

## Повышение внутриклеточного уровня НАД<sup>+</sup> и разнонаправленные изменения экспрессии CD38 в клетках гиппокампа при экспериментальной болезни Альцгеймера

А.А. Семёнова<sup>1</sup>, Я.В. Горина<sup>1</sup>, Е.Д. Хилажева<sup>1</sup>, Е.В. Харитоновна<sup>1</sup>, А.Б. Салмина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

<sup>2</sup> Научный центр неврологии Минобрнауки России 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, 80

### Резюме

Целью исследования являлась оценка уровня НАД<sup>+</sup> в головном мозге мышей, подвергшихся введению бета-амилоида (Аβ), а также определение активности АДФ-рибозилциклазы/CD38 и количества CD38-иммунопозитивных клеток нейрональной, астроцитарной и эндотелиальной природы. **Материал и методы.** Модель болезни Альцгеймера воспроизводилась путем интрагиппокампального введения Аβ мышам линии C57BL/6. Содержание НАД<sup>+</sup> во внеклеточной жидкости головного мозга и в ткани гиппокампа определяли спектрофотометрически, ферментативную активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 – флуориметрическим методом, количество CD38-иммунопозитивных клеток – методом иммуногистохимии. **Результаты и их обсуждение.** Уровень НАД<sup>+</sup> был значительно повышен в ткани гиппокампа у мышей после введения Аβ, при этом концентрация внеклеточного НАД<sup>+</sup> не изменялась. Активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 в ткани гиппокампа осталось прежним, однако число CD38-иммунопозитивных нейронов снизилось, а количество CD38<sup>+</sup> эндотелиоцитов увеличилось в гиппокампе мышей после введения Аβ. **Заключение.** Разнонаправленные изменения экспрессии АДФ-рибозилциклазы/CD38 в нейронах и эндотелиоцитах соответствуют разному метаболическому состоянию этих типов клеток и наряду с увеличением внутриклеточного пула НАД<sup>+</sup> при экспериментальной болезни Альцгеймера отражают адаптивный стрессовый ответ на введение Аβ.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, ангиопатия, НАД<sup>+</sup>, CD38.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарности.** Работа выполнена при государственной финансовой поддержке Президента РФ ведущих научных школ РФ (проект НШ-2547.2020.7) на базе НИИ молекулярной медицины и патофизиологии, с использованием оборудования ЦКП «Молекулярные и клеточные технологии».

**Автор для переписки:** Семёнова А.А., e-mail: alina\_shamsutdin@mail.ru

**Для цитирования:** Семёнова А.А., Горина Я.В., Хилажева Е.Д., Харитоновна Е.В., Салмина А.Б. Повышение внутриклеточного уровня НАД<sup>+</sup> и разнонаправленные изменения экспрессии CD38 в клетках гиппокампа при экспериментальной болезни Альцгеймера. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 37–46. doi: 10.18699/SSMJ20210505

## Rising of intracellular NAD<sup>+</sup> level and oppositely directed changes in CD38 expression in hippocampal cells in experimental Alzheimer's disease

A.A. Semenova<sup>1</sup>, Ya.V. Gorina<sup>1</sup>, E.D. Khilazheva<sup>1</sup>, E.V. Kharitonova<sup>1</sup>, A.B. Salmina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of Minzdrav of Russia 660022, Krasnoyarsk, Partisan Zheleznyak str., 1

<sup>2</sup> Research Center of Neurology 125367, Moscow, Volokolamskoe highway, 80

## Abstract

The aim of the study was to assess the level of NAD<sup>+</sup> in the brain of mice treated with beta-amyloid (A $\beta$ ), as well as to determine the activity of ADP-ribosyl cyclase/CD38 and the number of CD38-immunopositive neurons, astrocytes and endothelial cells. **Material and methods.** The Alzheimer's disease model was reproduced by intrahippocampal administration of A $\beta$  to C57BL/6 mice. Determination of the NAD<sup>+</sup> level in the extracellular fluid of the brain and in the hippocampal tissue was carried out by spectrophotometric analysis. Evaluation of the enzymatic activity of ADP-ribosyl cyclase/CD38 was carried out by the fluorimetric method, determination of the number of CD38-immunopositive cells by the immunohistochemistry method. **Results and discussion.** The level of NAD<sup>+</sup> was significantly increased in the hippocampal tissue in mice after administration of A $\beta$ , while the level of extracellular NAD<sup>+</sup> did not change. The activity of ADP-ribosyl cyclase/CD38 in the hippocampal tissue did not change, but the number of CD38-immunopositive neurons decreased, and the number of CD38<sup>+</sup> endothelial cells increased in the hippocampus of mice after administration of A $\beta$ . **Conclusion.** Opposite changes in the expression of ADP-ribosyl cyclase / CD38 in neurons and endothelial cells correspond to different metabolic states of these types of cells and, along with an increased intracellular pool of NAD<sup>+</sup> in experimental Alzheimer's disease, reflect an adaptive stress response to A $\beta$  administration.

**Key words:** Alzheimer's disease, beta amyloid, angiopathy, NAD<sup>+</sup>, CD38.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments.** This work was carried out with the state financial support of the President of the Russian Federation of the leading scientific schools of the Russian Federation (project NSh-2547.2020.7) on the basis of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry using equipment from the Center for Collective Use «Molecular and Cellular Technologies».

**Correspondence author:** Semenova A.A., e-mail: alina\_shamsutdin@mail.ru

**Citation:** Semenova A.A., Gorina Ya.V., Khilazheva E.D., Kharitonova E.V., Salmina A.B. Rising of intracellular NAD<sup>+</sup> level and oppositely directed changes in CD38 expression in hippocampal cells in experimental Alzheimer's disease. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 37–46. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210505

## Введение

В настоящее время болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной формой старческого слабоумия [1]. Патогенез нейродегенерации альцгеймеровского типа включает в себя нарушения протеолиза белка-предшественника амилоида, аккумуляцию бета-амилоида во внеклеточном пространстве, накопление гиперфосфорилированного тау-белка, развитие кальциевого дисбаланса, дисфункции митохондрий, индукцию гибели нейронов, нарушения функциональной активности астроглии и микроглии с развитием нейровоспаления, изменения нейрогенеза и церебрального ангиогенеза, нарушения метаболического сопряжения клеток головного мозга, развитие окислительного стресса [2–4]. Важным компонентом патогенеза нейродегенерации при старении и БА может быть истощение внутриклеточного уровня НАД<sup>+</sup> [5, 6], сенсором и регулятором которого, по мнению ряда авторов [7, 8], выступает молекула CD38.

