Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Иванова Анна Евгеньевна

# Особенности влияния провоспалительных факторов на функциональное состояние астроцитов

Специальность: 03.03.01 - Физиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент Горбачева Любовь Руфэльевна

### оглавление

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Астроциты в центральной нервной системе	13
1.1.1. Происхождение и строение астроцитов	13
1.1.2. Функции астроцитов в норме	15
1.1.3. Астроциты в патологических процессах	
1.2. Структура и функции тромбина и его рецепторов	25
1.2.1. Рецепторы, активируемые протеазами	
1.2.2. Функции тромбина в центральной нервной системе	
1.3. Роль АТФ и пуринергической сигнализации в центральной нервно	ой
системе	31
1.3.1. Секреция АТФ на фоне ишемии	
1.3.2. Участие АТФ в реактивном астроглиозе	
1.3.3. Рецепторы Р2 в патологии астроглии	35
1.3.3.1. Рецепторы семейства Р2Х	
1.3.3.1.1. Рецепторы Р2Х1-6	
1.3.3.1.2. Рецептор Р2Х7	
1.3.3.2. Рецепторы семейства Р2Ү	44
1.3.3.2.1. Рецептор Р2Ү1	46
1.3.3.2.2. Рецепторы Р2Ү2, 4, 6, 11-14	48
1.4. Toll-подобные рецепторы (TLR) в центральной нервной системе.	50
1.4.1. Строение и сигнализация Toll-подобных рецепторов	50
1.4.2. Функции TLR4 в центральной нервной системе: фокус на астр	оциты
	53
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	55
2.1. Вещества и растворы	55
2.2. Работа с культурой астроцитов	55

2.2.1. Получение культур астроцитов55
2.2.2. Пассирование клеток
2.2.3. Внесение веществ
2.3. Модель ишемии in vitro – кислородно-глюкозная депривация (КГД)57
2.4. Измерение выживаемости/пролиферации астроцитов
2.4.1. МТТ тест
2.4.2. WST-1 тест
2.5. Оценка уровня некроза астроцитов по высвобождению
лактатдегидрогеназы (ЛДГ)59
2.6. Измерение относительного содержания оксида азота
2.7. Анализ уровней экспрессии iNOS методом полимеразной цепной реакции
(ПЦР) в реальном времени60
2.7.1. Выделение РНК60
2.7.2. Очистка препарата РНК от примеси ДНК61
2.7.3. Обратная транскрипция61
2.7.4. Постановка ПЦР в реальном времени62
2.7.5. Горизонтальный электрофорез ДНК в агарозном геле
2.8. Анализ уровней секреции цитокинов63
2.8.1. Измерение секреции интерлейкина 664
2.8.2. Измерение секреции TNF-α64
2.9. Вестерн-блоттинг65
2.10. Иммуноцитохимическое окрашивание
2.11. Статистический анализ68
ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ
3.1. Влияние ишемии/реперфузии на культивируемые астроциты крысы69
3.1.1. Характеристика культуры астроцитов69
3.1.2. Влияние ишемии/реперфузии на выживаемость астроцитов крысы и
высвобождение ЛДГ69
3.1.3. Депривация кислорода и глюкозы стимулирует перестройку
актинового цитоскелета астроцитов71

3.5.3. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на уровень секреца	ии IL-6 и
TNF-α астроцитами крысы	102
3.5.4. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на активацию	
транскрипционного фактора NF-кВ в астроцитах крысы	104
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
выводы	121
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	

#### введение

#### Актуальность и степень разработанности темы исследования

Геморрагические и ишемические инсульты являются одной из ведущих причин смертности и инвалидизации взрослого населения [1]. Локальное ограничение кровотока 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 [2, 3]. Воспаление, в свою очередь, приводит вторичному повреждению нервной ко ткани И отягощает восстановление после инсульта [2]. Астроциты, ключевой компонент нейроглии, обеспечивают функционирование нервной системы в норме, поддерживая гомеостаз ЦНС на всех уровнях организации от молекулярного до органного [4]. При патологических состояниях наблюдается активация астроцитов, этот процесс получил название реактивный астроглиоз [5, 6]. При реактивном астроглиозе астроциты претерпевают морфологические и функциональные изменения, происходит смена секреторного профиля на провоспалительный, что усиливает локальное воспаление [6, 7]. Более того, астроглиоз может приводить к формированию глиального рубца, замещающему нервную ткань И препятствующему восстановлению функционирования повреждённого участка мозга [8]. В связи с этим, изучение влияния как самого ишемического воздействия, так и ряда 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 обнаруживается в мозге при различных патологиях ЦНС, сопровождающихся повреждением гематоэнцефалического барьера, в том числе и при инсультах [9-11]. Кроме того, известно, что протромбин, прекурсор тромбина, экспрессируется клетками мозга [11]. Рецепторы тромбина детектированы на нейронах и астроцитах, причём их экспрессия увеличивается при инсульте [12-15]. Показано, что в зависимости от концентрации тромбин может как выступать в роли нейропротектора, так и оказывать токсическое воздействие на нейроны [12, 16, 17]. Тромбин вызывает активацию микроглии, что подтверждено большим количеством научных работ, в то время как сведения об эффектах тромбина на астроциты немногочисленны [9, 18-22].

Массированная гибель клеток при инсульте сопровождается выбросом во внеклеточное пространство другой потенциальной регуляторной молекулы – аденозинтрифосфата (АТФ) [23-25]. АТФ в высоких концентрациях выступает в качестве значимого универсального образа опасности, запускающего процессы воспаления [26]. Рецепторы пуринергической системы сигнализации обнаружены на нейронах и глиальных клетках, что указывает на возможность регуляции АТФ функций клеток мозга [27, 28]. В ранних исследованиях было показано, что АТФ и его стабильные аналоги способны стимулировать синтез провоспалительных факторов праймированными астроцитами [29, 30] [31] [32]. Сравнительно мало известно о влиянии высоких концентраций АТФ, которые наблюдаются при патологиях мозга, на состояние нативных астроцитов.

При различного рода инвазиях, например, на фоне травмы головного мозга в нервной ткани может появляться липополисахарид (ЛПС), компонент бактериальной стенки [33]. Липополисахарид запускает воспаление через активацию Toll-подобных рецепторов 4-ого типа (TLR4), которые также обнаружены на мембране астроцитов [34]. Показано, что экспрессия TLR4 возрастает на фоне ишемии и усиливает повреждение ткани [35].

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

#### Цель и задачи исследования

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

Для выполнения поставленной цели были сформулированы следующие 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 пуринергических 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-кB, 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 функциональноморфологические 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-кB-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 бензоил-АТФ, кортекса крысы, обработанных обусловлена активацией

пуринергических 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.

#### 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 изучении нормальной физиологии/патофизиологии подходом при клеток нейроглии. С целью моделирования основных патологических факторов ишемии астроциты подвергали депривации кислорода и глюкозы, а также инкубировали с повреждающими факторами изолированными с последующим анализом выживаемости, морфологических параметров, секреции и экспрессии ключевых молекул воспаления культивируемыми астроцитами.

#### 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 В Тромбин функциональные изменения клетках. 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.

#### Степень достоверности

Выводы и положения, выносимые на защиту, основаны на статистически значимых данных. Статистический анализ проводили в GraphPad Prism 5 для Windows и GraphPad Prism 6 для MacOS (GraphPad Software Inc., CША). 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-исследовательской научно-практическую деятельность лаборатории электрофизиологии НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Апробация результатов диссертационной работы была проведена заседании кафедры физиологии на медикобиологического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

#### 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.

#### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1. Астроциты в центральной нервной системе

#### 1.1.1. Происхождение и строение астроцитов

Глиальные клетки были впервые открыты в 19ом веке и долгое время считалось, что их опорная функция является основной [36]. Сейчас очевидно, что нейроглия выполняет множество жизненно важных задач, обеспечивая функционирование всей нервной системы. Количество глиальных клеток по представлениям приблизительно равно, либо современным превосходит количество нейронов в зависимости от рассматриваемой структуры мозга и вида животного [37]. Так, в полушариях головного мозга преобладают глиальные клетки, в то время как в мозжечке их содержание крайне низкое по сравнению с содержанием нейронов [38].

Астроглия является одним ИЗ ключевых компонентов нейроглии центральной нервной системы (ЦНС), составляя 20-40% от общей популяции глиальных клеток [39]. Астроциты, как и олигодендроциты и NG2 клетки, происходят из эктодермального зародышевого листка в отличие от микроглии, для которой характерно мезодермальное происхождение [39] [40]. Астроциты собой крайне гетерогенную представляют клеточную популяцию, обнаруживаемую как в сером, так и в белом веществе головного и спинного мозга, различающуюся как морфологически (на уровне фенотипа), так, вероятно, и функционально [38]. К астроглии относят протоплазматические астроциты серого вещества, фиброзные астроциты белого вещества, радиальные астроциты Бергманновская (Мюллерова глия сетчатки, глия мозжечка, танициты гипоталамуса и астроциты спинного мозга), питуициты нейрогипофиза, периваскулярные и краевые астроциты в области мягкой мозговой оболочкой, Гомори-позитивные астроциты гипоталамуса и гиппокампа (богатые железом) и поверхностно-ассоциированные астроциты префронтальной коры [41]. В кортексе человека дополнительно обнаружены специализированные интерламинарные, поляризованные и варикозные астроциты (varicose projection astrocytes), при этом первые два вида встречаются и у приматов [42] [4].

«Типичный» астроцит представляют собой клетку звёздчатой формы со множеством радиально отходящих отростков. В молодом организме отростки астроцитов длинные и тонкие, с возрастом они как правило более короткие [43]. Протоплазматические астроциты человека превосходят по размерам астроциты крысы и более интенсивно и сложно ветвятся, что позволяет образовывать на один-два порядка большее количество синаптических контактов по сравнению с мозгом грызунов [42, 44]. Пересадка глиальных клеток-предшественниц человека новорожденным иммунодефицитным мышам усиливало долговременную потенциацию, улучшало обучение и память взрослых химер по сравнению с интактными животными [45].

