

На правах рукописи

ИВАНОВА АННА ЕВГЕНЬЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ
НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ АСТРОЦИТОВ**

03.03.01 - Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в научно-исследовательской лаборатории электрофизиологии научно-исследовательского института трансляционной медицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Горбачева Любовь Руфэлевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Степаничев Михаил Юрьевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, лаборатория функциональной биохимии нервной системы, ведущий научный сотрудник

доктор биологических наук

Силачѐв Денис Николаевич

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, отдел функциональной биохимии биополимеров, лаборатория биохимии двигательных систем, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «_____»_____ 2022 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.05 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1 и на сайте <http://www.rsmu.ru/>.

Автореферат разослан «_____»_____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук, доцент



Кузнецова Татьяна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Ишемия в центральной нервной системе (ЦНС) сопровождается гибелью нейронов и появлением во внеклеточном пространстве разнообразных провоспалительных молекул, воздействующих на окружающие клетки и вызывающих пост-ишемическое воспаление. Астроциты, ключевой компонент нейроглии, обеспечивают функционирование нервной системы в норме. При патологических состояниях астроциты активируются, этот процесс получил название реактивный астроглиоз {Sofroniew, 2014}{Verkhatsky, 2018}. Реактивный астроглиоз сопровождается функциональными изменениями астроцитов и может приводить к формированию глиального рубца, замещающего нервную ткань и препятствующему восстановлению функционирования повреждённого участка мозга {Adams, 2018}. В связи с этим, изучение влияния как самого ишемического воздействия, так и спектра провоспалительных молекул, появляющихся в области ишемии, на состояние астроглии могло бы способствовать поиску путей направленной модуляции патологической активации астроцитов для минимизации негативных последствий инсультов и восстановления здоровья пациентов. Тромбин, сериновая протеаза гемостаза, может выступать регулятором активации астроцитов, поскольку появляется в мозге при различных патологиях ЦНС, сопровождающихся повреждением гематоэнцефалического барьера, в том числе и при инсультах {Nicole, 2005}{Sokolova, 2008}{Rajput, 2020}. Рецепторы тромбина детектированы на нейронах и астроцитах, что указывает на возможность регуляции тромбином функций клеток мозга {Striggow, 2000}{Striggow, 2001}{Wang, 2002}. Массированная гибель клеток при инсульте сопровождается выбросом во внеклеточное пространство другой регуляторной молекулы – аденозинтрифосфата (АТФ) {Melani, 2005}{Dale, 2009}{Rodrigues, 2015}. АТФ в высоких концентрациях выступает в качестве эндогенного образа опасности, запускающего процессы воспаления {Di Virgilio, 2020}. Рецепторы пуриnergической системы сигнализации обнаружены на нейронах и глиальных клетках {Fischer, 2009}{Del Puerto, 2013}. При различного рода инвазиях, например, на фоне травмы головного мозга в нервной ткани может появляться липополисахарид (ЛПС), компонент бактериальной стенки {Pålsson-McDermott, 2004}. Липополисахарид запускает воспаление через активацию Toll-подобных рецепторов 4-ого типа (TLR4), которые также обнаружены на мембране астроцитов {Li, 2021}. Показано, что экспрессия TLR4 возрастает на фоне ишемии и усиливает повреждение ткани {Jiang, 2021}.

В данной работе мы исследовали эффекты депривации кислорода и глюкозы (модель ишемии *in vitro*), а также оценили влияние тромбина, АТФ и ЛПС на состояние астроцитов в культуре.

Цель работы - исследовать особенности влияния провоспалительных факторов на астроциты в культуре.

Задачи:

- 1) Изучить влияние депривации кислорода и глюкозы на выживаемость астроцитов крысы и состояние актинового цитоскелета.
- 2) Оценить влияние тромбина на выживаемость, состояние актинового цитоскелета и секреторную активность астроцитов.
- 3) Исследовать участие пуриnergических рецепторов в регуляции выживаемости и провоспалительной секреции астроцитов крысы на фоне действия АТФ.
- 4) Изучить влияние липополисахарида на выживаемость и секрецию провоспалительных факторов астроцитами крысы.
- 5) Оценить активацию транскрипционного фактора NF-κB, экспрессию белков-регуляторов апоптоза в астроцитах крысы в условиях стимуляции тромбином, АТФ и ЛПС.

Научная новизна. В работе комплексно охарактеризовано влияние провоспалительных факторов, ассоциированных с ишемией головного мозга, на функционально-морфологические параметры астроцитов в культуре. Впервые показано, что тромбин в высоких концентрациях стимулирует формирование пустых полей в монослое первичной культуры астроцитов и индуцирует синтез и секрецию оксида азота (NO), секрецию интерлейкина-6 (IL-6) и активацию NF-κB-пути в астроцитах кортекса крысы. Впервые обнаружено, что нативные астроциты кортекса крысы под воздействием бензоил-АТФ, стабильного аналога АТФ, продуцируют NO с вовлечением индуцибельной NO-синтазы. Впервые показано, что индукция синтеза NO, секреция цитокинов IL-6 и TNF-α в астроцитах кортекса крысы, обработанных бензоил-АТФ, обусловлена активацией пуриnergических рецепторов 2-ого типа, отличных от P2X7, и может усиливаться на фоне применения специфических ингибиторов P2X7.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты расширяют современные фундаментальные представления об особенностях функционирования астроцитов в условиях воздействия разных провоспалительных факторов, ассоциированных с ишемией, что в перспективе может обеспечить эффективный поиск и разработку цитопротекторов и модуляторов состояния астроцитов при патологиях с целью минимизации осложнений и реабилитации пациентов с поражениями мозга. Обнаруженное в настоящей работе усиление синтеза NO стимулированными астроцитами на фоне селективной блокады P2X7 следует принимать во внимание при разработке и испытаниях ингибиторов P2X7 в терапевтических целях.

Положения, выносимые на защиту

1. Характер влияния депривации кислорода и глюкозы на культивируемые астроциты крысы зависит от времени. Острый период характеризуется гибелью астроцитов, а в отставленный период после воздействия наблюдается пролиферация, что является одним из признаков астроглиоза, который запускается ишемией.

2. Влияние тромбина определяется его концентрацией. В высоких концентрациях протеаза обладает провоспалительным действием на культивируемые астроциты крысы, индуцируя как морфологические, так и функциональные изменения в клетках. Тромбин стимулирует секрецию/экспрессию провоспалительных и апоптотических факторов, что свидетельствует о возможности вовлечения сериновой протеазы в развитие воспаления и апоптотической гибели астроцитов при ишемии мозга.

3. Разные типы пуринергических рецепторов, экспрессируемые в астроцитах, определяют спектр токсического действия АТФ на культивируемые первичные астроциты крысы.

4. Липополисахарид оказывает выраженное провоспалительное активирующее действие на астроциты, индуцируя пролиферацию, секрецию NO и IL-6, и ведет к апоптозу. Данные эффекты ЛПС наблюдаются при нарастании концентрации эндотоксина в среде культивирования астроцитов.

Личный вклад автора. Вся экспериментальная часть работы в полном объеме выполнена автором лично. Автор принимал личное участие в формулировании и постановке задач и протоколов проведения экспериментов, анализе полученных результатов и подготовке на их основе публикаций. Все разделы диссертационной работы написаны лично автором.

Методология и методы исследования. В работе использованы разнообразные современные методы и подходы, применяемые в молекулярной и клеточной биологии. Исследования проводили на первичной культуре астроцитов грызунов, что является стандартным широко используемым в отечественных и международных научных исследованиях подходом при изучении нормальной физиологии/патофизиологии клеток нейроглии. С целью моделирования основных патологических факторов ишемии астроциты подвергали депривации кислорода и глюкозы, а также инкубировали с изолированными повреждающими факторами с последующим анализом выживаемости, морфологических параметров, секреции и экспрессии ключевых молекул воспаления культивируемыми астроцитами.

Степень достоверности. Выводы и положения, выносимые на защиту, основаны на статистически значимых данных. Статистический анализ проводили в GraphPad Prism 5 и 6 (GraphPad Software Inc., США). Все эксперименты были выполнены минимум в 3-х независимых биологических повторах. Все эксперименты были выполнены минимум в 3-х независимых биологических повторах. В качестве независимого биологического повтора

принимали результаты, полученные при анализе параметров астроцитов в культурах, выделенных из мозга новорожденных крысят в ходе одного процесса посадки клеток по стандартному протоколу.

Апробация результатов работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» 2013, 2019, 2021 гг., Пущино, Россия; молодёжной конференции «Ломоносов 2013», Москва, Россия; на конгрессах ISTH 2013 г., Амстердам, Нидерланды, и ISTH 2021 г., Филадельфия, США; на симпозиуме Brain (XXVIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function and XIth International Conference on Quantification of Brain Function with PET) 2013 г., Шанхай, Китай; на 21м конгрессе по фибринолизу и протеолизу (The 21st International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis), 2012 г., Брайтон, Великобритания; на конгрессе EFNS 2012 г., Стокгольм, Швеция.

Основные положения диссертационной работы отражены в 14 публикациях, среди которых 5 статей в научных журналах (входят в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ, индексируются в WoS и/или Scopus) и 9 тезисов в сборниках материалов научных конференций.

Результаты диссертационной работы используются при чтении спецкурса «Особенности физиологии ЦНС в пре- и постнатальный периоды развития организма», при проведении большого практикума «Практическая физиология ЦНС» и в исследовательской деятельности научной группы по изучению механизмов регуляции процессов нейропротекции, нейрорепарации и воспаления регуляторными пептидами и протеазами, входящей в состав лаборатории общей физиологии и регуляторных пептидов кафедры физиологии человека и животных биологического факультета ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова, и внедрены в научно-практическую деятельность научно-исследовательской лаборатории электрофизиологии НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Апробация результатов диссертационной работы была проведена на заседании кафедры физиологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 03.03.01 – Физиология.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 171 странице, из которых 43 страницы занимает список литературы, включающий 381 источник. Диссертация состоит из введения, четырёх глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение), заключения и списка литературы. Диссертация проиллюстрирована 34 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичная культура астроцитов. Астроциты выделяли из мозга новорожденных крысят линии Wistar, мышат линии C57BL/6 согласно протоколу, описанному в {Иванова, 2013}.

Внесение веществ. На 14-й день *in vitro* астроциты переводили в среду с 2% FBS и вносили одно из исследуемых веществ: бензоил-АТФ (мкМ), тромбин (нМ), ЛПС (мкг/мл). Если использовали ингибиторы (мкМ), то их добавляли первыми, через час вносили основное вещество.