CD38 представляет собой трансмембранный гликопротеин, НАД<sup>+</sup>-гликогидролазу/АДФ-рибозилциклазу, конвертирующую НАД<sup>+</sup> в циклическую АДФ-рибозу (цАДФР). цАДФР может выполнять функцию мобилизатора Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, в частности, через связы-

вание с рианодиновыми рецепторами эндоплазматического ретикулума [9, 10]. Особенности регуляции активности АДФ-рибозилциклазы в электровозбудимых клетках позволили предположить, что этот фермент может выполнять роль внутриклеточного редокс-сенсора и НАД<sup>+</sup>-сенсора, реагирующего на биодоступность субстрата (НАД<sup>+</sup>), осцилляции концентраций которого в цитозоле, митохондриях и ядре отражают функциональную активность и состояние реакций энергетического обмена в клетках [8, 10–13]. Несубстратным лигандом CD38 является CD31, экспрессируемый клетками эндотелия, благодаря их взаимодействию осуществляется адгезия CD38<sup>+</sup> лейкоцитов к CD31<sup>+</sup> клеткам эндотелия сосудов, например, при воспалении [14, 15]. Известно, что благодаря олигомерной структуре CD38 ведет себя как каталитически активный транспортер, ответственный за генерацию и вход цАДФР в клетку, причем дополнительно такую же функциональную нагрузку может нести экспрессируемый в цитоплазматической мембране коннексин 43 (Cx43), обычно функционально сопряженный с CD38 [16, 17].

К. Nayaakawa et al. [18] ранее показали, что астроциты могут высвобождать функциональные митохондрии, которые поступают в поврежденные нейроны при инсульте, причем этот механизм

в клетках астроглии регулируется активностью CD38. Экспрессия CD38 характерна для разных видов клеток, входящих в состав нейроваскулярной единицы головного мозга – нейронов, астроцитов, микроглии [19]. В литературе отсутствуют данные об экспрессии CD38 на клетках церебрального эндотелия, хотя по аналогии с эндотелиальными клетками сердца [20] это весьма вероятно. Целью настоящего исследования явилась оценка уровня НАД<sup>+</sup>, активности АДФ-рибозилциклазы и экспрессии CD38-позитивных клеток в гиппокампе животных с моделью нейродегенерации альцгеймеровского типа. Чтобы оценить вклад внутриклеточного пула НАД<sup>+</sup>, мы исследовали содержание НАД<sup>+</sup> в межклеточной жидкости головного мозга, собранной методом микродиализа.

### Материал и методы

В работе использовали самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. Моделирование БА осуществляли введением олигомеров Aβ1-42 в СА1 зону гиппокампа билатерально по 1 мкл (стереотаксические координаты ML ± 1,3 мм, в AP – 2,0 мм, DV – 1,9 мм) [21]. Контрольная группа – ложнооперированные животные после введения растворителя для Аβ, фосфатно-солевого буфера (PBS). Признаки БА оценивали начиная с 10 суток [22], канюлю для микродиализа вводили на 11-е сутки после оперативного вмешательства. Верификацию модели БА осуществляли окраской тиюфлавином S. После введения амилоида в ткани головного мозга наблюдались флуоресцирующие амилоидные бляшки зеленого цвета. Контрольная группа состояла из 20 мышей: у 4 мышей проводился забор межклеточной жидкости головного мозга (микродиализ), с дальнейшей транскардиальной перфузией и забором мозга для иммуногистохимического исследования (ИГХ), у 16 мышей выделяли гиппокамп и получали гомогенат для определения уровня НАД<sup>+</sup> ( $n = 7$ ) и активности АДФ-рибозилциклазы ( $n = 9$ ). Опытная группа ( $n = 17$ ): микродиализ и ИГХ ( $n = 6$ ), содержание НАД<sup>+</sup> ( $n = 4$ ) и активность АДФ-рибозилциклазы ( $n = 7$ ).

Исследования на животных проводились в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС).

Для осуществления методики микродиализа головного мозга направляющую канюлю (зонд) устанавливали с использованием стереотаксического аппарата. Зонд вводили в левый желудочек головного мозга по следующим координатам: ML 1 мм, в AP – 0,46 мм, DV 2,2 мм, фиксировали

стоматологическим цементом, после чего рану зашивали. После операции животное помещали в клетку на 5 суток для полного восстановления со свободным доступом к воде и корму при постоянной температуре  $21 \pm 1$  °C и регулярном световом цикле 12 ч день / 12 ч ночь. Диализат (20 мкл) собирали в течение 24 ч у свободнодвижущегося животного, подключенного через капилляры к направляющей канюле, с использованием установки для микродиализа (Eicom Corporation, США). Экспериментальные пробы диализата собирали со скоростью 0,3 мкл/мин в микропланшет, расположенный в коллекторе с системой охлаждения до 2 °C. Собранную межклеточную жидкость замораживали при –20 °C до момента востребования.

Целевые компоненты межклеточной жидкости головного мозга собирали с использованием искусственной спинномозговой жидкости, которую готовили в пробирке с герметичной крышкой следующим образом. В деионизированной воде (5 мл) растворяли 0,36525 г NaCl, 0,0093 г KCl, 0,0075 г NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, к 0,5 мл полученного раствора добавляли 0,01092 г NaHCO<sub>3</sub>, 0,009 г кристаллической глюкозы, 0,01 г CaCl<sub>2</sub>, 0,0025 г MgCl<sub>2</sub> и доводили общий объем аликвоты до 5 мл, фильтровали.