Принадлежность к астроглии в нервной ткани производится на основе морфологии клетки и экспрессии молекулярных маркёров, не являющихся строго специфичными. К последним относят GFAP, кальций-связывающий белок S100B, ALDH1L1, транспортеры глутамата EAAT-1 (GLAST у грызунов) и EAAT-2 (GLT-1 у грызунов), аквапорин 4 (AQP4), коннексины Cx30 и Cx43 [46]. Классическим молекулярным признаком астроцитов, наиболее часто используемым в исследованиях на протяжении десятилетий, служит экспрессия гена GFAP, продукт которого наряду с виментином образует промежуточные филаменты астроцитов [47, 48]. Тем не менее на сегодняшний день установлено, что не все астроциты экспрессируют GFAP и не все клетки, экспрессирующие GFAP, являются астроцитами [49]. Уровень содержания GFAP в астроглии различается как между структурами мозга, так и внутри одной структуры, а также зависит от стадии развития организма. Так, например, астроциты поверхностных и глубоких слоев кортекса экспрессируют детектируемый уровень GFAP, в то время как для астроцитов средних слоёв это менее свойственно [38]. Детекция моноклональными антителами связывающего кальций белка S100B позволяет визуализовать в несколько раз большее количество астроцитов по сравнению с окрашиванием на GFAP, однако и большее количество видов неастроглиальных

клеток его также экспрессируют (олигодендроциты, эндотелиоциты, некоторые нейроны) [41]. ALDH1L1 в качестве маркёра астроглии был предложен сравнительно недавно. Было показано, что окрашивание на белок, кодируемый ALDH1L1, является высокоспецифичным и лишь минорная популяция олигодендроцитов оказывается ALDH1L1<sup>+</sup> [50]. В целом, можно заключить, что на сегодняшний день строго специфического и в то же время универсального маркёра астроглии не существует.

Астроциты относят к электроневозбудимым клеткам с потенциалом покоя около -80 мВ для зрелой клетки [51]. В то же время для астроцитов характерны регулируемые внутриклеточные осцилляции концентрации ионов кальция, играющих важнейшую роль в межклеточных взаимодействиях астроцит-астроцит [52]. астроцит-нейрон Распространение кальциевых И волн становится возможным из-за значительного числа щелевых контактов между клетками, образованных преимущественно коннексинами Сх43 и Сх30, что позволяет образовывать функциональную структуру, подобную синцитию. обеспечивающую эффективную передачу ионов и других биологически активных низкомолекулярных веществ в астроглии [49] [53].

#### 1.1.2. Функции астроцитов в норме

Основная функция астроглии сводится к поддержанию гомеостаза ЦНС на всех уровнях организации от молекулярного до органного (Рисунок 1).

Благодаря разнообразию ионных каналов в клеточной мембране астроциты поддерживают гомеостаз ионов калия, кальция, хлора, регулируют клеточный pH [51, 54]. Астроглия участвует в поддержании водного гомеостаза мозга, поскольку отростки астроцитов, контактирующие с сосудами, областями мягкой мозговой оболочки и эпендимы содержат большое количество водных каналов, образованных преимущественно аквапорином 4 [55].

Астроциты участвуют в метаболизме нейромедиаторов. Повышенная активность глутаматергических нейронов ведёт к накоплению в синаптической щели глутамата, который через астроцит-специфичные высокоаффинные натрийзависимые траспортеры глутамата EAAT1 и EAAT2 захватывается астроцитом [56]. В астроците глутаминсинтаза, расходуя одну молекулу АТФ, конвертирует глутамат в глутамин [56] [57]. Глутамин секретируется во внеклеточное пространство, где захватывается нейроном, и дезаминируется обратно в глутамат под воздействием фермента глутаминазы, завершая, таким образом, глутамат-глутаминовый метаболический цикл и восполняя пул глутамата в нейронах [57]. Глутамат может метаболизироваться в астроцитах и другими путями, включая декарбоксилирование до гамма-аминомасляной кислоты и окисление в цикле трикарбоновых кислот [58, 59] [60]. Поддержание низких уровней внеклеточного глутамата и секреция антиоксиданта глутатиона астроглией защищает нейроны от глутаматной эксайтотоксичности и окислительного стресса [61].

В мозге астроглия служит основным депо гликогена, расщепление которого обеспечивает функционирование нейронов BO время периодов высокой нейрональной активности и гипогликемии [62]. Высокая нейрональная активность и гипогликемия стимулируют повышение захвата глюкозы (транспортер GLUT1 в астроцитах), гликолиз и гликогенолиз с образованием конечного продукта Лактат секретируется внеклеточное пространство лактата. BO через низкоаффинные монокарбоксилатные транспортеры МСТ1 и МСТ4, экспрессия которых характерна для астроцитов и сосудов. Нейроны захватывают лактат посредством высокоаффинных по отношению к лактату транспортеров МСТ2 и далее используют его в метаболизме [63].



Рисунок 1. Функции астроцитов в ЦНС. Модифицировано из [64] и [4].

Наряду с эндотелиоцитами перицитами астроциты И формируют гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) И осуществляют контроль его проницаемости [65]. В последнее время обсуждается участие астроцитов в называемой глимфатической образовании так системы, своеобразной транспортной системы мозга, представляющей собой совокупность тоннелей, формируемых астроцитами вокруг сосудов, по которым выводятся метаболиты и осуществляется доставка энергетических субстратов, нейромодуляторов, трофических и ростовых факторов [66] [67].

Астроциты выполняют большое количество функций при формировании белого и серого вещества во время развития ЦНС [52]. Факторы, секретируемые астроглией, такие как тромбоспондин-1, -2, гевин, глипекан-4, -6, способствуют образованию и созреванию синапсов как во время развития ЦНС, так и после травмы [6]. Функционируя в связке с микроглией астроциты участвуют в элиминации лишних синапсов, регулируя экспрессию белков системы комплемента, что, наряду с участием в синаптогенезе, свидетельствует о вкладе астроцитов в синаптическую пластичность мозга [68]. Астроциты экспрессируют рецепторы к различным нейромедиаторам, благодаря чему осуществляют контроль уровней глутамата, гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), пуринов (АТФ, аденозин), D-серина [54]. Являясь участником трёхстороннего синапса, астроцит регулирует синаптическую передачу между пресинаптическим и постсинаптическим нейронами, секретируя нейромодуляторы и участвуя в метаболизме нейромедиаторов [69]. Согласно последним представлениям отростки астроцита плотно обволакивают синапс, формируя так называемую «астроглиальную колыбель» вокруг синаптического нейронального контакта, обеспечивая его созревание, функционирование, регуляцию и изоляцию [70].

Астроциты участвуют в формировании нейроваскулярной единицы, структурно-функционального элемента ЦНС, представляющего собой сложный комплекс, включающий ряд компонентов, в том числе, нейронные терминали, сосуд и окончания астроцита [71]. Контактируя с мозговыми сосудами на всём их протяжении, астроглиальные клетки за счёт выброса вазоактивных веществ (производные арахидоновой кислоты. аденозин, калий) ИЗ терминалей регулируют локальный кровоток в нервной ткани, внося вклад как в возникновение функциональной гиперемии, так и в вазоконстрикцию [72]. Так, глутамат, основной возбуждающий нейромедиатор, активируя метаботропные рецепторы mGluR на мембране астроцита, приводит к повышению кальция в цитоплазме клетки и запуску синтеза арахидоновой кислоты, секреция которой и её активных метаболитов (PGE2, EET) вызывает оксилипин-опосредованную вазодилатацию [73].

Таким образом, в здоровом организме астроглия выполняет множество функций по поддержанию гомеостаза ЦНС, поэтому неудивительно, что нарушения в работе глиальных клеток ассоциированы с разнообразными патологическими состояниями нервной ткани.

#### 1.1.3. Астроциты в патологических процессах

Долгое время при изучении нейропатологических состояний основной фокус исследований был направлен на нейроны. Сейчас очевидно, что нейроглия

играет не последнюю роль в заболеваниях нервной системы и заслуживает должного внимания. В работе Pekny с соавт. астроглиопатии были условно классифицированы на три группы [6]. Первая группа – это астроцитопатии, связанные с патологической перестройкой и аномальным функционированием клеток, например, в связи с мутацией в генах. Вторая группа включает астроцитопатии, связанные с утратой каких-либо функций астроцитами и их гибелью вследствие дегенераций клеток. Наконец, отдельным видом астроглиопатий является реактивный астроглиоз, сопровождающийся специфическими функциональными морфологическими И изменениями астроцитов, их активацией [6] [41]. При этом следует понимать, что при различных состояниях, может наблюдаться сочетание астроглиопатий. Так, например, при болезни Альцгеймера, деменциях может наблюдаться как значительная атрофия астроцитов, так и мягкая степень реактивного астроглиоза [74].

Патологическая перестройка аномальное функционирование И астроглии наблюдаются при некоторых генетически-обусловленных заболеваниях ЦНС. Мутации в генах астроцитов связаны с развитием лейкодистрофий, среди которых болезнь Александера является наиболее известной [75]. При болезни Александера мутации в астроцит-специфичном гене GFAP ведут к появлению комплекса симптомов, среди которых макроцефалия, задержка психомоторного развития, судорожные приступы и лейкомаляция проявляются в раннем детском возрасте и являются причиной раннего летального исхода [76]. Во взрослом возрасте симптомокомплекс более разнообразен и, как правило, выражается в парезах, параличах, нарушении мышечной координации и глотания [77]. На молекулярном уровне в астроцитах происходит накопление экстремальных количеств белка GFAP, что ассоциировано с ингибированием протеасом, активацией стресс-киназ и mTOR, потерей способности астроцитов поддерживать гомеостаз калия и глутамата [78]. При гистологическом анализе обнаруживается увеличение размеров астроцитов и включение волокон Розенталя в клетках [77] [78]. Области мозга, содержащие в норме наибольшее количество GFAP, при болезни Александера поражаются наиболее часто [78]. Некоторые виды эпилепсии также сопровождаются изменением морфологии астроцитов, дисфункцией щелевых контактов между глиальными клетками, пониженной экспрессией ионных каналов K<sub>ir</sub>4.1 и водных каналов, дислокацией водных каналов, дисфункцией транспортеров глутамата и работы глутаматсинтазы, вследствие чего нарушается поддержание гомеостаза калия в нервной ткани, происходит накопление токсических доз глутамата и развитие судорожных приступов [79]. Снижение экспрессии транспортеров глутамата и мутации в белках натрий-калиевой помпы в астроцитах ассоциированы с семейной гемиплегической мигренью [80].