Кислородно-глюкозная депривация. Депривация кислорода и глюкозы (КГД) широко используется в качестве модели ишемии *in vitro* {Tasca, 2015}. Астроциты переводили в среду без глюкозы и инкубировали 5 ч в условиях гипоксии (5% O₂, 5% CO₂) при 37 °С, после чего возвращали в стандартные условия (глюкоза 4,5 г/л, 21% O₂ и 5% CO₂).

Измерение выживаемости/пролиферации клеток. Восстановление реагентов МТТ/WST-1 митохондриями клеток до поглощающих в видимой области спектра формазанов позволяет колориметрически оценить выживаемость/пролиферацию клеток. МТТ/WST-1 вносили к астроцитам и инкубировали 1 ч при 37 °С, 5% CO₂. Далее в случае МТТ клетки с формазанами растворяли в DMSO и измеряли оптическую плотность на микроплетридере iMark (BioRad, США) при 570 нм. В случае WST-1 анализировали оптическую плотность культуральной среды при 450 нм.

Оценка уровня некроза астроцитов по высвобождению лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Измерение уровня ЛДГ в культуральной среде астроцитов проводили при помощи набора CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США) согласно протоколу производителя.

Измерение относительного содержания оксида азота. Для измерения содержания нитритов/нитратов, продуктов окисления NO, в культуральной среде использовали реактив Грисса (Sigma, США), который, взаимодействуя с нитритами, образует окрашенные диазосоединения {Bryan, 2007}. Реактив Грисса (Sigma, США) вносили в лунки 96-луночных ИФА планшетов в количестве 50 мкл и затем добавляли по 50 мкл среды от астроцитов. Оптическую плотность измеряли при 530 нм на микроплетридере iMark (BioRad, США).

Анализ уровней экспрессии iNOS методом ПЦР в реальном времени. Астроциты лизировали раствором RLT (Qiagen, США), для очистки РНК использовали набор CleanRNA Standard (Евроген, Россия) и фермент ДНКазу (ThermoFisher, США). Синтез комплементарной цепи кДНК проводили при помощи набора MMLV RT (Евроген, Россия). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали премикс 5x qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Последовательности праймеров: β-актин прямой 5'-TCATCACTATCGGCAATGAGCGGT-3', обратный 5'ACAGCACTGTGTTGGCATAGAGGT3'; iNOS прямой 5'-

ССАСААТАGТАСААТАСТАСТTGG-3', обратный 5'-ACGAGGTGTTTCAGCGTGCTCCACG-3'. Для контроля специфичности реакций снимали кривую плавления, продукты ПЦР визуализовали в агарозном геле. Анализ изменений уровней экспрессии генов проводили при помощи порогового метода анализа накопления ДНК (Ct).

Иммуноферментный анализ содержания цитокинов IL-6, TNF- α . Астроциты инкубировали с веществами в течение 6 часов, после чего среду собирали. Содержание цитокинов в среде определяли при помощи наборов для ИФА Rat IL-6 Quantikine ELISA Kit (R6000B, R&D, США) и Rat TNF- α ELISA kit (CSB-E11987r, Cusabio, США) согласно протоколам производителей. Значения уровней цитокинов нормировали на значения концентрации белка для каждой пробы.

Вестерн-блоттинг. Клетки лизировали в буфере с Mg²⁺ (Sigma, США) с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (Calbiochem, США). Образцы смешивали с буфером Лэммли с β -меркаптоэтанолом, кипятили при 95 °C и наносили в карманы геля. Электрофорез белков проводили в ПААГ при 80/120В. Белки переносили на PVDF, либо на нитроцеллюлозную мембрану. Мембраны инкубировали с антителами в 5% молоке: анти-Bax (C-2, Santa-Cruz, США), анти-Bcl2 (P-19, Santa-Cruz, США), анти-p65 (D14E12, CST, США), анти-фосфор65 Ser536 (93H1, CST, США), анти-HSP90 (StressMarq, США), анти-GAPDH (Abcam, США), вторичные антитела-HRP (Имтек, Россия). Денситометрию полос проводили в программе ImageJ (НИН, США).

Иммуноцитохимическое окрашивание. Для иммуноцитохимического окрашивания использовали следующие антитела: анти-S100B (Dako, Германия), анти-GFAP (Sigma, США), анти-Iba1 (Abcam, Великобритания), вторичные антитела AlexaFluor (Thermo Scientific, США), ДНК-тропный краситель Syto-59 (Sigma, США) и токсин фаллоидин (Thermo Scientific, США). В работе использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 510 (Carl Zeiss, Германия). С каждого стекла снимали не менее 5 произвольно выбранных полей. Стёкла дублировали для каждой группы. Микрофотографии анализировали в ImageJ (НИН, США).

Статистический анализ. Статистический анализ данных проводили в программе GraphPad Prism 5 и 6 (GraphPad Software Inc., США). Для анализа использовали непараметрическую статистику (Kruskal-Wallis test, Mann-Witney test), в случае нормального распределения выборок использовали one-way ANOVA. Нормальность проверяли при помощи Shapiro-Wilk test. В качестве апостериорных тестов применяли post hoc Dunn's test и post-hoc Dunnett's test. Все эксперименты были выполнены минимум в 3-х независимых биологических повторях, n-число независимых экспериментов. В качестве независимого биологического повтора принимали результаты с одной посадки клеток. Данные представлены в виде среднего \pm

ошибка среднего арифметического (SEM). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1.1. Эффекты ишемии/реперфузии на культивируемые астроциты крысы

1.1.1. Влияние ишемии/реперфузии на выживаемость астроцитов крысы и высвобождение ЛДГ

Для анализа влияния депривации глюкозы и кислорода на выживаемость астроцитов мы использовали несколько экспериментальных групп: контрольная группа (нормоксия + глюкоза), группа без глюкозы в условиях нормоксии (депривация глюкозы, ГД), группа с глюкозой в условиях гипоксии (депривация кислорода, КД) и группа, лишённая глюкозы в условиях гипоксии (кислород-глюкозная депривация, КГД). Астроциты подвергали депривации в течение 5 часов (0 г/мл глюкоза и/или гипоксия 5% O_2), после чего реперфузировали, то есть возвращали в нормальные условия (4,5 г/л глюкоза и/или нормоксия 21% O_2). Сразу после 5-ти часовой ишемии мы детектировали выброс ЛДГ в группах КГ и КГД, что указывает на гибель клеток путём некроза (рис.1А). Через 12 ч после начала реперфузии выживаемость астроцитов в группах КД и КГД оказалась ниже на 20% и 17% по сравнению с контролем (рис.1Б). Через 24 ч в группах КД и КГД наблюдалось, напротив, повышение пролиферации астроцитов относительно контрольных значений (рис.1Б). Типичная культура, используемая в исследованиях, содержала не менее 90% астроцитов и представлена на рисунке 1В.

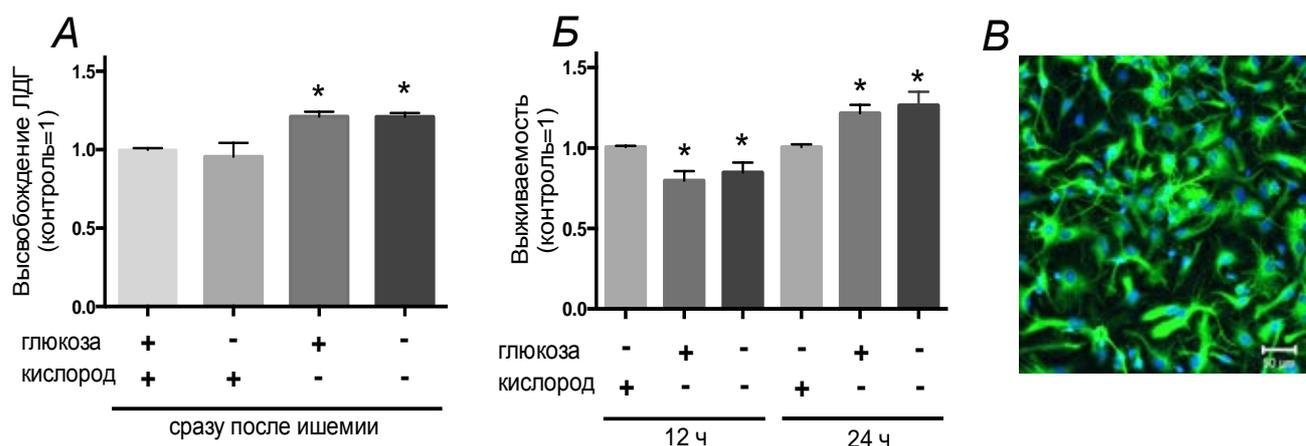


Рисунок 1. Влияние депривации кислорода и глюкозы на уровень ЛДГ после 5-ти часов ишемии (А) и на выживаемость астроцитов через 12 и 24 часа после начала реперфузии (Б). В - иммунофлуоресцентное окрашивание типичной культуры астроцитов, используемой в работе, анти-GFAP (зелёная флуоресценция, маркер астроцитов), анти-Iba1 (маркер микроглии, здесь отсутствует) и Syto-59 (синяя флуоресценция, ядра). Данные отображены в виде среднего \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0.05$ относительно контрольной группы, Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

1.1.2. Депривация кислорода и глюкозы стимулирует перестройку актинового цитоскелета астроцитов

Повышение пролиферации астроцитов через 24 ч после ишемии может свидетельствовать об активации астроглии. Известно, что астроциты при активации претерпевают морфологические изменения, например, реорганизацию актинового цитоскелета, сопровождающуюся появлением выраженных пучков F-актина, называемых стресс-фибриллами {Wilson, 2016}. В связи с этим, мы проверили влияние КГД на перестройку актинового цитоскелета астроцитов. Актиновый цитоскелет визуализировали под конфокальным микроскопом с использованием флуоресцентно-меченого фаллоидина (маркер F-актина). Интенсивность флуоресценции анализировали в ImageJ. Было обнаружено, что КГД вызывает перестройку актинового цитоскелета астроцитов через 24 ч после начала реперфузии. Флуоресценция фаллоидина, нормализованная к числу клеток, оказалась в 2,5 раза выше в группе КГД по сравнению с контрольной группой (рис. 2А,Б).