Через 60 минут после окончания проведения микродиализа осуществляли транскардиальную перфузию 4%-м параформальдегидом с последующим забором головного мозга. Мозг фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине, после чего погружали в 20%-й раствор сахарозы. С помощью микротомы Microm HM 650 (Thermo Fisher Scientific, США) изготавливали срезы толщиной 50 мкм. Изучали экспрессию маркеров методом непрямой ИГХ для свободно плавающих срезов [23]. После промывки в PBS срезы блокировали 3%-м козьим сывороточным альбумином в PBS и 1%-м Triton X-100 в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим инкубированием в течение ночи с первичными антителами к нейронспецифической энolahе (NSE; GeneTex, GTX85462, chicken polyclonal) 1:1000, глиальному фибриллярному белку (GFAP; MyBioSource.com, MBS8241552, mouse monoclonal) 1:1000, CD31 (MyBioSource.com, MBS532307, rat monoclonal) 1:1000 и CD38 (GeneTex, GTX37752, rabbit polyclonal) 1:1000 с 3%-м BSA в PBS и 0,2%-м Triton X-100 при 4 °C. После инкубации с первичными антителами срезы промывали и инкубировали со вторичными антителами Alexa Fluor 555 (Abcam, ab150074), Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150171), Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150115), Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150159) в разведении 1:1000 в течение 2 ч при комнатной температуре. Изображения получали

с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 10i (Olympus Corporation, Япония). В срезах головного мозга подсчитывали абсолютное количество клеток в поле зрения, экспрессирующих молекулы CD38 в клетках нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы на различных уровнях в гиппокампе (Lateral 1,90 mm, 2,40 mm, 2,90 mm). Оценивали не менее пяти полей зрения в зубчатой извилине, в областях гиппокампа CA1 и CA3.

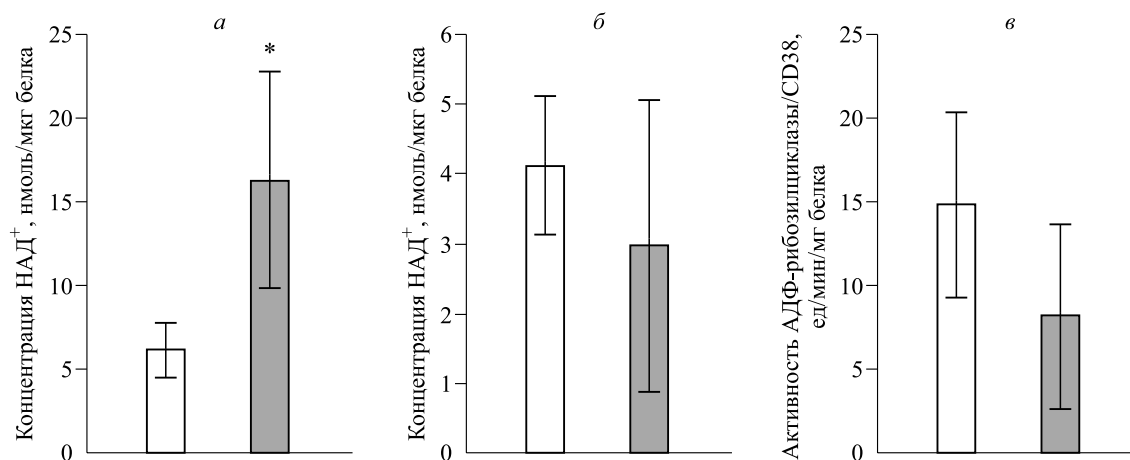
Содержание  $\text{NAD}^+$  во внеклеточной жидкости головного мозга и в ткани гиппокампа определяли спектрофотометрически согласно протоколу производителя, представленного в наборе NAD Quantification Kit (Colorimetric/Fluorometric) (Sigma-Aldrich, США, MAK038). Ферментативную активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 нейронов оценивали флуориметрически с использованием флуорогенного субстрата никотинамидгуанидинуклеотида ( $\text{HGD}^+$ ) согласно стандартному протоколу. Образцы ткани гомогенизировали при  $4^\circ\text{C}$ , в полученном гомогенате определяли концентрацию белка по стандартному протоколу (MicroLowry test, Sigma-Aldrich) и активность фермента путем инкубации 100 мкл гомогената ткани с реакционной смесью, содержащей 100 мкм  $\text{HGD}^+$  в 20 мМ трис- $\text{HCl}$  (pH 7,4) в течение 20 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Интенсивность флуоресценции супернатанта регистрировали на 0 и 20 мин инкубации на спектрофлуориметре CM2203 (Solar, Белоруссия) при длине волны возбуждения

300 нм и длине волны испускания 410 нм. Активность фермента вычисляли по разнице амплитуды флуоресценции на 20 и 0 минут инкубации, отнесенной к 1 мг белка ткани в минуту.

Статистическую обработку результатов проводили методом непараметрической статистики, для оценки различий между группами использовали критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы ( $p$ ) принимали равным 0,05. Результаты в тексте представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (Me [Q1; Q3]), на рисунках для наглядности – в виде среднего значения и стандартного отклонения.