Ряд нейродегенеративных заболеваний (амиотрофический латеральный склероз, болезнь Альцгеймера, токсические энцефалопатии) сопровождается значительной дегенерацией астроцитов мозга, проявляющейся морфологическими изменениями и снижением плотности глиальных клеток [81, 82] [6]. Считается, что среди прочих дисфункций нарушение регуляции глутаматергической передачи в результате патологии астроцитов вносит основной вклад в нейродегенеративные процессы [6]. Исследования посмертных образцов мозга пациентов с психическими заболеваниями, такими как шизофрения, большое депрессивное расстройство, биполярное аффективное расстройство выявляют как патологическое снижение численности астроцитов в различных структурах мозга (префронтальная кора, амигдала), так и снижение экспрессии GFAP, AQP4 астроцитами [83-85]. При синдроме Вернике-Корсакова, прогрессирующей сопровождающемся дегенерацией таламо-кортикальных нейронов, помимо атрофии астроцитов наблюдается значительное снижение экспрессии транспортеров глутамата ЕААТ1/2, глутаминсинтазы и GAT3, транспортера ГАМК [74].

Реактивный астроглиоз – неспецифический процесс, включающий активацию астроцитов и их пролиферацию, наблюдается при многих патологических состояниях ЦНС. Определение астроглиоза было предложено Софрониевым (Sofroniew) в 2009 году и включает четыре основных признака: (1)

реактивные астроциты претерпевают спектр молекулярных, клеточных И функциональных изменений при всех патологиях ЦНС, (2) степень изменений реактивных астроцитов зависит от тяжести основного патологического процесса, (3)реактивных астроцитов регулируются изменения внеклеточными И внутриклеточными сигнальными молекулами И (4) изменения. которые претерпевают астроциты при смене фенотипа на реактивный, влияют на выполнение клеточных функций астроцитами, что может оказывать как благоприятный, так и негативный эффекты на клетки окружения [86].

время Долгое астроглиоз считался исключительно патологическим процессом, усугубляющим течение основного заболевания/повреждения ЦНС. Согласно современным представлениям реактивный астроглиоз рассматривается эволюционно консервативный защитный механизм репрограммирования как астроцитов, направленный на усиление трофической поддержки нейронов и нейропротекции в условиях патологии, ограничение повреждённой области от здоровой ткани, реконструкцию повреждённого ГЭБ и обеспечение регенерации нейронных связей [41]. Супрессия астроглиоза ведёт к торможению регенерации нервной ткани и усиливает повреждение ЦНС [87]. Активация астроцитов сопровождается продукцией плеяды реактивных фенотипов, демонстрирующих значительные различия в экспрессии генов в зависимости от патологического стимула [41, 88]. Так, недавние исследования транскриптома выявили два молекулярных фенотипа А1 и А2, характерные для реактивных астроцитов. Для эндотоксин-индуцированных реактивных астроцитов типа А1 был показан специфический паттерн экспрессии группы генов, ассоциированных с нейротоксическим действием, в то время как ишемия стимулировала появление астроцитов типа А2 с нейропротективным паттерном экспрессии [88] [89, 90]. Впрочем, в дальнейших исследованиях некоторых нейродегенеративных заболеваний, таких как боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона, ни для одного гена-маркёра астроцитов типа А1 не было найдено достоверного уровня экспрессии, что ставит под сомнение применение подобной классификации [90]. По другой градации, основанной на

изучении структуры клеток, пролиферативного статуса и межклеточных взаимодействий, реактивные астроциты можно условно поделить на пролиферирующие клетки, образующие новую ткань, ограничивающую участок повреждения, и на непролиферирующие клетки, сохраняющие основы клеточной тканевой архитектуры И функциональных взаимодействий. структуры, характерных для астроцитов здоровой ткани [90]. Для астроцитов первой группы помимо повышенной пролиферации характерна выраженная гипертрофия, перекрытие отростков клеток между собой, размывание границ отдельной клетки. В серьёзных случаях в результате ишемического инсульта, травмы спинного травмы головного мозга, и при различных нейродегенеративных мозга. патологиях образуется глиальный «рубец», который, поддерживая репарацию ЦНС в острой фазе повреждения за счёт изоляции повреждённого участка мозга от здоровых тканей, в дальнейшем на поздних стадиях и при хронических процессах затрудняет регенерацию аксонов нейронов, оказывая неблагоприятный эффект на ЦНС [8].

На морфологическом уровне при реактивном астроглиозе наблюдается повышение содержания волокон GFAP-виментин [91]. Повышенная экспрессия GFAP служит специфическим маркёром глиоза [92]. Многие цитокины и ростовые факторы, секретируемые всеми типами клеток ЦНС при патологии ЦНС, способны запускать реактивный астроглиоз, среди них интерлейкины IL-1β, IL-6, фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерферон  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), фактор ингибирования лейкемии (LIF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), онкостатин M, факторы роста фибробластов (FGF-2, FGF-8), трансформирующие факторы роста (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) и т.д. (Рисунок 2) [61]. Помимо цитокинов разнообразные другие стимулы, такие как гипоксия, липополисахарид (компонент бактериальной стенки), нейромедиаторы норадреналин и глутамат, факторы окислительного стресса, пурины, сывороточные белки могут индуцировать реактивную активацию астроглии [61, 86]. При ишемическом инсульте, развивающемся в результате закупорки мозговой артерии тромбом, астроциты активируются в течение нескольких часов [93]. Приобретение реактивного фенотипа астроцитами ассоциировано с запуском разнообразных внутриклеточных сигнальных путей, активацией сигнальных молекул и транскрипционных факторов, таких как STAT3, STAT2, JAK2, NF-кB, IRAK и др. [5]. Некоторые признаки реактивного фенотипа, например, пролиферация, могут регулироваться множеством сигнальных путей, в то время как другие аспекты регулируются более специфично [94, 95] [5].

Активированные астроциты в свою очередь секретируют плеяду провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и хемокинов, среди которых IL-1β, IL-6, IL-10, INF-γ, CXCL1, CXCL9, CXCL10, TNF-α, CCL2, CCL3 и др., оказывая влияние на соседние клетки [96, 97]. При реактивном астроглиозе повышается экспрессия и секреция S100B, маркёра астроцитов, который, являясь нейропротектором в низких концентрациях, оказывает нейротоксический эффект в высоких концентрациях [97]. Повышение уровня S100B в биологических жидкостях ассоциировано с патологиями ЦНС и может служить маркёром повреждения в острой фазе [98] [99].



Рисунок 2. Внешние стимулы, запускающие астроглиоз, и активируемые внутриклеточные регуляторы. Модифицировано из [52].

Реактивные астроциты играют ключевую роль в предупреждении отёка мозга, возникающего на фоне ишемического и гемморагического инсультов, травмы головного мозга. В результате недостатка поступления кислорода и АТФ работа Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы в мембране нарушается астроцитов, происходит повышение осмотического внутриклеточного давления, что приводит к набуханию клеток за счёт избыточного поступления воды [93]. Набухшие астроциты способны к регуляторному снижению клеточного объёма за счёт секреции осмотически-активных молекул BO внеклеточное пространство, противодействуя развитию отёка [93].

Реактивная астроглия активно участвует в восстановлении нервной ткани при ишемическом повреждении. Реактивные астроциты секретируют нейротрофические факторы, среди которых фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор мозга (BDNF), нейротрофин 3 (NT-3), эритропоэтин (EPO), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста инсулина (IGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), а также белки семейства SPARC, гевин, эфрин А5, глипиканы 4 и 6, тромбоспондины 1/2, таким образом выживаемость нейронов, синаптогенез И функциональное стимулируя восстановление нервной ткани после инфаркта [97].

Таким образом, астроглия представляет собой важный регуляторный элемент ЦНС, выполняя множество функций в норме и при патологии. Дисфункция астроглии в результате дегенерации, мутаций, гибели клеток и выраженный реактивный астроглиоз наблюдаются при многих патологических состояних ЦНС, в том числе при ишемическом инсульте, усугубляя течение основного заболевания. Поиск стимулов, вызывающих астроглиопатии, и исследование запускаемых патологических процессов в астроцитах расширяют текущие представления об особенностях функционирования ЦНС в условиях повреждения и открывают новые возможности для разработки терапии, направленной на лечение, предотвращение, либо облегчение симптомов неврологических состояний.

#### 1.2. Структура и функции тромбина и его рецепторов

Воспаление тканей, наблюдаемые И репарация при ишемии, сопровождаются активацией системы свёртывания и накоплением сериновых повреждения [100]. Тромбин, мультифункциональная протеаз В участке трипсиноподобная сериновая протеаза, является ключевым фактором в каскаде свёртывания крови. В кровотоке тромбин циркулирует в форме неактивного предшественника - протромбина. Протромбин синтезируется в печени и представляет собой белок массой 72 кДа [101]. Образование тромбина происходит локально в участках повреждения сосудов и тканей в результате протеолиза протромбина активированным фактором Х [102]. Период полураспада тромбина в человеческой плазме крайне короткий и составляет около минуты, в течение которой тромбин инактивируется ингибиторами сериновых протеаз, такими как антитромбин III [103].

В рамках системы гемостаза тромбин активирует тромбоциты, факторы V, VIII, XI, XIII, протеин C, тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза (TAFI) [104]. Тромбин протеолитически расщепляет фибриноген крови до фибрина, мономеры которого, полимеризуясь, образуют фибриновый сгусток [101]. Помимо участия в каскаде свёртывания тромбин вовлечён во многие физиологические и патофизиологические процессы, такие как воспаление, цитопротекция, пролиферация, апоптоз, регенерация тканей, канцерогенез, атеросклероз, сепсис и нейродегенеративные состояния [105]. Реализация множества функций тромбина, подчас противоположных, обеспечивается особой структурой белка (Рисунок 3).