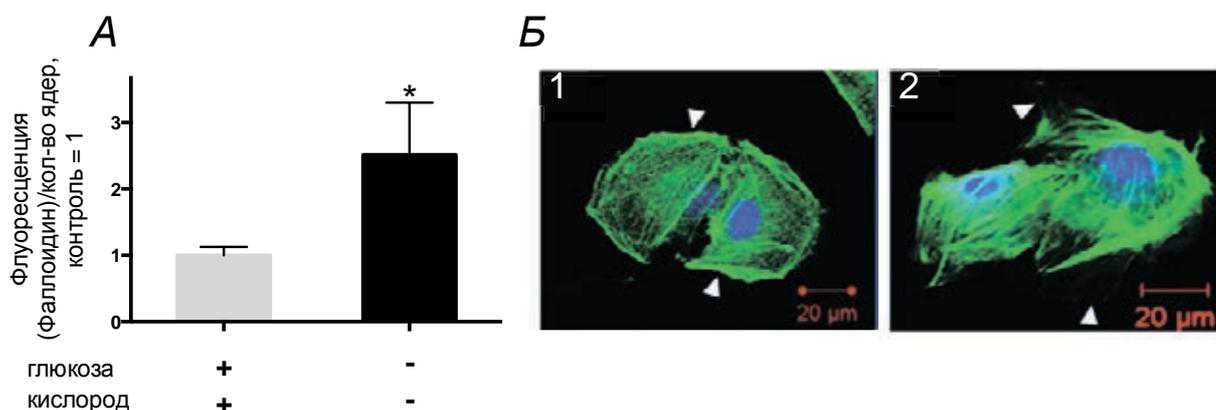


Рисунок 2. Депривация глюкозы и кислорода влияет на актиновый цитоскелет астроцитов крысы. А - флуоресценция фаллоидина, специфически окрашивающего F-актин, в астроцитах в норме и в условиях КГД. Б - микрофотографии актинового цитоскелета (зелёная флуоресценция) в норме (1) и при КГД (2). Белыми треугольниками обозначены границы клетки. Ядра окрашены Syto-59 (синяя флуоресценция). Данные отображены в виде среднего \pm SEM (n=3). *p < 0.05 относительно контрольной группы, Mann-Whitney test.

Таким образом, астроциты крысы наиболее чувствительны к депривации кислорода и к депривации кислород + глюкоза. Депривация глюкозы в условиях нормоксии не оказывала значимого эффекта на выживаемость клеток и уровень некроза, что вероятно объясняется тем фактом, что астроциты в мозге служат основным депо гликогена. Депривация кислорода и глюкозы влияет на морфологию астроцитов, вызывая перестройку актинового цитоскелета, что может свидетельствовать о мобилизации клеток в условиях ишемии и их активации.

1.2. Провоспалительные эффекты тромбина на культивируемые астроциты грызунов

1.2.1. Дозозависимое влияние тромбина на выживаемость астроцитов грызунов и синтез оксида азота

Для определения эффектов тромбина на астроглию клетки инкубировали с тромбином 10-100 нМ в среде с низкой сывороткой. Через 48 ч производили оценку выживаемости астроцитов методом MTT/WST-1. Было обнаружено, что тромбин дозозависимо повышает пролиферацию астроцитов крысы (рис.3А). Мы использовали первичные культуры астроцитов мышей, чтобы проверить универсальность митогенного эффекта тромбина на астроциты, и обнаружили, что тромбин не влияет на выживаемость астроцитов мыши.

Смена секреторного профиля клеток на провоспалительный является характерной чертой активированной астроглии. Известно, что астроциты способны секретировать плеяду провоспалительных факторов {Sofroniew, 2010}{Pekny, 2016}. Мы решили исследовать провоспалительный статус астроцитов на фоне тромбина, оценив уровень секреции оксида азота (NO). Оксид азота - сигнальная молекула, выступающая в качестве медиатора воспаления при патологических состояниях организма, сопровождающихся гиперпродукцией NO {Sharma, 2007}. Оксид азота нестабилен, быстро окисляется до более стабильных нитритов/нитратов, измерение уровня которых позволяет судить о продукции NO клетками {Bryan, 2007}. Астроциты инкубировали с тромбином 24 ч, после чего определяли содержание нитритов в культуральной среде клеток при помощи реактива Грисса. Оказалось, что тромбин в концентрации 100 нМ стимулирует повышение уровня нитритов в культуральной среде астроцитов (рис.3Б). Тромбин 10 нМ не влиял на уровень нитритов (рис.3Б).

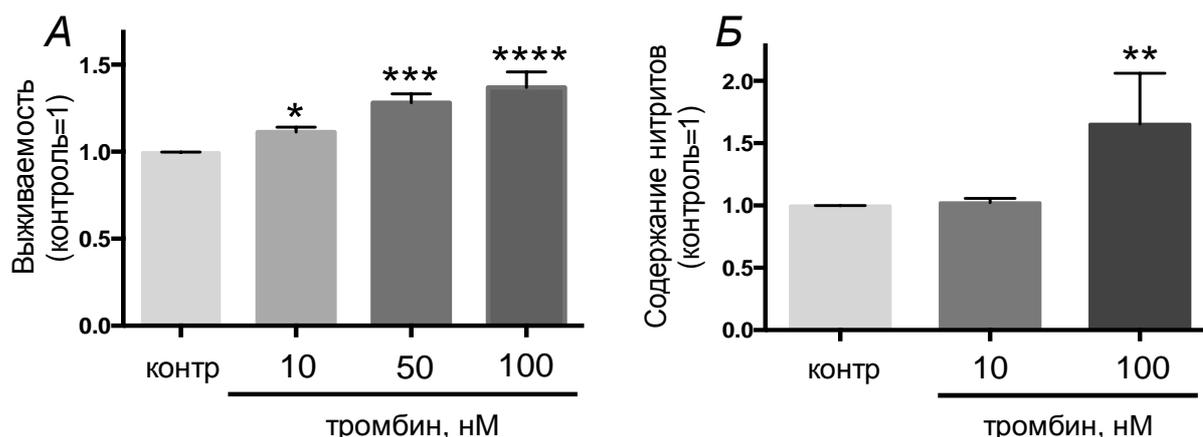


Рисунок 3. Влияние тромбина на выживаемость астроцитов крысы и синтез NO. А – тромбин стимулирует пролиферацию астроцитов крысы ($n \geq 8$). Б – тромбин вызывает синтез NO астроцитами крысы ($n \geq 5$). Данные отображены в виде среднего \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ относительно контрольной группы, one-way ANOVA post-hoc Dunnett's test (А), Kruskal-Wallis test post hoc Dunn's test (Б).

1.2.2. Влияние тромбина на экспрессию белка S100B, перестройку актинового цитоскелета и образование пустых полей в культуре астроцитов крысы

Далее мы исследовали воздействие тромбина на морфологию астроцитов при помощи конфокальной микроскопии. Мы оценили состояние актинового цитоскелета клеток через 24 ч инкубации с тромбином. Актиновый цитоскелет окрашивали флуоресцентно-меченым фаллоидином (маркер F-актина). Оказалось, что тромбин в концентрациях 100 и 1000 нМ стимулирует образование стресс-фибрилл F-актина в астроцитах (рис.4А,Б). Интенсивность флуоресценции фаллоидина в клетках (флуоресценция фаллоидина/кол-во ядер) возрастала в 1,67 и 2,52 раза на фоне тромбина 100 нМ и 1000 нМ по сравнению с контрольными значениями.

Повреждение ЦНС может сопровождаться повышением уровня экспрессии белка S100B астроглией {Shirakawa, 2010}. S100B относится к группе кальций-связывающих белков, регулирует процессы пролиферации и дифференцировки клеток, а также стабилизирует актиновый цитоскелет. Подавление его экспрессии в астроцитах приводит к разборке стресс-фибрилл, уменьшению подвижности клеток, что указывает на участие S100B в регуляции морфологии астроцитов {Brozzi, 2009}. В связи с этим, мы исследовали уровень S100B в астроцитах через 24 ч инкубации с тромбином с помощью иммуноцитохимического окрашивания антителами к S100B. Оказалось, что интенсивность флуоресценции S100B (флуоресценция антител к S100B/кол-во ядер) в астроцитах крысы возрастала в 1,5 раза, 1,8 раза и в 2 раза на фоне тромбина 10, 100 и 1000 нМ, соответственно, по сравнению с контролем (рис.4В,Г).

В исследовании Niego с соавт. было показано, что тромбин вызывает формирование пустых полей (зон, свободных от клеток) в смешанной культуре астроцитов и нейронов гиппокампа, что было связано с изменением морфологии клеток и, возможно, с миграцией {Niego, 2011}. Мы решили проверить влияние тромбина на образование пустых полей в монослое астроцитов кортекса крысы. Астроциты инкубировали с тромбином 24 ч, после чего окрашивали на GFAP (маркер астроцитов). Интенсивность образования пустых полей оценивали как отношение суммарной площади зон, свободных от клеток, на снимке к общей площади снимка. Было обнаружено, что доля пустых полей возрастала в 15 и 16 раз на фоне тромбина 100 и 1000 нМ по сравнению с контролем (рис.4Д,Е).

Таким образом, в результате комплексной оценки состояния астроцитов установлено, что тромбин оказывает активирующее влияние на астроглию крысы, начиная с концентрации 10 нМ, но наиболее эффективно в концентрациях 100 нМ и выше. Тромбин стимулирует пролиферацию астроцитов и синтез NO, влияет на морфологию клеток, повышая экспрессию S100B и изменяя состояние цитоскелета. Тромбин вызывает образование пустых полей в

монослое астроцитов. Подобные эффекты тромбина в отношении астроглии описаны в литературе, однако в нашем исследовании впервые проанализировано действие протеазы в широком концентрационном диапазоне. Кроме того, мы впервые обнаружили стимулирующее действие тромбина в высокой концентрации (в физиологическом диапазоне) на синтез NO астроцитами крысы.