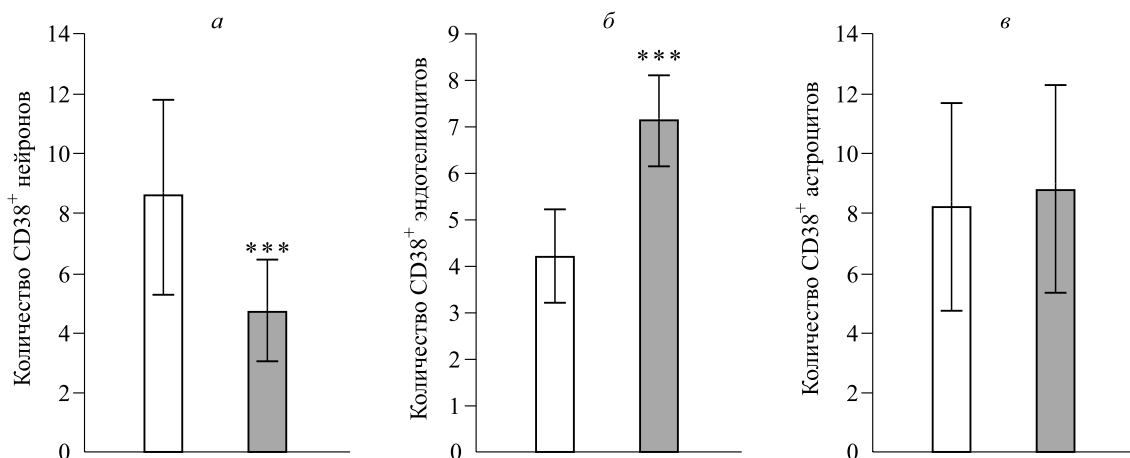
## Результаты

В гомогенатах гиппокампа мышей с интра-гиппокампальным введением  $\text{A}\beta$  уровень  $\text{NAD}^+$  был значительно выше (18,24 [9,40; 21,28] %), чем в контрольной группе (5,64 [5,06; 8,02] %) ( $p = 0,024$ , рис. 1, а). Межклеточная жидкость у ложнооперированных мышей, собранная методом микродиализа, содержала  $\text{NAD}^+$  в количестве (4,11 [3,25; 4,98] %) нмоль/мкг белка, в группе мышей с экспериментальной нейродегенерацией содержание  $\text{NAD}^+$  составило (1,73 [1,51; 5,63] %) нмоль/мкг белка ( $p = 0,53$ , рис. 1, б). Таким образом, нейротоксическое действие  $\text{A}\beta$  привело к увеличению концентрации  $\text{NAD}^+$  в ткани гиппокампа, преимущественно во внутриклеточном компартменте. Примечательно, что активность



**Рис. 1.** Уровень  $\text{NAD}^+$  в ткани гиппокампа (а) и внеклеточной жидкости головного мозга (б), активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 в ткани гиппокампа (в) животных контрольной группы (белые столбики) и с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера (серые столбики);  $n = 4-7$  (а, б),  $n = 7-9$  (в); \* – отличие от величины соответствующего показателя контрольной группы статистически значимо при  $p < 0,05$

**Fig. 1.**  $\text{NAD}^+$  content in hippocampus tissue (а) and the extracellular fluid of the brain (б), ADP-ribosyl cyclase/CD38 activity in hippocampus tissue of animals of the control group (white bars) and with an experimental model of Alzheimer's disease (grey bars);  $n = 4-7$  (а, б),  $n = 7-9$  (в); \* –  $p < 0,05$  compared to control



**Рис. 2.** Экспрессия CD38 в гиппокампе на нейронах (а), эндотелиоцитах (б), астроцитах (в) ложнооперированных животных (белые столбики) и после интрагиппокампального введения Аβ (серые столбики); \*\*\* – отличие от величины соответствующего показателя контрольной группы статистически значимо при  $p < 0,001$

**Fig. 2.** Expression of CD38 in the hippocampus on neurons (a), on endothelial cells (b), on astrocytes (c) of sham-operated animals (white bars) and after intrahippocampal administration of amyloid beta (grey bars); \*\*\* –  $p < 0,001$  compared to control

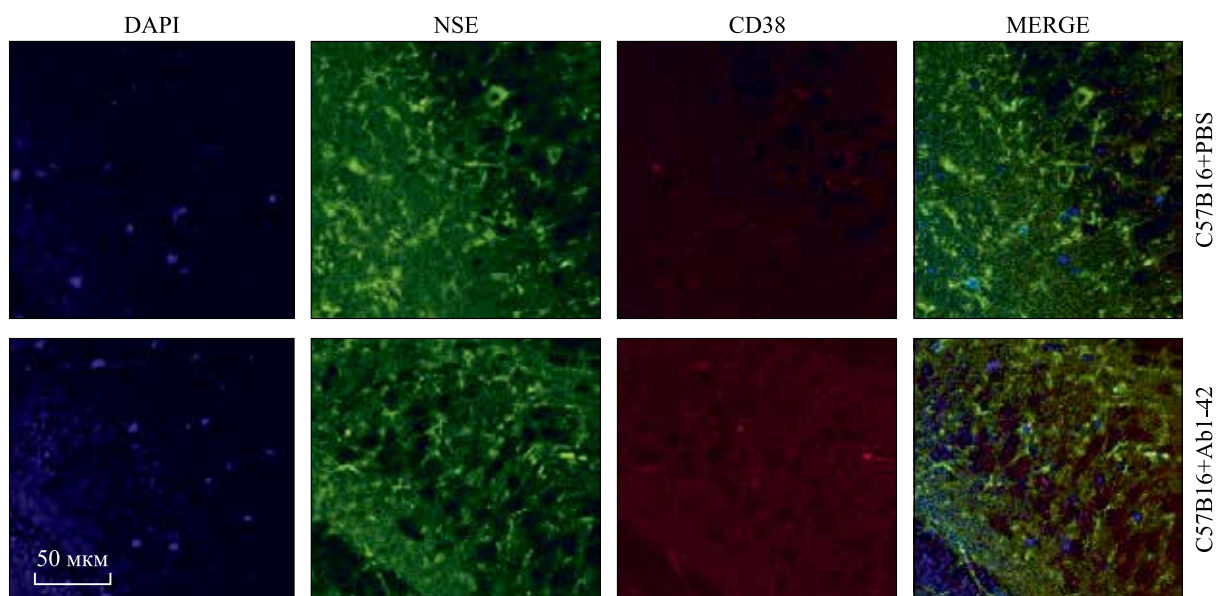
АДФ-рибозилциклазы/CD38 в ткани гиппокампа значимо не различалась у животных обеих групп (контроль – 14,17 [11,05; 15,62], опыт – 8,16 [3,77; 12,35] ед/мин/мг белка) (рис. 1, в).