Рисунок 3. Строение молекулы тромбина. На рисунке обозначен активный центр (синий), экзосайт I (циан), экзосайт II (лиловый), 60-петля (зелёный) и γ-петля (жёлтый). Модифицировано из [102].

Тромбин (37 кДа) представляет собой большую, сферическую молекулу, состоящую из двух полипептидных цепей А и В [106]. Молекула содержит активный центр, обрамлённый петлями 60 и γ, два анионсвязывающих экзосайта и петлю с сайтом связывания Na<sup>+</sup>, предназначенных для связывания субстратов, ингибиторов, кофакторов и Na<sup>+</sup>, модулирующих действие тромбина [102]. Экзосайт I узнаёт фибриноген, фибрин, фактор Va, тромбомодулин и гирудин, в то время как экзосайт II связывает гликозаминогликаны, включая гепарин сульфат и гликопротеин Іbα [105]. Использование кофакторов не только расширяет специфичность молекулы, но и усиливает её каталитическую эффективность в отношении различных субстратов [102]. Связывание экзосайтов с кофакторами и ингибиторами обеспечивает плейотропность функций тромбина. Регуляцию внутриклеточных сигнальных каскадов тромбин реализует через особый тип рецепторов, активируемых протеазами – PAR1, 3, 4.

#### 1.2.1. Рецепторы, активируемые протеазами

Рецепторы PAR принадлежат к семейству рецепторов, сопряжённых с Gбелками, для которых характерно наличие одной полипептидной цепи с семью трансмембранными доменами, соединённых внутри- и внеклеточными петлями [107]. Внутриклеточные петли связаны с субъединицами Gaßy [107]. Механизм активации PAR уникален (Рисунок 4). Внеклеточный N-конец рецептора содержит сайт, который сериновая протеаза распознает и протеолитически расщепляет с образованием нового короткого N-конца - «привязанного лиганда» [108] [109]. «Привязанный лиганд» взаимодействует с консервативной последовательностью 2-ой внеклеточной петли рецептора, активируя его и запуская внутриклеточные сигнальные каскады [108] [109] [110]. Активированный рецептор быстро интернализуется и подвергается деградации в лизосомах.



Рисунок 4. Схема активации рецептора РАR. Сериновая протеаза расщепляет N-конец рецептора по специфическому сайту (обозначен красной стрелкой) с образованием нового укороченного N-конца – «привязанного лиганда». «Привязанный лиганд» взаимодействует с консервативной последовательностью 2-ой внеклеточной петли, активируя рецептор. Наличие

гирудин-подобной последовательности усиливает аффинность рецептора к тромбину. Модифицировано из [110].

Рецепторы PAR экспрессируются различными типами клеток, среди которых фибробласты, эндотелиоциты, кератиноциты, тучные клетки. тромбоциты, гладкомышечные клетки, моноциты и Т-лимфоциты [110]. На сегодняшний день известно четыре типа рецепторов PAR – PAR1-4. Тромбин способен взаимодействовать с PAR1, 3, 4, в то время как PAR2 активируется трипсином, триптазой и активированным фактором X [108]. PAR1, называемый также рецептором тромбина, является наиболее изученным рецептором, через который тромбин реализует свои эффекты. N-конец рецептора содержит заряженную гирудин-подобную отрицательно последовательность, взаимодействующую с анионсвязывающим экзосайтом I тромбина, и сайт расщепления протеазой. PAR1 и PAR3 высокоаффинно взаимодействуют с тромбином, активируясь при концентрациях протеазы <5 нМ, в то время как PAR4 является низкоаффинным и требует для активации значительно больших концентраций сериновой протеазы (>10 нМ), которые наблюдаются при патологических состояниях организма [111]. Низкая аффинность PAR4 к тромбину объясняется отсутствием гирудин-подобной последовательности в области N-концевого сайта расщепления PAR4. Тромбин не является единственным агонистом PAR1, так как рецептор может активироваться и другими протеазами [112, 113].

Тип сигнального каскада, запускаемого при активации РАR, зависит от нескольких факторов, среди которых действующая концентрация лиганда, время экспонирования лиганда, наличие ко-рецепторов на клеточной мембране и структура рецептора в виде гомо/гетеродимера [114]. Совокупность перечисленных факторов определяет, какая из субъединиц Gα - Gα12/13, Gαi/o, Gαq - будет фосфорилирована [114] [111]. Высокие концентрации тромбина эффективнее активируют PAR1, вызывая больший клеточный ответ; короткое экспонирование клеток с низкими концентрациями тромбина стимулирует цитопротекцию, а длительное – апоптоз [105]. При низких концентрациях

тромбина активация PAR1 опосредуется взаимодействием активированного протеина C, связанного с собственным рецептором EPCR, что стимулирует цитопротекторную Gai сигнализацию и активацию малой ГТФ-азы Rac1 с антивоспалительным клеточным ответом [115]. Gβγ активирует фосфоинозитид-3-киназу (РІЗК) [114]. Высокие концентрации тромбина смещают сигнализацию в сторону фосфорилирования субъединиц Gaq и Ga12/13 с последующей активацией малой ГТФ-азы RhoA, стимулирующей перестройку клеточного быть цитоскелета, что В свою очередь может ассоциировано с провоспалительными клеточными процессами и апоптозом [116]. Показано вовлечение адапторных белков β-аррестинов 1 и 2 в сигнализацию через рецепторы PAR [115]. Передача сигнала с участием β-аррестинов может происходить как посредством G-белков, так и по независимому от активации Gбелков механизму. Переключение на независимый от G-белков механизм зависит от множества факторов, в том числе от концентрации лиганда и времени экспозиции.

#### 1.2.2. Функции тромбина в центральной нервной системе

ЦНС Протромбин экспрессируют клетки нейроны, \_ астроглия, олигодендроглия, микроглия, причём его экспрессия особенно выражена в кортексе и в меньшей степени представлена в гиппокампе и мозжечке [117] [118]. Сериновые протеазы протромбин, тромбин, фактор Х и ингибиторы тромбина обнаруживаются в паренхиме мозга [119, 120]. Все четыре типа рецепторов PAR экспрессируются нейронами, микроглией, олигодендроглией и астроглией, благодаря чему тромбин может оказывать воздействие на клетки при патофизиологических состояниях ЦНС [13] [10, 14].

В зависимости от концентрации влияние тромбина на клетки ЦНС может быть как защитным, так и повреждающим [121] [122]. Тромбин в высоких концентрациях обнаруживается в паренхиме мозга при патологических состояниях, ассоциированных с воспалением и повреждением ГЭБ, например, при болезни Альцгеймера, ишемическом и геморрагическом инсульте, травме мозга,

множественном склерозе (МС) и БАС [123, 124]. Тромбин в этих случаях обладает нейротоксическим эффектом, стимулирует гибель нейронов в модели острой фокальной ишемии и усиливает повреждение ГЭБ [16, 17]. Экспрессия РАК в клетках возрастает на фоне инсульта, при болезни Паркинсона, травме [13] [125] [123]. Блокада PAR1 способствовала лучшему восстановлению в модели повреждения спинного мозга [126]. Низкие концентрации тромбина (50 пкМ), напротив, защищают нейроны от гибели в клеточной и животной моделях ишемии [12]. Было обнаружено, что инсульт в лёгкой форме, вызванный короткой окклюзией каротидных артерий, стимулировал толерантность нейронов гиппокампа к тяжёлому инсульту и данный эффект прекондиционирования был опосредован тромбином [12]. Введение низких доз тромбина до инсульта и после облегчало последствия инсульта, уменьшало объём повреждения и отёка мозга [127] [128]. В исследовании Rajput с соавт. было продемонстрировано, что нейроны, подвергшиеся депривации кислорода и глюкозы (КГД), секретировали который через активацию PAR1 на тромбин. астроцитах способствовал нейропротекции, наблюдаемой при обработке низкими дозами тромбина [11].

Тромбин в высоких дозах активирует микроглию и астроглию, стимулирует глиоз и/или апоптоз глиальных клеток, индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов и миграцию клеток [124]. В исследовании Moller с соавт. и Suo с соавт. обработка культуры микроглии тромбином стимулировала пролиферацию клеток, выброс NO, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , COX-2, IL-1 $\alpha/\beta$  во внеклеточное пространство и усиливала экспрессию CD40 [18, 19]. Добавление тромбина к клеткам линии микроглии ВV-2 приводило к секреции IL-1 $\beta$  [20]. Было показано, что провоспалительные эффекты тромбина в отношении микроглии могут быть реализованы через PAR1, 3, 4 [21]. Стоит, однако, отметить, что позднее одна из перечисленных групп исследователей опубликовала работу, согласно которой провоспалительная секреция микроглией вызывается не тромбином, а примесями препарата [129].

Тромбин-опосредованная активация PAR1 вызывала пролиферацию астроцитов и выраженный астроглиоз как *in vitro*, так и *in vivo* [9] [22] [130]. Было

показано, что пролиферация, индуцируемая тромбином, реализуется через запуск разнообразных путей сигнализации, среди которых активация каскадов 1) ERK, JNK/AΦK/HIF-1α, 2) PI3K/Akt/AΦK/HIF-1α, 3) PAR1/PI3K/Akt/ циклин D1 4) PLC/PKC/ERK1/2 5) Rho-киназа/ERK/циклин D1 [9, 131] [132] [22].

Тромбин в низких концентрациях (5-10 нМ), напротив, защищал астроциты от последствий депривации кислорода и глюкозы через PAR1-опосредованный запуск каскада p44/42 MAPK/HSP25 [133]. Активация PAR1 защищала астроциты от гибели путём апоптоза, вызванного стауроспорином [134].

Тромбин стимулирует секрецию астроцитами плеяды цитокинов, АΦК, ростовых факторов, протеаз, хемокинов и аминокислот, среди которых хемокин GRO/CINC-1, VEGF (через активацию PAR1 и киназ p44/42), IL-1β, IL-6, IL-8, CXCL10, MMP-9, D-аспартат, глутамат [135] [136] [137] [138] [139] [140] [130] [141]. Тромбин стимулирует секрецию АТФ и УДФ-глюкозы клетками астроцитомы 1321N1 за счёт подъёма внутриклеточного уровня кальция [142, 143] [144].