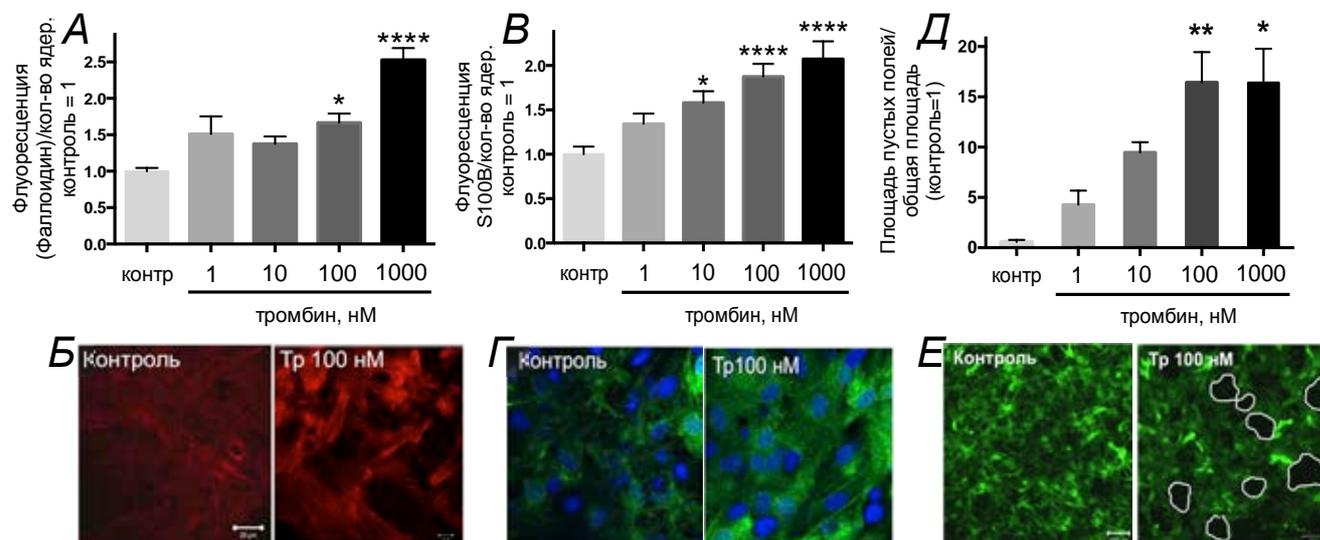


Рисунок 4. Тромбин дозозависимо влияет на перестройку актинового цитоскелета, экспрессию белка S100B и образование пустых полей в культуре астроцитов крысы. А – флуоресценция фаллоидина (маркер F-актина) в астроцитах на фоне различных концентраций тромбина (нМ). Б – микрофотографии актинового цитоскелета (красная флуоресценция) в контроле и на фоне тромбина 100 нМ (Тр). В – флуоресценция антител к S100B в астроцитах, обработанных тромбином. Г – микрофотографии клеток, окрашенных анти-S100B (зеленая флуоресценция) в контроле и на фоне тромбина 100 нМ (Тр), ядра окрашены Syto-59 (синяя флуоресценция). Д – флуоресценция антител к GFAP (маркер астроцитов) в клетках на фоне тромбина. Е – микрофотографии астроцитов, окрашенных анти-GFAP (зеленая флуоресценция) в контроле и на фоне тромбина 100 нМ (Тр). Пустые поля отмечены белым контуром. Данные отображены в виде среднего \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ относительно контрольной группы, Kruskal-Wallis test post hoc Dunn's test.

1.3. Влияние АТФ на активацию астроцитов крысы

1.3.1. Бензоил-АТФ вызывает гибель астроцитов крысы, опосредованную активацией рецепторов P2X7

Повреждения ЦНС приводят к локальному многократному повышению концентрации АТФ в межклеточном пространстве (мкМ и мМ) {Di Virgilio, 2020}. АТФ в высоких концентрациях 0,1-1 мМ активирует особый ионотропный рецептор P2X7, являющийся одним из ключевых драйверов воспаления в ЦНС {Rodrigues, 2015}. Мы исследовали влияние 2',3'-О-(бензоил-4-бензоил)-АТФ (бензоил-АТФ), стабильного аналога АТФ и активного агониста P2X7, на ряд параметров культуры астроцитов крысы. Астроциты инкубировали с бензоил-АТФ в течение 48 ч, после чего оценивали выживаемость. Оказалось, что бензоил-АТФ в концентрациях 300 мкМ и 500 мкМ вызывает значимую гибель клеток (рис.5А). Неселективный ингибитор рецепторов

P2, PPADS, блокировал токсический эффект бензоил-АТФ (рис.5Б). Использование специфических антагонистов P2X7, A438079 и BBG, ингибировало гибель клеток на фоне бензоил-АТФ (рис.5В,Г), что доказывает вовлечение рецепторов P2X7 в бензоил-АТФ-зависимую гибель астроцитов крысы.

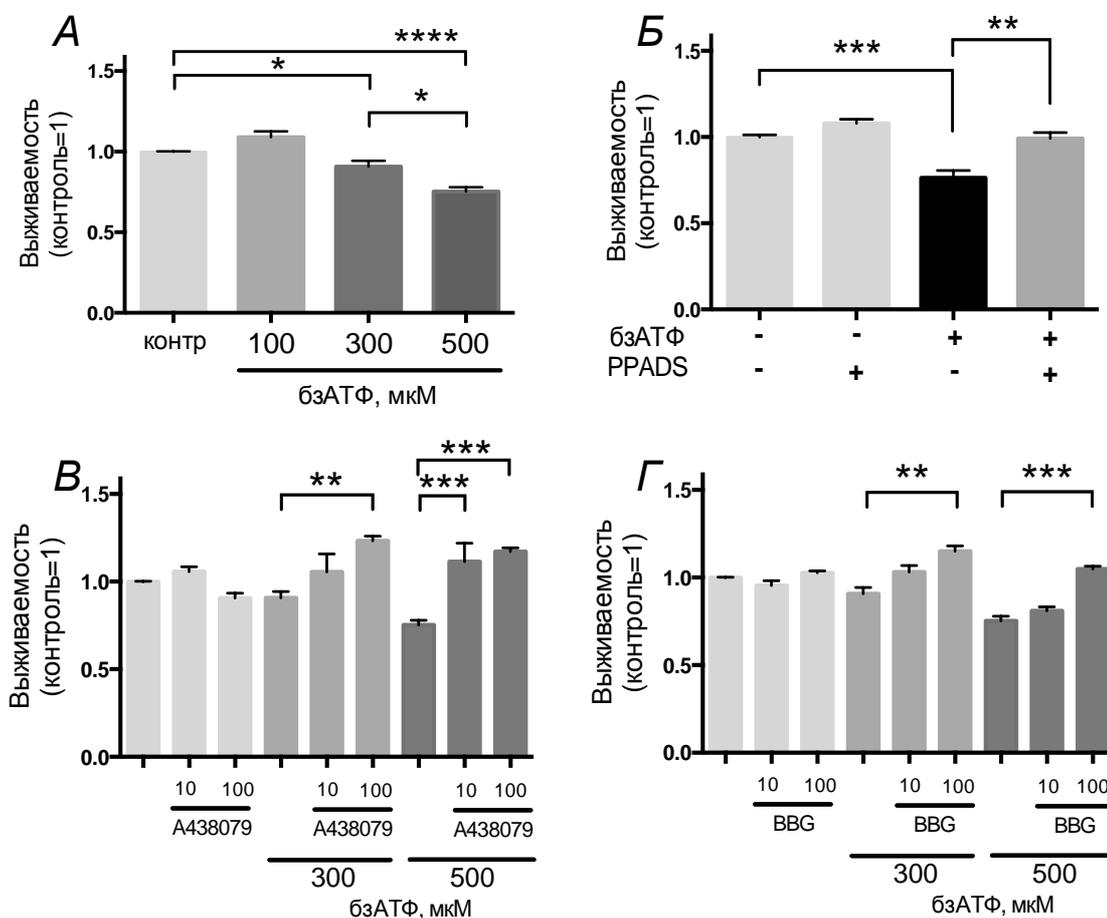


Рисунок 5. Бензоил-АТФ вызывает гибель астроцитов через активацию рецепторов P2X7.

А - выживаемость астроцитов крысы на фоне обработки бензоил-АТФ, мкМ ($n \geq 7$). **Б** – выживаемость астроцитов на фоне ингибитора рецепторов P2 (PPADS, 100 мкМ) и бензоил-АТФ 500 мкМ ($n \geq 3$). **В** - выживаемость астроцитов на фоне ингибитора рецепторов P2X7 (A438079, 10 и 100 мкМ) и бензоил-АТФ 300 и 500 мкМ ($n \geq 3$). **Г** - выживаемость астроцитов на фоне ингибитора рецепторов P2X7 (BBG, 10 и 100 мкМ) и бензоил-АТФ 300 и 500 мкМ ($n \geq 3$). Данные представлены в виде среднего \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA post-hoc Dunnett's test (A), Kruskal-Wallis test post hoc Dunn's test (Б,В,Г).

1.3.2. Бензоил-АТФ стимулирует синтез NO астроцитами крысы через активацию рецепторов P2, отличных от P2X7

Мы исследовали влияние бензоил-АТФ на продукцию NO астроцитами. Было обнаружено, что бензоил-АТФ стимулирует синтез NO астроцитами крысы через 24 ч инкубации (рис.6А,Б). Исследование накопления нитритов в культуральной среде во времени показало, что уже через 12 ч после воздействия бензоил-АТФ 500 мкМ наблюдается пик содержания нитросоединений в среде. Использование антагонистов P2X7, A438079 и BBG, не только не блокировало синтез

NO клетками на фоне бензоил-АТФ, но наоборот потенциировало (рис.6В,Г,Д,Е). Предобработка клеток ингибитором рецепторов P2, PPADS, препятствовала выработке NO при воздействии бензоил-АТФ 500 мкМ (рис.6Ж,З). Из этого следует, что бензоил-АТФ-зависимая продукция NO астроцитами опосредуется активацией рецепторов P2, отличных от P2X7.