Вместе с тем мы обнаружили статистически значимое снижение экспрессии CD38 на нейронах в гиппокампе головного мозга (рис. 2, а; рис. 3) животных с интрагиппокампальным введением Аβ (4,50 [4,00; 6,00] %) по сравнению с ложнооперированными животными (9,00 [7,00; 11,00] %) ( $p = 0,0003$ ). В клетках эндотелиальной природы (рис. 2, б; рис. 4), напротив, отмечалось увеличение количества CD38<sup>+</sup> клеток у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера относительно группы контроля: (7,00 [4,00; 8,00] %) и (4,00 [3,00; 5,50] %) ( $p < 0,0001$ ) соответственно. Статистически значимых различий экспрессии CD38 на астроцитах головного мозга (рис. 2, в; рис. 5) животных опытной и контрольной групп не обнаружено: (8,00 [6,00; 12,00] %) и (7,00 [5,75; 11,00] %) ( $p = 0,5845$ ) соответственно. Таким образом, на фоне увеличения внутриклеточного уровня НАД<sup>+</sup> в гиппокампе клетки эндотелия церебральных микрососудов демонстрируют значительное увеличение, а клетки нейрональной природы – существенное снижение экспрессии CD38 при развитии нейродегенерации. Суммарное определение активности фермента в таком случае не отражает характера его функциональной активности в клетках каждого типа в ткани.

## Обсуждение

Молекула НАД<sup>+</sup> является ключевым кофактором, например, для дегидрогеназ гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и субстратом для ряда НАД<sup>+</sup>-конвертирующих ферментов (CD38, сиртуины, поли(АДФ-рибозил)полимераза, моно(АДФ-рибозил)трансферазы) [10]. Оценка уровня НАД<sup>+</sup> дает представление об эффективности окислительно-восстановительных процессов и митохондриального дыхания в клетке. Поскольку множество исследований отмечает снижение содержания НАД<sup>+</sup> с возрастом, а также при нейродегенерациях [5, 6, 24], найденный нами повышенный уровень НАД<sup>+</sup> в клетках гиппокампа мышей с экспериментальной БА, по-видимому, характеризует развитие метаболического ответа на токсическое действие Аβ.

Исходя из полученных нами данных, логично предположить, что результатом токсического эффекта Аβ на клетки гиппокампа в раннем периоде после его интрагиппокампального введения является активизация механизмов стресс-ответа клеток, что приводит к увеличению концентрации НАД<sup>+</sup> в ткани гиппокампа в связи с регенерацией НАД<sup>+</sup> в реакциях гликолиза и/или окислением НАДН в дыхательной цепи митохондрий [25]. Недавно показано, что клетки готовы «пожертвовать» митохондриальным дыханием в том случае, если потребность в НАД<sup>+</sup> в них выше,

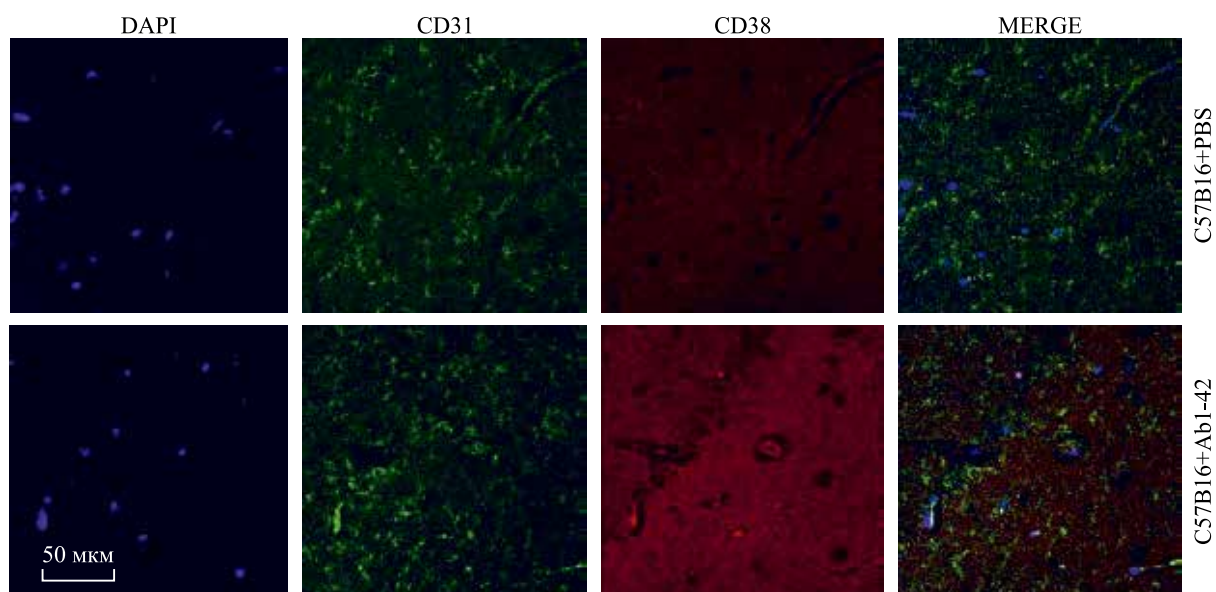


**Рис. 3.** Экспрессия CD38 на нейронах в гиппокампе ложнооперированных животных (C57BL/6+PBS) и после интрагиппокампального введения  $A\beta$  (C57BL/6+Ab1-42)

**Fig. 3.** Expression of CD38 on neurons in the hippocampus of sham-operated animals. (C57BL/6 + PBS) and after intrahippocampal administration of amyloid beta (C57BL/6 + Ab1-42)

чем потребность в АТФ, например, при инициации митоза [26]. Действительно, интенсивный синтез  $NAD^+$  сопровождается защитными клеточными ответами [27], а введение предшественников  $NAD^+$  восстанавливает сниженный с возрастом уровень  $NAD^+$  в тканях мышей [28], редуцирует неврологические проявления БА [29], аутизма [30].