## **1.3.** Роль АТФ и пуринергической сигнализации в центральной нервной системе

Аденозинтрифосфат (АТФ) выполняет множество функций, участвуя в энергетическом метаболизме всех живых систем, в нейротрансмиссии, является важным медиатором и модулятором, обеспечивает взаимодействие нейрон-глия, глия-глия, вносит вклад в синаптическую пластичность мозга и т.д. [145] [146] [147] [148]. При патологических состояниях АТФ выступает в качестве значимого универсального образа опасности (DAMP), сигнализирующего о нарушении гомеостаза клетки, её повреждении и запускающего процессы воспаления [149] [26]. Повышение АТФ во внеклеточном пространстве происходит на фоне гипоксии/ишемии нервной ткани, травмы мозга, эпилепсии [23] [24] [150]. Во внеклеточном пространстве АТФ быстро гидролизуется эктонуклеотидазами до аденозиндифосфата (АДФ), аденозинмонофосфата (АМФ) и аденозина. Пурины в высоких концентрациях могут оказывать цитотоксический эффект, вызывая гибель окружающих клеток [151]. Сигнальная функция АТФ реализуется через рецепторы пуринергической системы, экпрессия которых обнаружена на нейронах и глиальных клетках мозга [145]. Среди рецепторов пуринергической системы выделяют несколько семейств: метаботропные рецепторы аденозина P1, ионотропные (катионные) рецепторы P2X и метаботропные P2Y [25, 151]. Известно 7 подтипов рецепторов P2X1-7, функционирующих в форме гомомеров и гетеромеров и активируемых АТФ, и 8 подтипов рецепторов P2Y (1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) с различной лиганд-специфичностью к АТФ (P2Y11), АДФ (P2Y1, P2Y12, P2Y13), УТФ/АТФ (P2Y2, P2Y4), УДФ (P2Y6), УДФ-глюкоза (P2Y14) [25, 151].

#### 1.3.1. Секреция АТФ на фоне ишемии

В состоянии покоя содержание в клетке АТФ крайне высоко, достигает 3-10 мМ, что позволяет обеспечивать протекания множества метаболических и ферментативных реакций [152] [153]. В норме внеклеточная концентрация АТФ и аденозина невысока (нМ) [153]. Благодаря разнице в концентрации АТФ между вне- и внутриклеточным пространством формируется значительный концентрационный градиент, направленный из клетки наружу, поэтому любое нарушение целостности клеточной мембраны сопровождается мощным выходом АТФ в интерстиций [152]. Показано, что при воспалении содержание АТФ во внеклеточном пространстве возрастает многократно, достигая концентрации мкмоль/л и ммоль/л [26].

В работе Juranyi с соавт. был впервые продемонстрирован выброс тритиймеченого АТФ в срезах гиппокампа крысы в ответ на гипоксию и гипогликемию [154]. Позднее Frenguelli с соавт., применив специальные биосенсоры, на модели кислород-глюкозной депривации (КГД, модель ишемии in vitro) в режиме реального времени зафиксировали повышение концентрации внеклеточного АТФ в срезах гиппокампа до уровней порядка 700 нМ во время реоксигенации через 1-2 минуты после распространения аноксической деполяризации, с достижением пика 1.8 мкМ В течение некоторого времени после реоксигенации

(постишемический пик) [155] [24]. Melani с соавт., применив метод микродиализа-HPLC, показали рост концентрации АТФ в стриатуме крысы на фоне окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА), что стало первым свидетельством индуцированного ишемией выброса АТФ *in vivo* [23]. При использовании ингибиторов эктонуклеотидаз концентрация АТФ в интерстиции достигала значений порядка 700 нМ через 20-24 часа от начала ОСМА [156]. Введение крысам пиродаксальфосфат-6-азофенил-2,4-дисульфоновой кислоты (PPADS), неселективного антагониста рецепторов P2X и P2Y, до ишемии и в течение нелели значительно улучшало неврологические после ишемии последствия, снижая их тяжесть, и способствовало уменьшению объёма зоны инфаркта [157].

Астроциты являются основным источником пуринов в нервной ткани [158] [151]. В нейронах и глиальных клетках АТФ запасается в секреторных и синаптических везикулах. На фоне ишемии и других патологий секреция АТФ во внеклеточное пространство может осуществляться активными механизмами, такими как кальций-зависимый экзоцитоз, лизосома-зависимый экзоцитоз, транспорт через каналы, образованные коннексинами Сх43, паннексинами Panx1, транспорт через большую пору активированного рецептора P2X7 [159] [160] [161] [162] [163] [164]. Существует мнение, что специфические пути выброса АТФ вероятно могут вносить больший вклад в поддержание его высокого уровня во внеклеточном пространстве при повреждении ЦНС по сравнению с пассивным оттоком из клеток, подвергшихся некрозу [25].

#### 1.3.2. Участие АТФ в реактивном астроглиозе

Роль АТФ в активации астроцитов интенсивно исследовалась с начала 90-х годов прошлого века. В результате работ нескольких групп исследователей на культурах астроцитов кортекса и стриатума крысы было установлено, что АТФ и его структурные аналоги способны стимулировать гипертрофию астроцитов, элонгацию GFAP-позитивных отростков (stellation в англоязычной литературе) и пролиферацию клеток путём активации ERK1/2 и транскрипционного фактора

STAT3 [165-169] [170] [171] [172] [173]. Признаки астроглиоза были обнаружены *in vivo* при активации пуринергических рецепторов 2-ого типа (P2) прилежащего ядра. Введение структурного аналога АТФ 2-метилтио-АТФ (2-MeSATP) в прилежащее ядро крысы усиливало выраженность астроглиоза, индуцированного повреждением ткани в результате микроинъекции [174]. Предположительно, основную роль в обеспечении характерных для реактивного астроглиоза эффектов in vitro и in vivo играют метаботропные рецепторы P2Y [173]. Использование специфичных агонистов рецепторов Р2Х и Р2У при введении в прилежащее ядро крысы показало преимущественное вовлечение Р2У в процессы реактивной активации астроцитов [175]. Активирование рецептора Р2У1 агонистом АДФ усиливало реакцию астроглии на травматическое повреждение и было ассоциировано С запуском сигнального каскада PI3K/Akt [176]. Интрацеребровентрикулярное введение MRS2365, синтетического агониста P2Y1, стимулировало фосфорилирование Rel-A (NF-кB, p65) и увеличивало объём инфаркта после транзиентной ОСМА, в то время как инфузия специфического антагониста P2Y1, MRS2179, напротив, способствовала уменьшению объёма зоны инфаркта, улучшала моторную координацию, снижала фосфорилирование Rel-A и экспрессию провоспалительных цитокинов/хемокинов IL-6, TNF-а, CCL2, CXCL10 [177]. Микроглия может модулировать пролиферативный эффект нуклеотидов на астроциты через регуляцию активности Р2У1, 12 [178] [179] [180].

АТФ и его производные потенциируют провоспалительные эффекты IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , усиливая активацию Rel-A, AP-1, синтез PGE2 [31, 181]. АТФ способен модулировать пролиферативное действие FGF-2 на астроциты [182-185]. АТФ в низких концентрациях усиливал пролиферацию кортикальных астроцитов, индуцированную FGF-2, через активацию P2Y, в то время как рецептор P2X7, активируемый высокими концентрациями АТФ, напротив, блокировал пролиферативное действие FGF-2 [182]. Усиление синтеза ДНК в культуре астроцитов наблюдалось при обработке клеток комбинацией АТФ с FGF-2, но не

происходило при внесении АТФ на фоне тромбоцитарного ростового фактора (PDGF) и EGF [185].

В целом, из анализа большого пласта научных работ за период 1990-2021 гг., посвящённых изучению эффектов АТФ, его аналогов, метаболитов и вовлечения различных типов рецепторов пуринергической системы в обеспечение астроглиоз-подобных эффектов, можно сделать ряд следующих заключений. Пролиферативные и иные эффекты АТФ, характерные для реактивного астроглиоза, могут обеспечиваться продуктами гидролиза АТФ, например, АДФ. Это особенно актуально для работ, где не использовали стабильные аналоги АТФ. На вовлечение АДФ в проведение астроглиоз-подобных эффектов указывает массив литературных данных, свидетельствующих об активации Р2Ү1 (агонист АДФ) при астроглиозе. Эффекты АТФ зависят от концентрации: низкие дозы АТФ вероятно оказывают астроглиоз-подобное стимулирующее действие на астроциты, в то время как высокие концентрации АТФ вызывают некроз/апоптоз Пролиферативное действие обеспечивается главным образом астроцитов. метаботропными рецепторами Р2Ү (медленный эффект), в то время как некроз/апоптоз – ионотропными Р2Х (быстрый эффект).

#### 1.3.3. Рецепторы Р2 в патологии астроглии

Рецепторы Р2 делятся на ионотропные Р2Х и метаботропные Р2Ү [186]. Ионотропные Р2Х1-7 неселективно проницаемы для катионов Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, функционируют в форме гомо- и гетеромеров и активируются АТФ [187]. Метаботропные рецепторы Р2Ү обладают различной лиганд-специфичностью к пуринам и пиримидинам, преимущественно ассоциированы с Gq/11 и их активация запускает каскады, приводящие к образованию инозитолтрифосфата (IP3) и выбросу кальция из внутриклеточного депо [188] [186]. Астроциты экспрессируют широкий спектр пуринорецепторов Р2Х и Р2Ү [27, 189] [190]. В исследовании Fisher с соавт. на культуре кортикальных астроцитов крысы была показана преимущественная экспрессия рецепторов Р2Х4, Р2Х6, Р2Х7 и Р2Ү1, 2 [27].