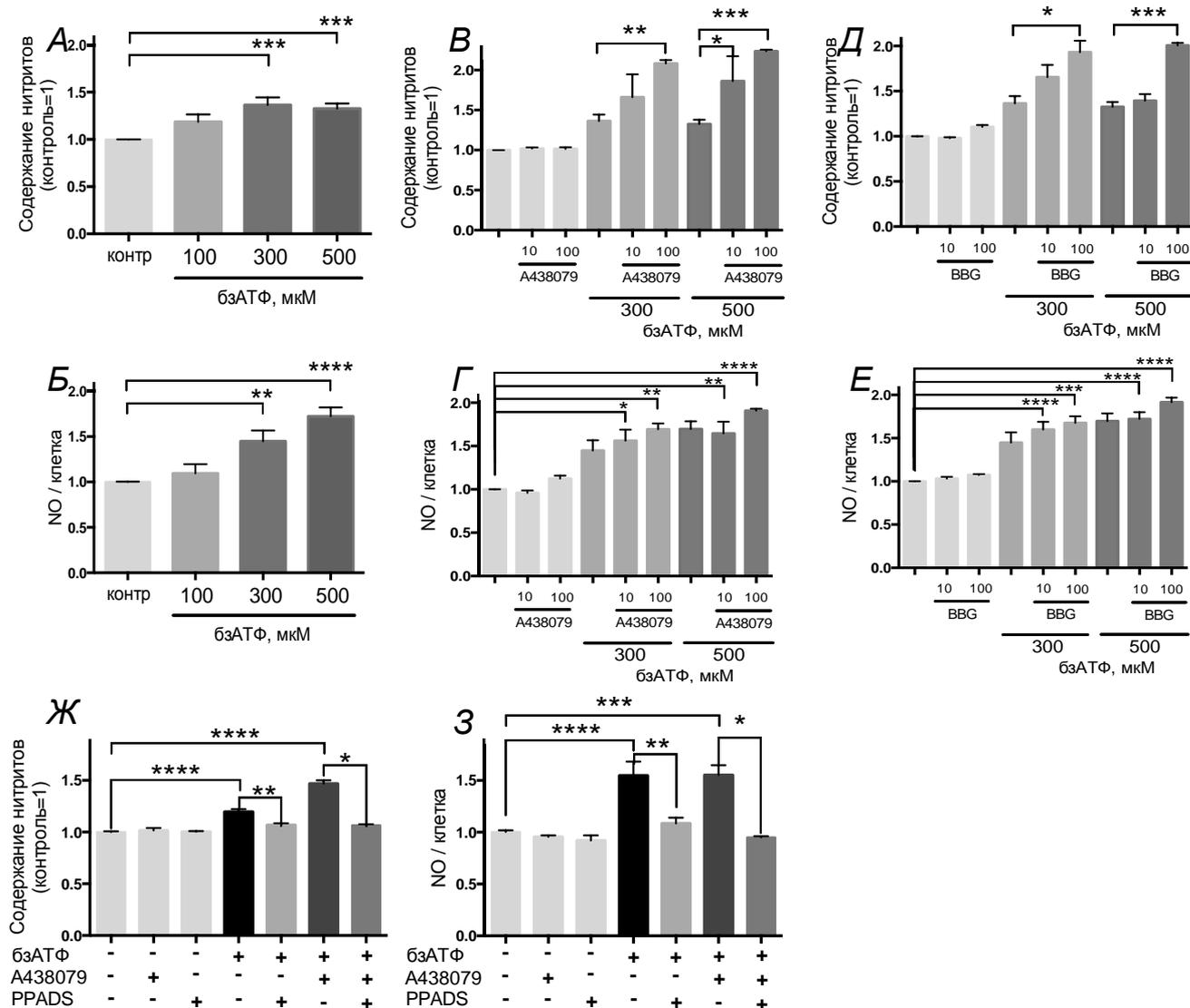


Рисунок 6. Бензоил-АТФ стимулирует синтез NO астроцитами крысы через активацию рецепторов P2, отличных от P2X7. А – синтез NO астроцитами на фоне бензоил-АТФ, мкМ ($n \geq 7$). Б – синтез NO единичной клеткой, рассчитанный как отношение уровня нитритов к значению выживаемости, на фоне бензоил-АТФ, мкМ ($n \geq 7$). В - синтез NO астроцитами на фоне ингибитора P2X7 (A438079, 10 и 100 мкМ) и бензоил-АТФ 300 и 500 мкМ ($n \geq 3$). Г - синтез NO единичной клеткой на фоне ингибитора P2X7 (A438079, 10 и 100 мкМ) и бензоил-АТФ 300 и 500 мкМ ($n \geq 3$). Д - синтез NO астроцитами на фоне ингибитора P2X7 (BBG, 10 и 100 мкМ) и бензоил-АТФ 300 и 500 мкМ ($n \geq 3$). Е - синтез NO единичной клеткой на фоне ингибитора P2X7 (BBG, 10 и 100 мкМ) и бензоил-АТФ 300 и 500 мкМ ($n \geq 3$). Ж - синтез NO астроцитами на фоне ингибитора рецепторов P2 (PPADS, 100 мкМ) и бензоил-АТФ 500 мкМ ($n \geq 3$). З – синтез NO единичной клеткой на фоне ингибитора рецепторов P2 (PPADS, 100 мкМ) и бензоил-АТФ 500 мкМ ($n \geq 3$). Данные представлены в виде среднего \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA post hoc Dunnett's test (А,Б), Kruskal-Wallis test post hoc Dunn's test (В-З).

1.3.3. Синтез NO астроцитами крысы при воздействии бензоил-АТФ обусловлен активацией индуцибельной NO-синтазы

Мы решили исследовать внутриклеточные механизмы бензоил-АТФ-зависимого синтеза NO астроцитами. Оксид азота является продуктом реакции окисления L-аргинина, которое катализируется ферментом NO-синтазой (NOS) {Förstermann, 2012}. Известно три типа фермента: нейрональная nNOS, эндотелиальная eNOS и индуцибельная iNOS {Förstermann, 2012}. Ферменты nNOS и eNOS являются кальций-зависимыми и экспрессируются конститутивно, в то время как экспрессия iNOS запускается под воздействием провоспалительного стимула, например, цитокинов {Togashi, 1997}{Saha, 2006}. Астроциты экспрессируют все три типа NO-синтаз {Ohnishi, 2009}.

Мы использовали неселективный ингибитор NO-синтаз, L-NAME, совместно с обработкой астроцитов бензоил-АТФ 500 мкМ. Ожидаемо, L-NAME блокировал бензоил-АТФ-зависимый синтез NO астроцитами (рис.7А). Для проверки вовлечения iNOS в бензоил-АТФ-инициируемую продукцию NO мы проанализировали изменение относительной экспрессии фермента. Измерение проводили в разных временных точках после внесения бензоил-АТФ к астроцитам методом количественной ПЦР с использованием специфических праймеров. Повышение экспрессии гена iNOS было впервые детектировано через 6 ч после внесения бензоил-АТФ 500 мкМ к клеткам (рис.7Б). Нам не удалось обнаружить транскрипты iNOS через 2 ч после воздействия бензоил-АТФ 500 мкМ. На фоне инкубации клеток с антагонистом P2X7, A438079, совместно с бензоил-АТФ 500 мкМ экспрессия iNOS детектировалась уже через 4 ч после добавления бензоил-АТФ 500 мкМ. Через 6 ч в группах «A438079 + бензоил-АТФ» и «BBG + бензоил-АТФ» наблюдалась отчётливая экспрессия iNOS, которая достигала максимума через 12 ч в исследуемом временном интервале (рис.7Б).

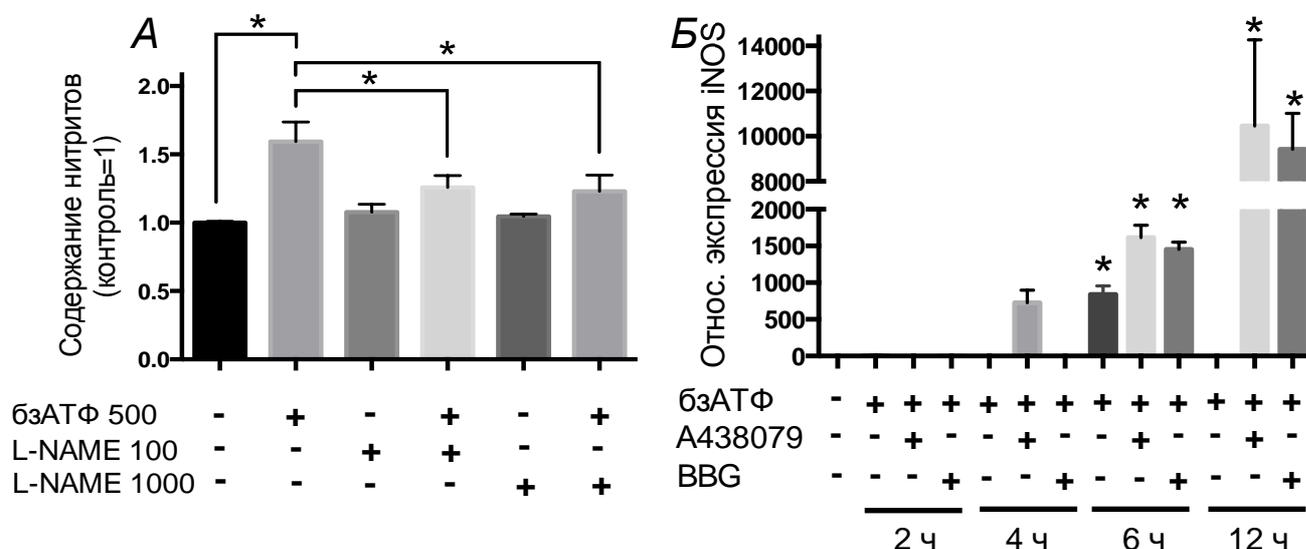


Рисунок 7. Бензоил-АТФ стимулирует синтез NO астроцитами крысы через активацию NO-синтаз. А – продукция NO астроцитами на фоне обработки неселективным ингибитором NO-синтаз.

NOS, L-NAME (100 и 1000 мкМ), и бензоил-АТФ (500 мкМ) ($n \geq 3$). **Б** – изменение относительной экспрессии гена iNOS в астроцитах во времени на фоне ингибиторов P2X7, A438079 (10 мкМ) и BFG (10 мкМ), и бензоил-АТФ 500 мкМ ($n \geq 3$). Данные представлены в виде среднего \pm SEM. * $p < 0.05$ (относительно контроля для графика Б), Kruskal-Wallis test post hoc Dunn's test.

Таким образом, стимуляция астроцитов крысы бензоил-АТФ вызывает гибель клеток и синтез NO, обусловленный запуском экспрессии индуцибельной NO-синтазы. Активация рецептора P2X7 играет ключевую роль в выживаемости астроцитов, в то время бензоил-АТФ-зависимый синтез NO обусловлен активацией рецепторов семейства P2, отличных от P2X7.

1.4. Провоспалительные эффекты ЛПС

1.4.1. Эндотоксинемия стимулирует выраженную пролиферацию астроцитов крысы и синтез оксида азота

Инфекционное заражение может быть одним из осложнений у пациентов с ишемией {Wang, 2019}. Мы использовали липополисахарид (ЛПС), компонент бактериальной стенки и агонист TLR4, для симуляции воспаления, наблюдающегося при ишемии, осложнённой инфекцией. Мы исследовали влияние ЛПС на выживаемость астроцитов и секрецию NO. Продукцию NO оценивали через 24 ч инкубации астроцитов с ЛПС. Выживаемость оценивали через 48 ч.