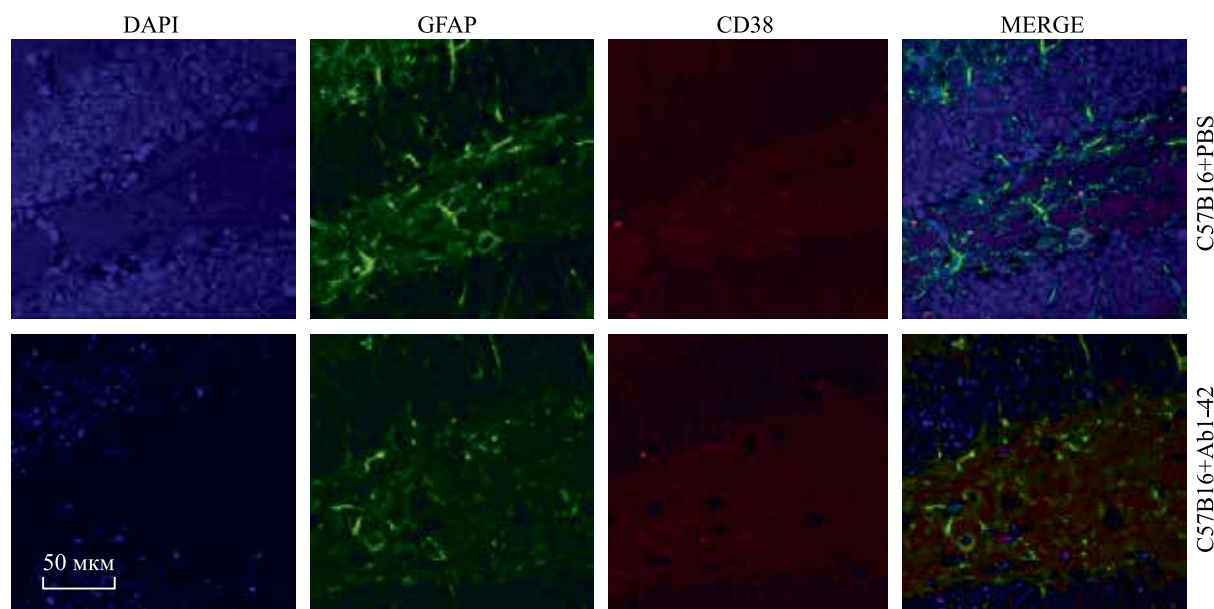
Увеличение биодоступности  $NAD^+$  является вероятной причиной повышения экспрессии CD38, который в силу своей  $NAD^+$ -гликогидролазной/АДФ-рибозилциклазной активности может эффективно конвертировать  $NAD^+$  в продукты с кальций-мобилизующей активностью [9]. С другой стороны,  $NAD^+$  служит



**Рис. 4.** Экспрессия CD38 на эндотелиоцитах в гиппокампе ложнооперированных животных (C57BL/6+PBS) и после интрагиппокампального введения  $A\beta$  (C57BL/6+Ab1-42)

**Fig. 4.** Expression of CD38 on endothelial cells in the hippocampus of sham-operated animals. (C57BL/6 + PBS) and after intrahippocampal administration of amyloid beta (C57BL/6 + Ab1-42)





**Рис. 5.** Экспрессия CD38 на астроцитах в гиппокампе ложнооперированных животных (C57BL/6+PBS) и после интрагиппокампального введения Аβ (C57BL/6+Ab1-42)

**Fig. 5.** Expression of CD38 on astrocytes in the hippocampus of sham-operated animals. (C57BL/6 + PBS) and after intrahippocampal administration of amyloid beta (C57BL/6 + Ab1-42)

кофактором ферментов, обеспечивающих защиту клетки от последствий окислительного повреждения ДНК – поли(АДФ-рибозил)полимеразы и сиртуинов [31]. В таком случае активация процесса регенерации молекул НАД<sup>+</sup> в реакциях интенсивного гликолиза на фоне подавления митохондриальной активности клеток гиппокампа приведет к «конкуренции» CD38 и ферментов репарации ДНК за субстрат. Примечательно, что мы не обнаружили изменений внеклеточного уровня НАД<sup>+</sup>, что свидетельствует о том, что процессы транспорта НАД<sup>+</sup> из клеток, например, за счет активности паннексинов и коннексиновых полуканалов [32], заторможены для сохранения НАД<sup>+</sup> в клетках, либо процессы клеточной гибели, сопровождающиеся высвобождением НАД<sup>+</sup> во внеклеточное пространство, не активны. Известно, что содержание НАД<sup>+</sup> в клетках всегда значительно больше, чем во внеклеточном пространстве [33], причем часть внеклеточного НАД<sup>+</sup> может захватываться клетками для восполнения его внутриклеточной концентрации, что, например, необходимо для предотвращения гибели клеток [34].

Зарегистрированные нами разнонаправленные изменения экспрессии CD38 в нейронах и эндотелиоцитах гиппокампа, вероятно, отражают различный метаболический профиль этих клеток:

нейроны преимущественно используют митохондриальное дыхание, тогда как клетки эндотелия помимо высокой митохондриальной активности утилизируют гликолитические процессы для продукции лактата [35], обладающего, например, выраженным проангиогенным эффектом [36]. Таким образом, гликолитически активные клетки церебрального эндотелия увеличивают экспрессию CD38, тогда как нейроны с доминирующей митохондриальной активностью снижают экспрессию этого фермента в условиях развивающейся нейродегенерации. Известно, что у мышей, дефицитных по CD38, регистрируется повышение уровня НАД<sup>+</sup> во многих тканях, включая мозг [11], поэтому логично предположить, что обнаруженное нами снижение экспрессии CD38 в нейронах гиппокампа оказывается значимым регулирующим фактором для увеличения в них внутриклеточного содержания НАД<sup>+</sup>, необходимого для предотвращения последствий токсического действия Аβ. Логично предположить, что клетки церебрального эндотелия с увеличенной экспрессией CD38 демонстрируют таким образом интенсификацию своей гликолитической активности на фоне торможения митохондриального дыхания, что нуждается в дополнительной экспериментальной проверке.

## Заключение

Развитие нейродегенерации при введении Аβ в ткань гиппокампа экспериментальных животных характеризуется увеличением внутриклеточного пула НАД<sup>+</sup> и разнонаправленными изменениями экспрессии НАД<sup>+</sup>-рибозилциклазы/CD38 в клетках гиппокампа: снижением экспрессии в нейронах и увеличением экспрессии в клетках церебрального эндотелия, что соответствует их разному метаболическому профилю и необходимо для реализации стресс-ответа клеток на токсическое действие Аβ.