#### 1.3.3.1. Рецепторы семейства Р2Х

Рецепторы Р2Х1-7 состоят из трёх субъединиц, образуя тример, либо гексамер в случае двух связанных тримеров [191] [192] [186]. Каждая субъединица имеет внутриклеточный короткий N-конец, внутриклеточный Сконец, длина которого варьируется, и два трансмембранных участка TM1 и TM2, образующие ворота канала (TM1) и пору канала (TM2) [186]. Большая часть рецептора представлена крупным внеклеточным гликозилированным и богатым цистеинами эктодоменом [192]. С-конец регулирует функции рецептора и вовлечён в проведение сигнализации, обеспечение клеточной локализации рецептора и белок-белковых взаимодействий [193]. Общее строение субъединицы P2X без N- и C- доменов напоминает по форме дельфина, выпрыгивающего из океана, где внеклеточный домен представляет собой голову и туловище морского млекопитающего над водой, а трансмембранный домен соответствует хвосту, опущенному в воду (Рисунок 5) [194] [195]. Атомная структура субъединицы Р2Х в комплексе с АТФ была расшифрована для Р2Х4 данио рерио [195]. Согласно модели АТФ-связывающий сайт расположен на краю АТФ-связывающего кармана и состоит из 10 аминокислотных остатков каждых двух смежных субъединиц в тримере: 4 гидрофильных остатка (Lys70, Lys72, Thr189, Lys193) и последующие 3 гидрофобных остатка (Leu191, Leu217, Ile232) одной субъединицы и 3 гидрофильных остатка (Asn296, Arg298, Lys316) соседней субъединицы [195, 196]. Мотив из 7 гидрофильных аминокислот сохранён в рецепторах млекопитающих и было показано, что его наличие является ключевым для активации рецептора P2X7 при взаимодействии с агонистом АТФ [196].


Рисунок 5. Структура субъединицы Р2Х4.1 данио рерио. А) Дельфинподобная структура субъединицы Р2Х4.1 данио рерио при закрытом состоянии рецептора. Б) Чашеообразная модель строения тримерного рецептора Р2Х7 человека в закрытом состоянии, вид параллельно клеточной мембране. Каждая субъединица обозначена отдельным цветом. ВКП – внеклеточное пространство, ТМП – трансмембранное пространство. В) Структура Р2Х7 человека в закрытом состоянии, вид со стороны внеклеточного пространства на мембрану. Г) Структура Р2Х7 человека в открытом состоянии, вид со стороны внеклеточного пространства на мембрану. Обозначены три молекулы АТФ, активирующие рецептор, и открытие канала, проницаемого для катионов. Модифицировано из [196].

Рецепторы Р2Х существуют в форме гомомеров и гетеромеров (Р2Х2/3, Р2Х1/2, Р2Х1/5, Р2Х2/6, Р2Х4/6, Р2Х1/4) [197].

# 1.3.3.1.1. Рецепторы Р2Х1-6

В последние десятилетия при исследовании заболеваний нервной ткани в контексте пуринергической сигнализации основное внимание фокусируется на рецепторах Р2Х7 и Р2Ү1. Активация Р2Х7 и Р2Ү1 наблюдается в большинстве патологических ситуаций, связанных с выбросом больших количеств АТФ из клеток, и в многочисленных научных работах показан вклад именно данных

подтипов рецепторов семейства P2 в течение нейропатологий, ассоциированных с астроглиопатиями. Сравнительно мало сведений доступно о роли других рецепторов P2X1-6 при патологиях астроглии, что видимо объясняется тем, что данные рецепторы в основном выполняют свои функции в здоровой нервной ткани и активируются небольшими количествами АТФ (EC50=1-10 мкМ) [198]. Кроме того, для большинства рецепторов P2X не существует селективных агонистов, что также затрудняет исследования вклада конкретного рецептора в те или иные процессы [186].

Экспрессия рецепторов P2X1 была показана для астроцитов кортекса, гиппокампа, прилежащего ядра, мозжечка [199] [200] [201] [202]. Повреждение прилежащего ядра в исследовании *in vivo* на крысах приводило к повышению плотности P2X1, а также рецепторов P2X2-4 и P2X7 на поверхности астроцитов в области воспаления [199]. Повышение экпрессии рецепторов P2X1, P2X2 и P2X4 наблюдалось в срезах гиппокампа при депривации глюкозы и кислорода [203, 204]. Блокада P2X1 ингибитором TNP-ATP (антагонист P2X1-3) в свою очередь вызывала снижение экспрессии P2X1 и защищала клетки от гибели, вызванной ишемией [203]. В исследовании Wang с соавт. была обнаружено, что выброс АТФ астроцитами с последующей активацией P2X2 префронтальной коры модулирует поведенческие признаки, характерные для расстройств аутистического спектра [205].

Для рецептора P2X3 было обнаружено, что его экспрессия астроцитами ствола может быть ассоциирована повышенной болевой мозга с чувствительностью при невропатиях [206, 207]. Плотность рецепторов, локализованных преимущественно на отростках астроцитов, и количество отростков возрастали при хроническом пережатии инфраорбитального нерва, в модели черепнолицевой невропатической боли [207]. Введение ингибитора mGluR5 способствовало снижению плотности P2X3 и выраженности болевой чувствительности [207]. Применение антагонистов Р2ХЗ, а также блокада Р2Х4 и Р2Х7 ведёт к уменьшению боли, вызванной невропатией [208].

Рецептор Р2Х4 широко экспрессируется в ЦНС нейронами и нейроглией, а также клетками сетчатки глаза, в периферической нервной системе Р2Х4 экспрессируется шванновскими клетками [209, 210] [211] [212]. При стимуляции высокими дозами АТФ рецептор Р2Х4, а также Р2Х2 способны образовывать пору подобно рецептору Р2Х7 [213]. В многочисленных исследованиях было продемонстрировано, что активация Р2Х4 преимущественно на микроглии играет ключевую роль в развитии невропатической боли и активации фагоцитоза [214, 215] [216] [217] [218] [219]. Активация Р2Х4 в реактивной микроглии спинного мозга вызывала тактильную аллодинию на фоне повреждения нерва у крыс и была достаточна для формирования тактильной аллодинии у здоровых животных [220]. Гипоксия и депривация глюкозы были ассоциированы с повышением экспрессии рецепторов Р2Х4 и Р2Х7 в астроцитах гиппокампа [221].

Особенностью рецептора P2X5 является низкая амплитуда тока после активации АТФ по сравнению с токами, возникающими при активации рецепторов P2X1, 2, 3, 4 [186]. Вместе с субъединицей P2X1 рецептор P2X5 образует функциональный гетеротример P2X1/5, экспрессия которого характерна для глиальных клеток [222]. На кортикальных астроцитах мыши было показано, что его активация сопровождается временным повышением концентрации кальция в цитоплазме клетки, и, полагают, что в связке с рецептором NMDA данный гетеротример играет роль в обеспечении взаимодействия нейронастроглия [223].

Субъединицы Р2Х6 не способны образовывать стабильных тримеров и функционируют только в виде гетерополимеров, образуя гетерорецепторы с Р2Х2 и Р2Х4 [224] [186]. Для астроцитов показано наличие транскриптов Р2Х6, однако данные о наличии на мембране и функциональной роли возможных гетерорецепторов отсутствуют [201] [189] [200] [27].

# 1.3.3.1.2. Рецептор Р2Х7

Рецептор Р2Х7 является уникальным в семействе Р2, поскольку остаётся неактивным в нормальных физиологических условиях и активируется

сравнительно высокими концентрациями АТФ (0.1-1 мМ) при патологических состояниях ЦНС [25]. В ЦНС наиболее высокая экспрессия Р2Х7 наблюдается в клетках микроглии, астроглии и олигодендроглии, возрастая многократно при нейровоспалении [187]. Экспрессия Р2Х7 в астроцитах возрастает после травмы мозга [199, 225]. Вклад рецептора Р2Х7 в патогенез был обнаружен при болезни Паркинсона, эпилепсии, БАС, МС, болезни Альцгеймера, травмах мозга и ишемии [226-233]. Наличие функциональных рецепторов Р2Х7 в нейронах остаётся спорным [231, 234].

Кратковременное воздействие АТФ стимулирует быстрое открытие ионного канала P2X7, проницаемого для катионов Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup> [193] [187]. Пролонгированная экспозиция рецептора к высоким дозам АТФ приводит к формированию огромной поры в мембране, способной пропускать молекулы размером до 900 Да, что сопровождается массивным высвобождением АТФ, глутамата и других молекул из клетки и накоплением высоких концентраций кальция внутри клетки. Это, в итоге, стимулирует развитие воспаления, эксайтотоксичности и заканчивается клеточной гибелью путём апоптоза [188] [237]. [235, 2361 Существует несколько теорий, объясняющих предположительные механизмы образования поры: 1) пора образуется в результате расширения исходного ионного канала и 2) пора формируется независимыми от ионного канала молекулами, рекрутированными в результате активации Р2Х7 [238]. Активация рецептора Р2Х7 сопровождается вовлечением паннексиновых каналов, по которым АТФ и другие молекулы начинают поступать во внеклеточное пространство, усугубляя ситуацию [239].

Полноразмерный ген Р2Х7 был впервые клонирован из библиотеки кДНК мозга крысы [240] и показал 35-40% гомологии с генами других рецепторов Р2Х, являясь максимально отличным от всех членов семейства [241]. Размер субъединицы Р2Х7 у млекопитающих составляет 595 аминокислот, что является наибольшим среди субъединиц Р2Х [242]. Было идентифицировано несколько изоформ Р2Х7, образуемых в результате альтернативного сплайсинга у человека и у грызунов, среди которых есть и функциональные, как, например,

изоформы P2X7A P2X7B [193]. человеческие И Аминокислотная субъединицы P2X7 96% последовательность человека на идентична последовательности субъединицы рецептора обезьяны (макака резус) и на 78-85% идентична последовательностям рецепторов собаки, крысы, мыши и морской свинки [196]. С-конец субъединицы Р2Х7 содержит на 70-220 больше аминокислотных остатков, чем субъединицы остальных рецепторов Р2Х, что делает его значительно более длинным [196].

Рецептор Р2Х7 существует в виде гомотримера и на сегодняшний день нет убедительных сведений о его функционировании в форме гетерорецептора, хотя в некоторых работах была показана колокализация и совместная коиммунопреципитация с рецептором Р2Х4 [187].