Было обнаружено, что ЛПС в концентрациях от 0,01 мкг/мл до 10 мкг/мл стимулировал мощную пролиферацию астроцитов (рис.8А). ЛПС в концентрации 2 мкг/мл повышал уровень пролиферации в 1,9 раза по сравнению с контролем, при этом различие в пролиферации между группой, получавшей ЛПС 0,01 мкг/мл, и группой, обработанной ЛПС 2 мкг/мл, было статистически значимым. ЛПС в концентрациях $> 0,01$ мкг/мл вызывал значительное высвобождение NO клетками (рис.8Б).

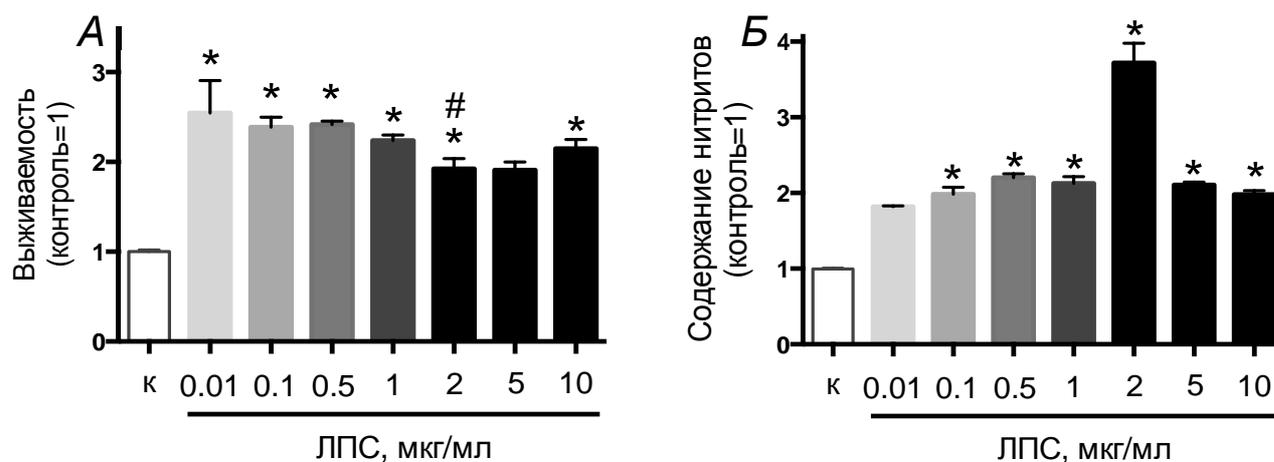


Рисунок 8. Влияние липополисахарида (ЛПС) на выживаемость астроцитов и продукцию NO. А – выживаемость клеток на фоне обработки ЛПС, мкг/мл ($n=7$). Б – продукция NO на фоне ЛПС, мкг/мл ($n=7$). Данные представлены в виде среднего \pm SEM. * $p < 0.05$ относительно контроля (к), # $p < 0.05$ относительно ЛПС 0,01 мкг/мл, Kruskal-Wallis test post hoc Dunn's test.

1.5. Внутриклеточные эффекты тромбина, бензоил-АТФ и липополисахарида

Многие заболевания ЦНС сопровождаются активацией провоспалительных сигнальных систем {Dusaban, 2013}. На предыдущих этапах работы мы изучили влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на выживаемость астроцитов. В качестве первичного маркера провоспалительной секреции был исследован уровень синтеза NO. Определив концентрации веществ, вызывающих выраженный клеточный ответ по параметрам выживаемости и синтеза NO, далее мы изучили влияние стимуляции на ряд внутриклеточных сигнальных белков в астроцитах и более полно охарактеризовали индуцируемый провоспалительный профиль секреции клеток.

1.5.1. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на индекс Вах/Vcl-2 в астроцитах крысы

Мы исследовали влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на соотношение белков апоптоза Вах/Vcl-2. Белок Вах стимулирует клеточную гибель, вызывая пермебиализацию мембраны митохондрий {Khodapasand, 2015}. Белок Vcl-2, напротив, блокирует апоптоз, ингибируя Вах {Fletcher, 2008}. Баланс про- (Вах) и антиапоптотических (Vcl-2) белков, синтезируемых клетками, определяет судьбу клетки, поддерживая её выживаемость, либо вызывая гибель путём апоптоза {Khodapasand, 2015}. Астроциты инкубировали с тромбином 100 нМ, бензоил-АТФ 500 мкМ, А438079 10 мкМ + бензоил-АТФ 500 мкМ и с ЛПС 1 мкг/мл. Через 24 ч клетки лизировали. Уровень Вах и Vcl-2 оценивали с помощью вестерн-блота. Было обнаружено, что индекс Вах/Vcl-2 статистически значимо выше в группах, получавших тромбин, либо ЛПС, и превышал контрольные значения в 2,2 и 2,8 раза (рис.9А,Б). Изменение Вах/Vcl-2 в большей степени было обусловлено увеличением уровня белка Вах, чем снижением Vcl-2. Инкубация с бензоил-АТФ 500 мкМ не приводила к значимому изменению индекса Вах/Vcl-2.

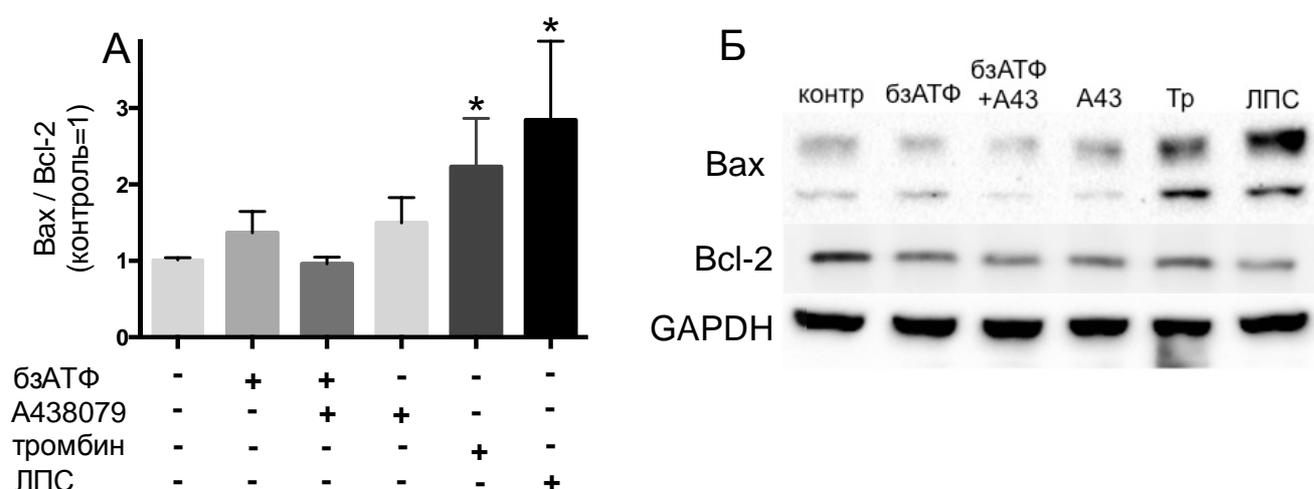


Рисунок 9. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на уровень белков Вах и Vcl-2 в астроцитах крысы. А – соотношение уровней белков Вах и Vcl-2 в астроцитах, обработанных тромбином (100 нМ), бензоил-АТФ (500 мкМ), А438079 (10 мкМ), А438079 (10 мкМ) совместно с бензоил-АТФ (500 мкМ), ЛПС (1 мкг/мл). Б – репрезентативная фотография

мембраны. В качестве контроля внесения белка использовали GAPDH. Данные представлены в виде среднего \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0.05$ относительно контроля, Mann-Whitney test.

1.5.2. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на уровень белка теплового шока 90 (HSP90) в астроцитах крысы

Далее мы исследовали влияние бензоил-АТФ, тромбина и ЛПС на уровень белка HSP90. HSP90 - белок-шаперон, экспрессия которого может возрасть при воздействии провоспалительных стимулов {Franco, 2013}. Уровень HSP90 оценивали через 24 ч инкубации астроцитов с веществами методом вестерн-блота. Нам не удалось обнаружить достоверного изменения в содержании HSP90 ни для одной из групп (рис.10А,Б). Тромбин, бензоил-АТФ и ЛПС не влияют на содержание HSP90 в астроцитах кортекса крысы.

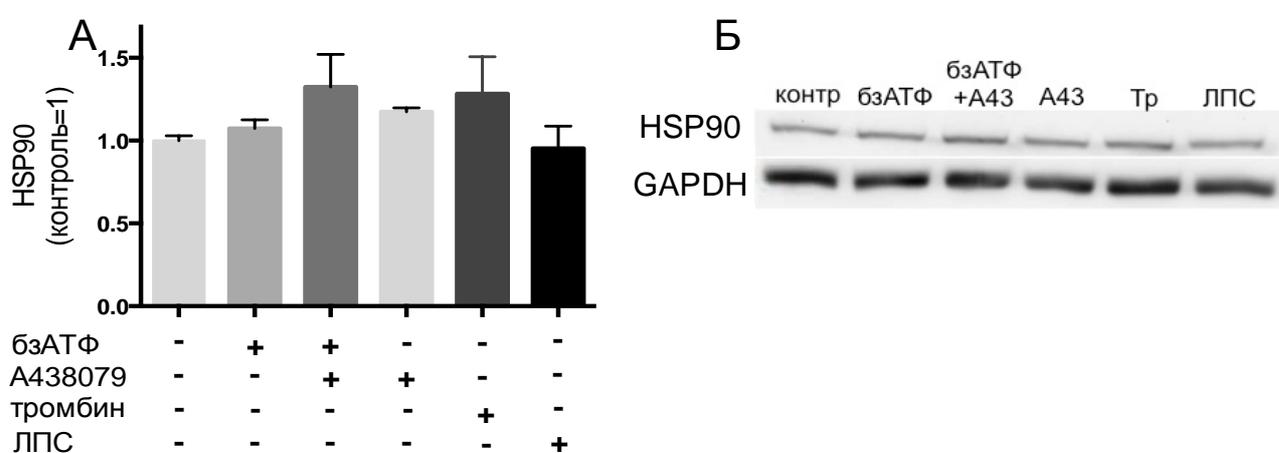


Рисунок 10. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на содержание HSP90. А – уровень белка HSP90 в астроцитах, обработанных тромбином (100 нМ), бензоил-АТФ (500 мкМ), А438079 (10 мкМ), А438079 (10 мкМ) совместно с бензоил-АТФ (500 мкМ), ЛПС (1 мкг/мл). Б – репрезентативная фотография мембраны. В качестве контроля внесения белка в лунку использовали уровень GAPDH. Данные представлены в виде среднего \pm SEM ($n \geq 3$).