## Список литературы / References

1. Kurakin A., Bredesen D.E. Alzheimer's disease as a systems network disorder: chronic stress/dyshomeostasis, innate immunity, and genetics. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12 (18): 17815–17844. doi: 10.18632/aging.103883
2. Fernandez-Fernandez S., Almeida A., Bolaños J.P. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem. J.* 2012; 443 (1): 3–11. doi: 10.1042/BJ20111943
3. Kerr J.S., Adriaanse B.A., Greig N.H., Mattson M.P., Cader M.Z., Bohr V.A., Fang E.F. Mitophagy and Alzheimer's disease: cellular and molecular mechanisms. *Trends Neurosci.* 2017; 40 (3): 151–166. doi: 10.1016/j.tins.2017.01.002
4. Rose J., Brian C., Woods J., Pappa A., Panayiotidis M.I., Powers R., Franco R. Mitochondrial dysfunction in glial cells: Implications for neuronal homeostasis and survival. *Toxicology*. 2017; 391: 109–115. doi: 10.1016/j.tox.2017.06.011
5. Dong Y., Brewer G.J. Global metabolic shifts in age and alzheimer's disease mouse brains pivot at NAD<sup>+</sup>/NADH redox sites. *J. Alzheimers Dis.* 2019; 71 (1): 119–140. doi: 10.3233/JAD-190408
6. Katsyuba E., Romani M., Hofer D., Auwerx J. NAD<sup>+</sup> homeostasis in health and disease. *Nat. Metab.* 2020; 2 (1): 9–31. doi: 10.1038/s42255-019-0161-5
7. Camacho-Pereira J., Tarragó M.G., Chini C.C.S., Nin V., Escande C., Warner G.M., Puranik A.S., Schoon R.A., Reid J.M., Galina A., Chini E.N. CD38 dictates age-related NAD decline and mitochondrial dysfunction through an sirt3-dependent mechanism. *Cell Metab.* 2016; 23 (6): 1127–1139. doi: 10.1016/j.cmet.2016.05.006
8. Chini E.N. CD38 as a regulator of cellular NAD: a novel potential pharmacological target for metabolic conditions. *Curr. Pharm. Des.* 2009; 15 (1): 57–63. doi: 10.2174/138161209787185788
9. Horenstein A.L., Faini A.C., Morandi F., Bracci C., Lanza F., Giuliani N., Paulus A., Malavasi F. The circular life of human cd38: from basic science to clinics and back. *Molecules*. 2020; 25 (20): 4844. doi: 10.3390/molecules25204844
10. Салмина А.Б., Инжутова А.И., Моргун А.В., Окунева О.С., Малиновская Н.А., Лопатина О.Л., Петрова М.М., Таранушенко Т.Е., Фурсов А.А., Кувачева Н.В. НАД<sup>+</sup>-конвертирующие ферменты в клетках нейрональной и глиальной природы: CD38 как новая молекула-мишень для нейропротекции. *Вестн. РАМН*. 2019; 67 (10): 29–37. doi: 10.15690/vramn.v67i10.413
- Salmina A.B., Inzhutova A.I., Morgun A.V., Okuneva O.S., Malinovskaya N.A., Lopatina O.L., Petrova M.M., Taranushenko T.E., Fursov A.A., Kuvacheva N.V. NAD<sup>+</sup>-converting enzymes in neuronal and glial cells: CD38 as a novel target for neuroprotection. *Vestnik Rossiiskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2012; 67 (10): 29–37. [In Russian]. doi: 10.15690/vramn.v67i10.413
11. Aksoy P., White T.A., Thompson M., Chini E.N. Regulation of intracellular levels of NAD: a novel role for CD38. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 345 (4): 1386–1392. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.042
12. Deaglio S., Morra M., Mallone R., Ausiello C.M., Prager E., Garbarino G., Dianzani U., Stockinger H., Malavasi F. Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J. Immunol.* 1998; 160 (1): 395–402.
13. Higashida H., Salmina A.B., Olovyanikova R.Y., Hashii M., Yokoyama S., Koizumi K., Jin D., Liu H.X., Lopatina O., Amina S., Islam M.S., Huang J.J., Noda M. Cyclic ADP-ribose as a universal calcium signal molecule in the nervous system. *Neurochem. Int.* 2007; 51 (2-4): 192–199. doi: 10.1016/j.neuint.2007.06.023
14. Deaglio S., Mallone R., Baj G., Arnulfo A., Surico N., Dianzani U., Mehta K., Malavasi F. CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. *Chem. Immunol.* 2000; 75: 99–120.
15. Malavasi F., Deaglio S., Funaro A., Ferrero E., Horenstein A.L., Ortolan E., Vaisitti T., Aydin S. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol. Rev.* 2008; 88 (3): 841–886. doi: 10.1152/physrev.00035.2007
16. Franco L., Guida L., Bruzzone S., Zocchi E., Usai C., de Flora A. The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes. *FASEB J.* 1998; 12 (14): 1507–1520. doi: 10.1096/fasebj.12.14.1507
17. Song E.K., Rah S.Y., Lee Y.R., Yoo C.H., Kim Y.R., Yeom J.H., Park K.H., Kim J.S., Kim U.H., Han M.K. Connexin-43 hemichannels mediate cyclic ADP-ribose generation and its Ca<sup>2+</sup>-mobilizing activity by NAD<sup>+</sup>/cyclic ADP-ribose transport. *J. Biol.*