2',3'-О-(бензоил-4-бензоил)-АТР (бензоил-АТФ, бзАТФ) является наиболее мощным, но неселективным агонистом Р2Х7 и часто используется в исследованиях данного рецептора [186]. Активность агониста в отношении Р2Х7 в 10-30 раз превосходит активность АТФ [240]. Однако бензоил-АТФ способен активировать и другие подтипы P2, например, P2X1 и P2X3, а также метаболизироваться до производных аденина [237] [186]. Антагонистов, блокирующих Р2Х7, на сегодня разработано и известно значительно большее Среди ортостерических ингибиторов, блокирующих количество. центры связывания рецептора с АТФ, к наиболее активным и специфичным в отношении Р2Х7 относят производные тетразолия (А438079, А839977) и цианогуанидина (A740003, A804598) [237, 243]. Бриллиантовый синий G (BBG) является более древним и наиболее популярным ингибитором, относящемся к классу аллостерических антагонистов, используемым для блокады Р2Х7, который тем не менее способен блокировать другие рецепторы Р2 (Р2Х1, Р2Х4) и натриевые [237, 244]. Использование животных, нокаутных по Р2Х7, в каналы экспериментах *in vivo* также сопряжено с некоторыми нюансами. По крайней мере Т-лимфоциты у двух линий коммерчески доступных мышей, нокаутных по P2X7, созданных GlaxoSmithKline и Pfizer, экспрессируют P2X7 [237]. Все

подобные факты, касаемые агонистов, антагонистов и мышей-нокаутов, следует учитывать при критическом анализе исследований, посвящённых Р2Х7.

Рецептор P2X7 является одним из ключевых драйверов воспаления в ЦНС. Опосредуемый Р2Х7 иммунный ответ, секреция провоспалительного цитокина IL-1β микроглией, тщательно описан в литературе [245] [246]. Стимуляция микроглии липополисахаридом, иммуногенным компонентом бактериальной стенки, активирует толл-подобные рецепторы (TLR4) и аккумуляцию про-IL-1β в цитоплазме клетки, а стимуляция Р2Х7 агонистом АТФ вызывает формирование инфламмасомы NLRP3 (NOD-, LRR И пирин-содержащий белок 3). многобелкового олигомерного комплекса. ответственного развитие за воспалительной реакции [193, 246, 247]. Образование инфламмасомы стимулирует переход про-каспазы-1 в каспазу-1, которая в свою очередь путём протеолиза превращает неактивные субстраты про-IL-18 и про-IL-18 в зрелые цитокины IL-1β, IL-18, секретируемые микроглией [247]. Активированная микроглия является основным источником IL-1β в ЦНС и его образование ингибируется применением антагонистов P2X7 [248]. Помимо секреции IL-1β микроглия продуцирует и другие провоспалительные цитокины, среди которых IL-6 и TNF-α, по независимым от инфламмасом механизмам.

В литературе встречается противоречивая информация по поводу секреции астроцитами IL-1β на фоне активации Р2Х7. В исследовании Gustin с соавт., выполненном культурах астроцитов мышей линии C57BL/6JolaHsd, на сообщается про отсутствие формирования комплекса NLRP3 и секреции IL-1β праймированной астроглией при стимуляции разными активаторами образования инфламмасомы: ATФ (1мМ), нигерицином, уратом натрия, гидроксидом алюминия [249]. Гиппокампальные астроциты крысы, праймированные ЛПС, экспрессировали незрелый про-IL-1β, но не способны были его процессировать и секретировать зрелый IL-1β при активации P2X7 [250]. Позднее той же группой исследователей было показано. что кортикальные астроциты крысы, праймированные ЛПС и стимулированные АТФ (1 мМ), в отличие от астроцитов гиппокампа способны секретировать зрелый IL-1β. Образование IL-1β в данном

случае катализируется каспазой-1, чья активность возрастает на фоне обработки АТФ и, по-видимому, обусловлена сборкой инфламмасомы [30].

Для астроцитов описана секреция разнообразных других провоспалительных цитокинов при стимуляции рецепторов Р2Х7 [248] [193]. Нестимулированные астроциты человека в культуре экспрессируют 8 цитокинов, среди которых G-CSF, GM-CSF, GRO-а (CXCL1), IL-6, IL-8 (CXCL8), CCL2, MIF и Serpin E1 [251]. В ЦНС астроциты являются главным источником IL-6 [252]. Прямая или косвенная активация рецептора Р2Х7 в астроцитах верхушки зрительного нерва и в астроцитах спинного мозга стимулировала экспрессию и секрецию IL-6 клетками [253], [254], [255]. В более ранних исследованиях было показано, что обработка культуры гиппокампальных астроцитов бензоил-АТФ вызывала экспрессию CCL2, хемокина, ответственного за инфильтрацию лейкоцитов в нервную ткань при воспалении [256]. Применение антагонистов Р2Х7 блокировало данный эффект [256]. Пролонгированная инкубация клеточной линии глиомы C6 с бензоил-АТФ усиливала экспрессию хемокинов CCL2, IL-8 и ростового фактора VEGF [257].

Фетальные астроциты человека содержат низкий уровень рецепторов Р2Х7 [29]. Их стимуляция бензоил-АТФ вызывала лишь небольшой всплеск кальция внутри клеток [29]. Однако добавление бензоил-АТФ к астроцитам, которые были предварительно активированы IL-1β, вызывало значительное увеличение концентрации кальция внутри клеток и формирование поры Р2Х7 [29]. Обработка клеток IL-1β сама по себе стимулировала экспрессию P2X7 и его экспонирование на клеточной мембране [29]. Любопытно, что также возрастала экспрессия Р2Х4 на фоне стимуляции, хотя и в меньшей степени по сравнению с Р2Х7 [29]. Обработка клеток бензоил-АТФ в разных концентрациях усиливала продукцию NO активированными IL-1β астроцитами [29]. Модулирование провоспалительных эффектов IL-1β рецепторами Р2 подтверждается и в работе Liu с соавт., выполненной на фетальных астроцитах человека [258]. Показано, что использование неселективных ингибиторов Р2, сурамина и окисленного АТФ (оАТФ), значительно снижало IL-1β-индуцированную продукцию NO, секрецию TNF-α и IL-6, активацию NF-кB и AP-1 в астроцитах [258].

Добавление АТФ (100 мкМ) к культуре астроцитов, предобработанной цитокинами IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\Upsilon$ , значительно усиливало продукцию простагландина 2 [31]. Одиночная обработка АТФ вызывала лишь небольшое увеличение синтеза PGE2 клетками [31]. Однако следует заметить, что используемая концентрация АТФ 100 мкМ является достаточно низкой для активации P2X7, что, как и отсутствие использования в работе более специфических агонистов и антагонистов P2X7, не позволяет говорить о вкладе конкретно данного рецептора в усиление синтеза PGE2.

В литературе существуют сведения 0 противоположных, антивоспалительных эффектах активации Р2Х7. Добавление АТФ 1 мМ, либо бензоил-АТФ (0.1-1 мМ) к кортикальным астроцитам приводило к снижению ЛПС-индуцированной продукции TNF-а клетками, что, как утверждают авторы исследования, не было связано с клеточной гибелью и гидролизом АТФ до аденозина с последующей активацией протекторных рецепторов Р1 [259]. В то же время обработка клеток небольшими количествами АТФ (10-100 микромоль), напротив, способствовала усилению секреции TNF-α [259]. В исследовании Adzic с соавт. обработка культуры астроцитов, праймированных ЛПС, либо ЛПС + IFNγ, различными концентрациями АТФ (5 мкМ-1 мМ) не влияла ни на секрецию IL-1 $\beta$ , ни на образование активных форм кислорода и азота [260]. АТ $\Phi$ , напротив, выступал в роли антиоксиданта, повышая активность супероксиддисмутаз и увеличивая содержание глутатиона [260].

Активное вовлечение P2X7 в патологические процессы мозга стимулировало разработку разнообразных синтетических антагонистов, наноантител для применения в терапии заболеваний ЦНС.

# 1.3.3.2. Рецепторы семейства Р2У

На сегодняшний день у человека обнаружено 8 рецепторов, которые относят к Р2Ү: Р2Ү1, Р2Ү2, Р2Ү4, Р2Ү6, Р2Ү11, Р2Ү12, Р2Ү13 и Р2Ү14 [261].

44

Рецепторы с отсутствующими номерами либо не встречаются у млекопитающих, либо для них не получено доказательств нуклеотидной природы агониста [186]. На основе гомологии последовательностей рецепторы Р2Y делят на две группы: к первой группе относят Р2Y1, Р2Y2, Р2Y4, Р2Y6, Р2Y11, в то время как Р2Y12, Р2Y13, Р2Y14 относят ко второй группе (Рисунок 6) [261].



Рисунок 6. Филогенетическое древо рецепторов Р2Ү. Использовано из [186].

Рецепторы Р2У1, Р2У2, Р2У4, Р2У6, Р2У11 ассоциированы с белками Gq, стимулирующими превращение фосфолипазой С субстрата фосфатидилинозитолдифосфата IP3 диацилглицерол, которые, мобилизуя кальций В И ИЗ внутриклеточных депо и активируя протеинкиназу С, соответственно, запускают развитие различных клеточных процессов [151]. P2Y12, P2Y13 и P2Y14R в ассоциированы белками Gi/o, чья активация ингибирует основном с аденилатциклазу и сокращает содержание циклического АМФ (цАМФ) внутри клетки [151]. В целом для рецепторов Р2У показан запуск разнообразных сигнальных каскадов при активации, в том числе каскад MAPK, путь PI3K/Akt и т.д. [151].

# 1.3.3.2.1. Рецептор Р2Ү1

Последовательности Р2Ү1 крысы и человека были клонированы и охарактеризованы в 1995-1996 гг. [262, 263]. Обе последовательности кодируют белок, состоящий из 373 аминокислот [264]. АДФ является естественным агонистом P2Y1, в то время как АТФ может выступать в качестве частичного агониста и антагониста при низких уровнях экспрессии рецептора [261]. В мозге обнаружена высокая экспрессия Р2У1, особенно выраженная в областях прилежащего ядра, скорлупы, стриатума, и наблюдается значимое окрашивание Р2Ү1 специфическими антителами в коре больших полушарий и мозжечка, в хвостатом ядре, скорлупе, бледном шаре, гиппокампе, красном ядре, ядре и среднем мозге [265] [261]. Рецепторы субталамическом P2Y1 локализованы на нейронах, астроглии и микроглии [27, 175] [200] [266] [267] [268].

