrier impairment in neuroinfection.

Key words: blood-brain barrier, transendothelial resistance, inflammation, viral meningitis, endothelial cells.

Received May 10.2017
Accepted November 08.2017

Salmina Alla B., DM, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Boytsova Elizaveta B., Postgraduate Student, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Morgun Andrej V., PhD, Assistant, Department of Pediatrics, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Panina Yuliya A., PhD, Assistant, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Gorina Yana V., PhD, Associate Professor, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Pisareva Natalya V., PhD, Associate Professor, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Kutishcheva Irina A., PhD, Associate Professor, Department of Pediatric Infectious Diseases, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Mami Noda, PhD, Laboratory of Pathophysiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

Martynova Galina P., DM, Professor, Head of the Department Pediatric Infectious Diseases, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

(✉) **Boytsova Elizaveta B.**, e-mail: elizaveta.boicova@mail.ru.