- Chem.* 2011; 286 (52): 44480–44490. doi: 10.1074/jbc.M111.307645
18. Hayakawa K., Esposito E., Wang X., Terasaki Y., Liu Y., Xing C., Ji X., Lo E.H. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*. 2016; 535 (7613): 551–555. doi: 10.1038/nature18928
  19. Guerreiro S., Privat A.L., Bressac L., Toulorge D. CD38 in neurodegeneration and neuroinflammation. *Cells*. 2020; 9 (2): 471. doi: 10.3390/cells9020471
  20. Boslett J., Hemann C., Christofi F.L., Zweier J.L. Characterization of CD38 in the major cell types of the heart: endothelial cells highly express CD38 with activation by hypoxia-reoxygenation triggering NAD(P)H depletion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2018; 314 (3): 297–309. doi: 10.1152/ajpcell.00139.2017
  21. Epelbaum S., Youssef I., Lacor P.N., Chaurand P., Duplus E., Brugg B., Duyckaerts C., Delatour B. Acute amnesic encephalopathy in amyloid- $\beta$  oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion *in vivo*. *Neurobiol. Aging*. 2015; 36 (6): 2043–2052. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.005
  22. Sipos E., Kurunczi A., Kasza A., Horvath J., Felszeghy K., Laroche S., Toldi J., Parducz A., Penke B., Penke Z. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2007; 147 (1): 28–36. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.04.011
  23. Encinas J.M., Enikolopov G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol.* 2008; 85C: 243–272. doi: 10.1016/S0091-679X(08)85011-X
  24. Zhu X.H., Lu M., Lee B.Y., Ugurbil K., Chen W. *In vivo* NAD assay reveals the intracellular NAD contents and redox state in healthy human brain and their age dependences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112 (9): 2876–2881. doi: 10.1073/pnas.1417921112
  25. Xie N., Zhang L., Gao W., Huang C., Huber P.E., Zhou X., Li C., Shen G., Zou B. NAD<sup>+</sup> metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduct. Target Ther.* 2020; 5 (1): 227. doi: 10.1038/s41392-020-00311-7
  26. Luengo A., Li Z., Gui D.Y., Sullivan L.B., Zagorulya M., Do B.T., Ferreira R., Naamati A., Ali A., Lewis C.A., Thomas C.J., Spranger S., Matheson N.J., Vander Heiden M.G. Increased demand for NAD<sup>+</sup> relative to ATP drives aerobic glycolysis. *Mol. Cell*. 2021; 81 (4): 691–707. doi: 10.1016/j.molcel.2020.12.012
  27. Braidly N., Berg J., Clement J., Khorshidi F., Poljak A., Jayasena T., Grant R., Sachdev P. Role of nicotinamide adenine dinucleotide and related precursors as therapeutic targets for age-related degenerative diseases: rationale, biochemistry, pharmacokinetics, and outcomes. *Antioxid. Redox Signal.* 2019; 30 (2): 251–294. doi: 10.1089/ars.2017.7269
  28. Mills K.F., Yoshida S., Stein L.R., Grozio A., Kubota S., Sasaki Y., Redpath P., Migaud M.E., Apte R.S., Uchida K., Yoshino J., Imai S.I. Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice. *Cell Metab.* 2016; 24 (6): 795–806. doi: 10.1016/j.cmet.2016.09.013
  29. Wang X., Hu X., Yang Y., Takata T., Sakurai T. Nicotinamide mononucleotide protects against  $\beta$ -amyloid oligomer-induced cognitive impairment and neuronal death. *Brain Res.* 2016; 1643: 1–9. doi: 10.1016/j.brainres.2016.04.060
  30. Gerasimenko M., Cherepanov S.M., Furuhashi K., Lopatina O., Salmina A.B., Shabalova A.A., Tsuji C., Yokoyama S., Ishihara K., Brenner C., Higashida H. Nicotinamide riboside supplementation corrects deficits in oxytocin, sociability and anxiety of CD157 mutants in a mouse model of autism spectrum disorder. *Sci. Rep.* 2020; 10 (1): 10035. doi: 10.1038/s41598-019-57236-7
  31. Choi J.E., Mostoslavsky R. Sirtuins, metabolism, and DNA repair. *Curr. Opin Genet. Dev.* 2014; 26: 24–32. doi: 10.1016/j.gde.2014.05.005
  32. Bruzzone S., Guida L., Zocchi E., Franco L., de Flora A. Connexin 43 hemi channels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> fluxes in intact cells. *FASEB J.* 2001; 15 (1): 10–12. doi: 10.1096/fj.00-0566fje
  33. Clement J., Wong M., Poljak A., Sachdev P., Braidly N. The plasma NAD<sup>+</sup> metabolome is dysregulated in «normal» aging. *Rejuvenation Res.* 2019; 22 (2): 121–130. doi: 10.1089/rej.2018.2077
  34. Billington R.A., Travelli C., Ercolano E., Galli U., Roman C.B., Grolla A.A., Canonico P.L., Condorelli F., Genazzani A.A. Characterization of NAD uptake in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 (10): 6367–6374. doi: 10.1074/jbc.M706204200
  35. Leung S.W.S., Shi Y. The glycolytic process in endothelial cells and its implications. *Acta Pharmacol. Sin.* 2021. doi: 10.1038/s41401-021-00647-y
  36. Salmina A.B., Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Komleva Y.K., Pozhilenkova E.A., Lopatina O.L., Gorina Y.V., Taranushenko T.E., Petrova L.L. Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015; 64: 174–184. doi: 10.1016/j.biocel.2015.04.005

**Сведения об авторах:**

**Алина Асатовна Семёнова**, к.б.н., ORCID: 0000-0002-2682-8979, e-mail: alina\_shamsutdin@mail.ru

**Яна Валерьевна Горина**, к.фарм.н., ORCID: 0000-0002-3341-1557, e-mail: yana\_20@bk.ru

**Елена Дмитриевна Хилажева**, ORCID: 0000-0002-9718-1260, e-mail: elena.hilazheva@mail.ru

**Екатерина Викторовна Харитонова**, к.фарм.н., ORCID: 0000-0002-1359-9249,

e-mail: ekaterinav1201@gmail.com

**Алла Борисовна Салмина**, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0003-4012-6348, e-mail: allasalmina@mail.ru

**Information about the authors:**

**Alina A. Semenova**, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-2682-8979,

e-mail: alina\_shamsutdin@mail.ru

**Yana V. Gorina**, candidate of pharmaceutical sciences, ORCID: 0000-0002-3341-1557, e-mail: yana\_20@bk.ru

**Elena D. Khilazheva**, ORCID: 0000-0002-9718-1260, e-mail: elena.hilazheva@mail.ru

**Ekaterina V. Kharitonova**, candidate of pharmaceutical sciences, ORCID: 0000-0002-1359-9249,

e-mail: ekaterinav1201@gmail.com

**Alla B. Salmina**, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0003-4012-6348, e-mail: allasalmina@mail.ru

*Поступила в редакцию 17.06.2021*

*После доработки 07.08.2021*

*Принята к публикации 27.08.2021*

*Received 17.06.2021*

*Revision received 07.08.2021*

*Accepted 27.08.2021*