1.5.3. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на уровень секреции IL-6 и TNF- α астроцитами крысы

Для расширения понимания провоспалительной активации астроцитов при воздействии тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС был проведён анализ секреции клетками двух ключевых провоспалительных цитокинов - IL-6 и TNF- α . Как IL-6, так и TNF- α секретируются в острой фазе воспаления и выполняют множество функций, среди которых активация синтеза белков острой фазы, цитокинов, вазодилатация и инфильтрация лейкоцитов {Gabay, 2006} {Bradley, 2008}. Астроциты инкубировали с веществами 6 ч, после чего анализировали содержание IL-6 и TNF- α в среде с помощью коммерческих наборов для ELISA. Значительное увеличение секреции IL-6 наблюдалось во всех экспериментальных группах, кроме группы, получавшей один ингибитор А438079 10 мкМ (рис.11А). Наиболее сильным провоспалительным стимулом, как и при измерении уровня NO, оказался ЛПС. Примечательно, что в группе «бензоил-АТФ

500 мкМ + А438079 10 мкМ» уровень секреции IL-6 оказался выше по сравнению с группой, получавшей один бензоил-АТФ. Подобный эффект мы наблюдали ранее при измерении секреции NO. Неожиданными оказались результаты анализа секреции TNF- α (рис.11Б). Обработка ЛПС и тромбином не влияла на секрецию TNF- α . Стимуляция секреции TNF- α наблюдалась только на фоне бензоил-АТФ 500 мкМ, причём использование ингибитора P2X7 совместно с бензоил-АТФ не влияло на бензоил-АТФ-зависимую секрецию TNF- α .

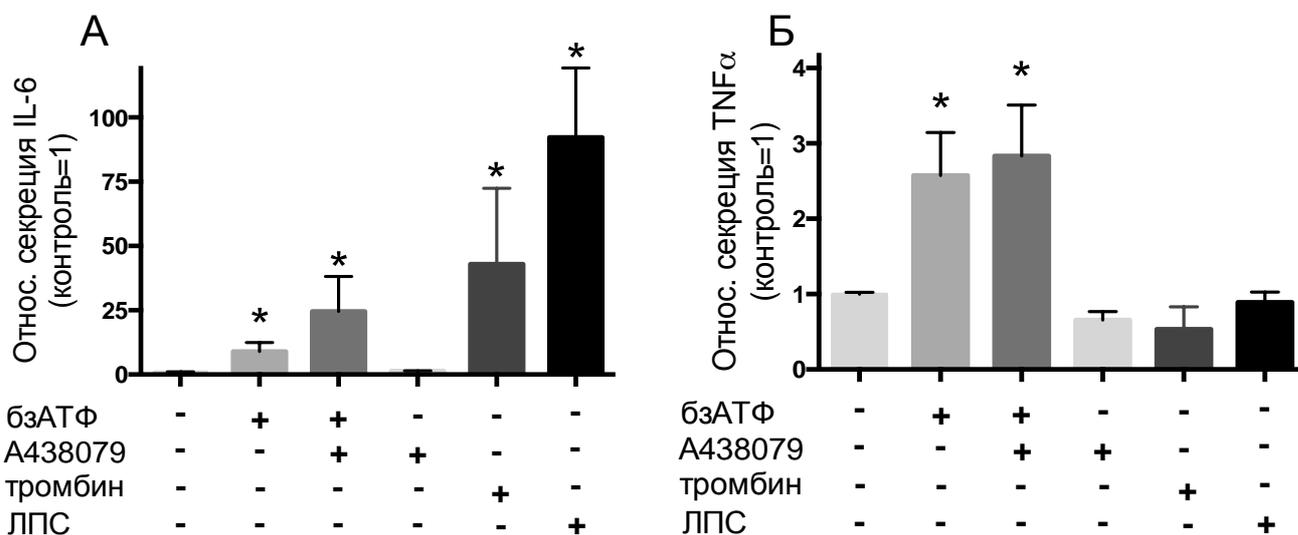


Рисунок 11. Секреция цитокинов астроцитами крысы под воздействием тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС. А – относительная секреция IL-6 астроцитами на фоне тромбина (100 нМ), бензоил-АТФ (500 мкМ), А438079 (10 мкМ), А438079 (10 мкМ) совместно с бензоил-АТФ (500 мкМ), ЛПС (1 мкг/мл). Б – относительная секреция TNF- α астроцитами на фоне тромбина (100 нМ), бензоил-АТФ (500 мкМ), А438079 (10 мкМ), А438079 (10 мкМ) совместно с бензоил-АТФ (500 мкМ), ЛПС (1 мкг/мл). Данные представлены в виде среднего \pm SEM (n=4). *p < 0.05 относительно контроля, Mann-Whitney test.

1.5.4. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на активацию транскрипционного фактора Nf- κ B в астроцитах крысы

Семейство транскрипционных факторов NF- κ B представляет собой группу белков, вовлечённых в регуляцию воспаления, апоптоза, пролиферации [Liu, 2017]. NF- κ B контролирует транскрипцию генов факторов воспаления, среди которых iNOS, TNF α , IL-1 β и IL-6 [Tarassishin, 2014]. Белки NF- κ B находятся в цитоплазме в комплексе с белками I κ B. В условиях активации клеточного ответа NF- κ B и I κ B подвергаются фосфорилированию, в результате чего фосфо NF- κ B высвобождается и транслоцируется в ядро, где запускает транскрипцию целевых генов [Liu, 2017]. Субъединица p65 наиболее часто фосфорилируется при активации канонического пути NF- κ B [Giridharan, 2018]. Мы решили проверить активацию NF- κ B в астроцитах через 4 ч инкубации с веществами методом вестерн-блота, окрашивая фосфорилированную форму p65 (фосфо p65, активная форма p65) и общий пул p65 (активный + неактивный p65). Было обнаружено, что обработка астроцитов как бензоил-АТФ, так и

тромбином достоверно повышает уровень фосфо р65 в клетках (рис.12А,Б). В случае групп «бензоил-АТФ 500 мкМ + А438079 10 мкМ» и получавших ЛПС наблюдалась тенденция к повышению уровня фосфо р65 в астроцитах.

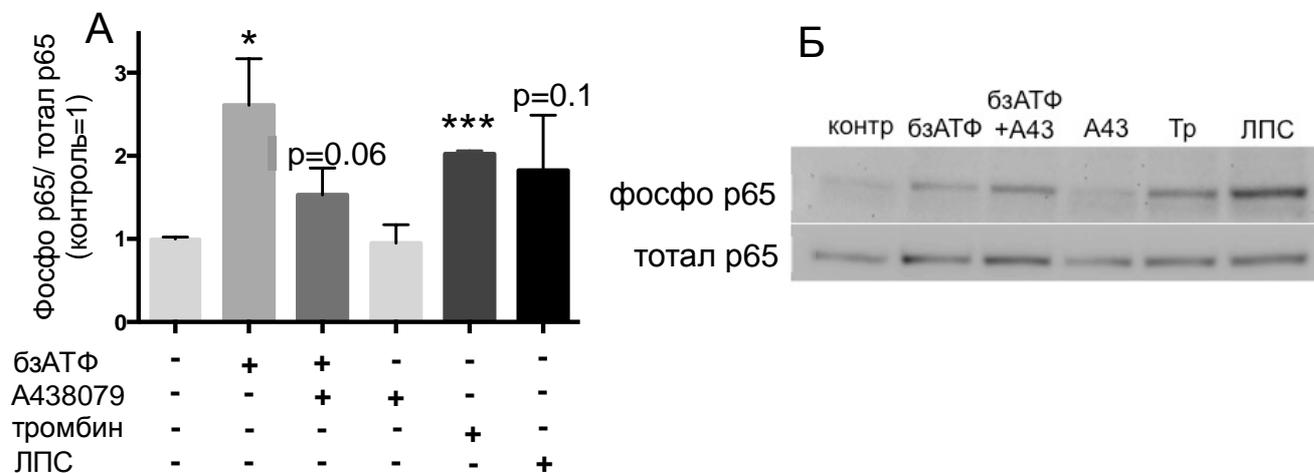


Рисунок 12. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на активацию транскрипционного фактора NF-κB в астроцитах крысы. А - отношение интенсивности бэндов активной фосфорилированной формы NF-κB (фосфо р65) к интенсивности общего NF-κB (тотал р65) в астроцитах на фоне тромбина (100 нМ), бензоил-АТФ (500 мкМ), А438079 (10 мкМ), А438079 (10 мкМ) совместно с бензоил-АТФ (500 мкМ), ЛПС (1 мкг/мл). Б - репрезентативный результат вестерн-блота. Данные представлены в виде среднего ± SEM (n=3). p < 0.05, ***p < 0.001, p=0.06, p=0.1 относительно контроля, Mann-Whitney test.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было комплексно охарактеризовано влияние ишемии на функциональное состояние астроцитов в клеточной культуре. Для моделирования ишемии *in vitro* астроциты подвергали депривации кислорода и глюкозы (КГД). Отдельно были исследованы эффекты провоспалительных молекул, таких как тромбин, бензоил-АТФ, ЛПС, которые могут появляться в области ишемического повреждения и регулировать состояние астроглии. Мы показали, что КГД, тромбин и ЛПС активируют астроциты крысы, стимулируя пролиферацию клеток, изменение морфологии (КГД, тромбин) и синтез/секрецию провоспалительных факторов NO, IL-6 (тромбин, ЛПС). Бензоил-АТФ, напротив, вызывает гибель астроглии и синтез/секрецию NO, IL-6, TNF-α. Таким образом, тромбин и ЛПС обладают сходным провоспалительным действием на астроциты, в то время как эффекты бензоил-АТФ в меньшей степени схожи с эффектами тромбина и ЛПС (рис.13).

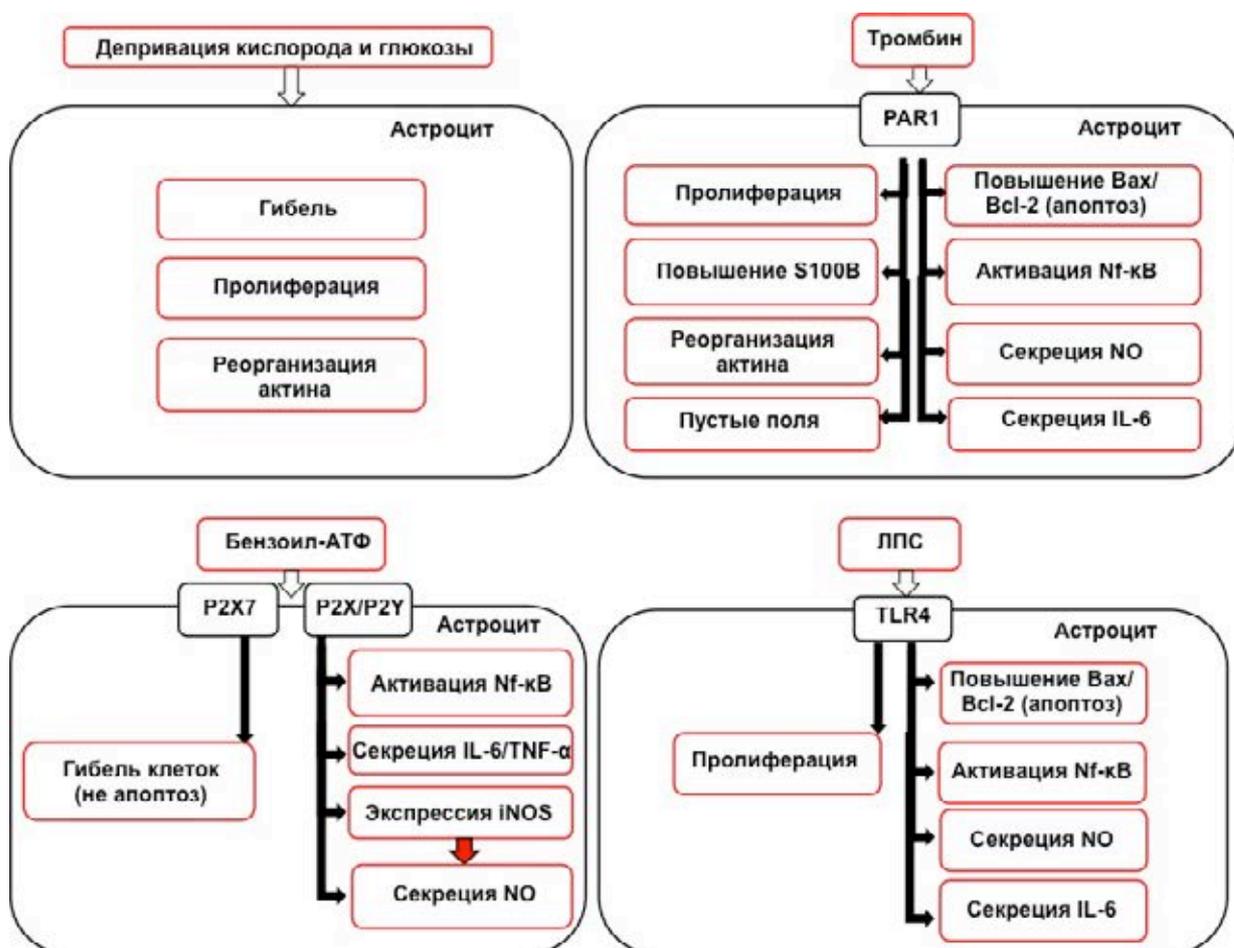


Рисунок 13. Влияние депривации кислорода и глюкозы, тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на функциональное состояние астроцитов крысы.

ВЫВОДЫ

- 1) Депривация кислорода и глюкозы вызывает гибель астроцитов крысы и отставленную во времени пролиферацию и изменяет морфологию астроцитов через перестройку актинового цитоскелета.
- 2) Тромбин и липополисахарид обладают сходным провоспалительным действием на культивируемые астроциты крысы, индуцируя их пролиферацию, стимулируя секрецию NO и IL-6, но не TNF-α.
- 3) Тромбин дозозависимо изменяет морфологию астроцитов через повышение экспрессии кальций-связывающего белка S100B и перестройку актинового цитоскелета, что приводит к формированию пустых полей в монослое первичной культуры клеток.
- 4) Бензоил-АТФ вызывает гибель астроцитов крысы через активацию P2X7.
- 5) Бензоил-АТФ NO-синтаз-зависимым образом стимулирует секрецию NO астроцитами, а также инициирует секрецию цитокинов IL-6 и TNF-α опосредовано через активацию пуриnergических рецепторов 2-ого типа, отличных от P2X7.

б) Вызванное тромбином и липополисахаридом повышение апоптотического индекса в астроцитах указывает на участие этих провоспалительных факторов в регуляции апоптоза в культивируемых астроцитах.

7) Тромбин и бензоил-АТФ вызывают активацию транскрипционного фактора NF-κB в астроцитах крысы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты расширяют современные фундаментальные представления об особенностях функционирования астроцитов в условиях воздействия разных провоспалительных факторов, ассоциированных с ишемией, что в перспективе может обеспечить эффективный поиск и разработку цитопротекторов и модуляторов состояния астроцитов при патологиях с целью минимизации осложнений и реабилитации пациентов с поражениями мозга. Обнаруженное в настоящей работе усиление синтеза NO стимулированными астроцитами на фоне селективной блокады P2X7 следует принимать во внимание при разработке и испытаниях ингибиторов P2X7 в терапевтических целях.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи

Иванова, А.Е. Влияние тромбина на культивируемые астроциты крысы, подвергнутые кислородно-глюкозной депривации / Е.А. Абрамов, А.Е. Иванова, Э.Б. Дашинимаяев, А.Г. Камкин, Л.Р. Горбачева // Биологические мембраны. – 2022. - Т. 39. - № 1. - С. 18-27. DOI: 10.31857/S0233475522010042.

Ivanova, A.E. The influence of b-arrestin-2 gene knockout in mice on survival of cultured astrocytes exposed to thrombin and on the cerebral thrombosis aftereffects in vivo / M.D. Galkov, A.E. Ivanova, M.V. Gulyaev, E.V. Kiseleva, I.G. Savinkova, L.R. Gorbacheva // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. - 2020. - Vol. 14. - № 1. - P. 17–23. DOI: 10.1134/S1990747819060060.

Иванова, А.Е. Оценка влияния нокаута гена β-аррестина-2 у мышей на выживаемость культивируемых астроцитов при токсическом действии тромбина и последствия тромбоза головного мозга / М.Д. Галков, А.Е. Иванова, М.В. Гуляев, Е.В. Киселева, И.Г. Савинкова, Л.Р. Горбачева // Биологические мембраны. – 2019. - Т. 36. - № 6. - С. 400-408. DOI: 10.1134/S0233475519060069.

Ivanova, A.E. Activated protein C and thrombin participate in the regulation of astrocyte functions / A.E. Ivanova, L.R. Gorbacheva, S.M. Strukova, V.G. Pinelis, G. Reiser // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2014. – Vol. 8. - № 1. – P. 50–59. DOI: 10.1134/S1990747813050048

Иванова, А.Е. Участие активированного протеина С и тромбина в регуляции функций астроцитов / А.Е. Иванова, Л.Р. Горбачёва, С.М. Струкова, В.Г. Пинелис, Г. Райзер //

Биологические мембраны. - 2013. — Т. 30. - № 5-6. — С. 387–397. DOI: 10.7868/S0233475513050046.

Тезисы конференций

Ivanova, A. Activated Protein C Impacts Survival and Activity of Mast Cells and Neurons via the Modulation of Nuclear Factor- κ B Activation / L. Gorbacheva, A. Ivanova // *Res Pract Thromb Haemost (Special Issue: Abstracts of the ISTH 2021 Virtual Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis)*. – 2021. – Vol. 5. - № S2: e12589. – P. 546-546, Virtual Congress from Philadelphia, USA. DOI: 10.1002/rth2.12589.

Иванова, А.Е. Влияние тромбина на культивируемые астроциты крысы при кислородно-глюкозной депривации / Е.А. Абрамов, А.Е. Иванова, Э.Б. Дашинимев, А.Г. Камкин, Л.Р. Горбачёва // «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Сборник статей под редакцией В.П. Зинченко и А.В. Бережнова. – 2021. – С. 594-598, Пущино, Россия.

Иванова, А.Е. Роль β -аррестина-2 в развитии повреждения нервной ткани, вызванного тромбином / М.Д. Галков, А.Е. Иванова, М.В. Гуляев, Е.В. Киселева, И.Г. Савинкова, Л.Р. Горбачева // «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Сборник статей под редакцией В.П. Зинченко и А.В. Бережнова. – 2019. – С. 547-552, Пущино, Россия.

Ivanova, A. The modulation of astrocyte functions by activated protein c / L. Gorbacheva, A. Ivanova, V. Pinelis, R. Reiser, S. Ishiwata, S. Strukova // *Journal of Thrombosis and Haemostasis (Special Issue: Abstracts of the XXIV Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis)*. — 2013. — Vol. 11. - № S2. — P. 1002–1003, Amsterdam, Netherlands.

Ivanova, A. Astrocytes - a target for the action of thrombin and activated protein C / Gorbacheva L., Strukova S., Ivanova A., V. Pinelis, Reiser G. // XXVIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function and XIth International Conference on Quantification of Brain Function with PET. - 2013. – P. 349-350, Shanghai, China.

Иванова, А.Е. Активированный протеин С и тромбин участвуют в регуляции функций астроцитов / А.Е. Иванова, Л.Р. Горбачева, Г. Райзер, В.Г. Пинелис, С.М. Струкова // «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Сборник статей под редакцией В.П. Зинченко и А.В. Бережнова. – 2013. – С. 34-38, Пущино, Россия.

Иванова, А.Е. Участие активированного протеина С и тромбина в регуляции функций астроцитов / А.Е. Иванова, Л.Р. Горбачева, Г. Райзер, С.М. Струкова // Международный молодёжный научный форум «Ломоносов-2013». – 2013. – С. 329-330, Москва, Россия.

Ivanova, A. Activated protein c prevents the thrombin-induced activation of astrocytes / L. Gorbacheva, A. Ivanova, V. Pinelis, R. Reiser, S. Ishiwata, S. Strukova // *Journal of Thrombosis and Haemostasis (The 21st International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis Abstracts)*. — 2012. — Vol. 10. - № 6. — P. e11–e11, Brighton, UK.

Ivanova, A. The thrombin-induced proliferation of astrocytes is regulated by activated protein c / L. Gorbacheva, A. Ivanova, G. Reiser, V. Pinelis, S. Strukova // *European Journal of Neurology (Special Issue: Abstracts of the 16th Congress of the EFNS, Stockholm, Sweden)*. — 2012. — Vol. 19. - № S1. — P. 506– 506, Stockholm, Sweden.