Вклад Р2Ү1 в патологические состояния ЦНС преимущественно связан с приобретением астроцитами реактивного фенотипа и гиперэкспрессией Р2У1 [269]. Р2Ү1 участвует в распространении кальциевых волн по астроцитарному синцитию и стимулирует астроглиоз при травме, ишемии, болезни Альцгеймера [176] [25, 269] [266]. Его блокада специфическими антагонистами способствует облегчению состояния [177] [270] [271, 272] [273] [274]. В исследовании Delekate с соавт. была показана гиперэкспрессия рецептора Р2Ү1 реактивными астроцитами, окружающими бляшки амилоида в мозге мышей с болезнью [269]. Блокада Р2Ү1 Альцгеймера полностью нормализовала состояние астроглии, в то время как ингибирование Р2Х оказалось неэффективным [269]. Применение специфических антагонистов Р2У1 снижало гибель нейронов и улучшало пространственную память крыс при травме мозга и при ишемии [270, 271] [275]. В то же время существует массив данных, свидетельствующих о защитном эффекте Р2Ү1 на клетки ЦНС [276] [277] [278] [271, 279, 280]. В исследовании ишемии in vivo процент пораженных нейронов был выше в группе  $P2Y1^{-/-}$ мышей по сравнению c дикими типом [280]. Эктопическая гиперэкспрессия P2Y1 в микроглии снижала гибель клеток *in vitro*, вызванную ишемией, и оказывала нейропротекторный эффект [280]. Предварительная инкубация астроцитов с агонистом P2Y1, 2-метил-тио-АДФ (2MeSADP), ΑФК сокращала пероксид-индуцированную продукцию клетками [279]. Активация Р2Ү1 стимулировала экспрессию антиоксидантов, таких как каталаза, супероксиддисмутаза (SOD2), и накопление глутатиона В клетках, что свидетельствует о вовлечении Р2Ү1 в защиту от окислительного стресса [279]. В исследовании Watts с соавт. введение мышам с закрытой черепномозговой травмой специфических агонистов P2Y1, 2MeSADP/MRS2365, через полчаса после травмы значительно снижала выраженность отёка мозга, реактивный глиоз и экспрессию AQP4 [277]. Сокращение объёма зоны инфаркта на фоне стимуляции Р2Ү1 наблюдалось и при фототромбозе [281]. Таким образом, как блокада Р2Ү1 в одних исследованиях, так и стимуляция данного рецептора в других оказывала цитопротекторный эффект, наблюдаемый in vivo и in vitro, и подобный парадокс может быть объяснен, например, существованием различных популяций Р2Ү1 в областях и клетках мозга, либо приобретением рецептором каких-то новых свойств при патологических состояниях [25].

Активация Р2Ү1 может быть ассоциирована с секрецией разнообразных цитокинов, в том числе IL-6, арахидоновой кислоты, PGE2 [282-284]. В работе Fujita с соавт. было продемонстрировано, что стимуляция рецепторов P2Y1 в культуре гиппокампальных астроцитов оказывает выраженный протекторный эффект в отношении астроцитов и нейронов на фоне окислительного стресса за счёт секреции IL-6 [282]. Похожее наблюдение было сделано Noguchi с соавт. в исследовании влияния метилртути на астроциты и нейроны [285]. Было показано, что обработка метилртутью стимулирует выброс АТФ из астроцитов и аутоактивацию P2Y1, приводящую к секреции IL-6 и нейропротекции [285]. В модели ишемии *in vivo* использование специфического антагониста P2Y1, MRS2179, фосфорилированного значительно снижало уровень Nf-κB В астроцитах, экспрессию IL-6, TNF-α, CCL2, CXCL10, что было ассоциировано с уменьшением зоны поражения [177]. Добавление к астроцитам АТФ (1-100 микромоль) на фоне стимуляции IL-1β значительно усиливало IL-1βопосредованную активацию NF-кB, AP-1 и экспрессию IL-8, в то время как экспрессия антивоспалительного IL-10 была значительно подавлена [181]. Добавление к клеткам АДФ повторяло данные эффекты, что может косвенно свидетельствовать о вкладе рецептора P2Y1 в наблюдаемые процессы [181].

Таким образом, из многочисленных данных литературы следует, что рецептор P2Y1 в дополнение к рецептору P2X7 активно участвует в разнообразных патологических состояниях ЦНС, в том числе в ишемическом повреждении, и является перспективной точкой приложения таргетной терапии.

### 1.3.3.2.2. Рецепторы Р2Ү2, 4, 6, 11-14

Рецептор Р2Y2 активируется УТФ и АТФ в эквивалентных концентрациях [186]. Его экспрессия астроглией обнаружена в кортексе, гиппокампе, мозжечке [189, 286, 287]. Полагают, что возникновение кальциевых волн обеспечивается в основном за счёт стимуляции АТФ рецепторов Р2Y1 и Р2Y2 [266, 288]. Экспрессия Р2Y2 возрастает на фоне травмы спинного мозга, головного мозга, при воспалении, и играет цитопротекторную роль [289-291]. Повышение экспрессии Р2Y2 может обеспечиваться активацией Р2X7 [292]. Рецепторы Р2Y2 вовлечены в секрецию арахидоновой кислоты и повышение экспрессии LIF астроцитами [293] [294].

Основным эндогенным лигандом Р2Y4 и Р2Y6 является УТФ и УДФ, соответственно [264]. АТФ выступает антагонистом, либо частичным агонистом Р2Y4 человека [295]. В случае Р2Y4 крысы АТФ и УТФ являются полными агонистами [264]. Экспрессия Р2Y4 астроцитами возрастает в областях повреждения чёрной субстанции в модели болезни Паркинсона [296]. Р2Y4 может быть вовлечен в секрецию астроцитами белка-прекурсора амилоида [297]. Активация Р2Y6 лигандом УДФ снижала гибель астроцитов, вызванную TNF-α, в то время как стимуляция Р2Y4 лигандом УТФ подобного эффекта не оказывала [298] [299]. Обработка астроцитов УДФ стимулировала продукцию больших количеств хемокинов CCL2 и CCL3 [300]. УДФ индуцировал секрецию IL-8 в клеточной линии астроцитомы 1321N1, трансфицированной экспрессором P2Y6 [301] [302].

Рецептор P2Y11 человека отличается от остальных членов семейства. Ген, кодирующий P2Y11, содержит интрон, который разделяет кодирующий первые 6 аминокислот экзон от второго экзона, кодирующего оставшуюся часть белка [186]. Аминокислотная последовательность P2Y11 на 33% идентична последовательности P2Y1, ближайшего гомолога [303]. Эндогенным лигандом P2Y11 человека является АТФ [303]. Экпрессия P2Y11 астроцитами и микроглией повышается на фоне повреждения спинномозгового нерва [304].

Рецептор Р2Y12 активируется АДФ, а АТФ выступает антагонистом [264]. Данный рецептор высоко экспрессируется тромбоцитами и является точкой приложения антиаггрегационных препаратов, клопидогреля и тикагрелора [186]. В ЦНС Р2Y12 экспрессируется астроцитами, микроглией, олигодендроглией [305]. Изменение экспрессии Р2Y12 наблюдается при нейровоспалении и МС [305, 306]. Обработка астроцитов синтетическими аналогами АДФ стимулировала пролиферацию клеток и, как было показано, данный эффект обеспечивается рецепторами Р2Y1 и Р2Y12 через активацию сигнального пути PLC-PKC-ERK1/2 [307]. Стимуляция рецепторов Р2Y1 и Р2Y12 астроцитов прилежащего ядра приводила к выраженному астроглиозу [175]. Активация Р2Y12 значительно снижала TNF-α-индуцированный апоптоз клеток линии астроцитомы 1321N1 [308].

Рецептор Р2Y13 человека был впервые клонирован в 2001 [309]. Естественным агонистом является АДФ, АТФ выступает частичным агонистом [264]. Обработка астроцитов мозжечка бензоил-АТФ повышала уровень внутриклеточного кальция и этот эффект обеспечивался Р2X7 и Р2Y13 [310].

Рецептор Р2Ү14 на 47% идентичен Р2Ү12, Р2Ү13 и активируется УДФглюкозой. Р2Ү14 вовлечен в процессы воспаления и боли, контроль тучных клеток и микроглии, секрецию инсулина и вазоконстрикцию [264].

49

### 1.4.1. Строение и сигнализация Toll-подобных рецепторов

Рецепторы распознавания образов (PRR) играют ключевую роль в реализации ответа врождённой иммунной системы на патоген/образ опасности, экспрессируются глиальными клетками ЦНС и стимулируют развитие локального нейровоспаления при различных патологиях нервной системы, в том числе на фоне ишемии и травмы мозга [34, 35].

Одной из наиболее хорошо изученных групп PRR является семейство Tollподобных рецепторов [311]. На основе аминокислотной гомологии рецепторы TLR позвоночных можно сгруппировать в 6 подсемейств: TLR1/2/6/10, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7/8/9 и TLR11/12/13/21/22/23 [312]. Экспрессия TLR1-10 была обнаружена у человека, TLR1-13 (кроме TLR10) были детектированы у мыши [313]. Ген TLR10 в геноме мыши является результатом инсерции ретровируса и относится к неактивным псевдогенам [313]. Типичный TLR представляет собой тип I трансмембранных белков и содержит 3 структурных домена: внешний домен ИЗ обогащённых лейцином повторов (LRR), трансмембранный домен и цитоплазматический TIR (Toll/IL-1 receptor) [314]. Мотив LRR домен в то время ответственен за распознавание патогена, как домен TIR взаимодействует с белками-адапторами и проводит сигнализацию [314]. Некоторые TLR, среди которых TLR1, TLR2, TLR4-6 и TLR11, расположены на поверхности клеток в цитоплазматической мембране, в то время как TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 являются внутриклеточными рецепторами и обнаруживаются в мембране эндосом [315]. Рецепторы TLR функционируют в форме гомодимеров за исключением рецептора TLR2, который образует гетеродимер с TLR1 и с TLR6 (Рисунок 7А) [315]. Рецепторы TLR распознают консервативные молекулярные паттерны (образы) патогенов (PAMPs), либо эндогенные образы опасности, ассоциированные с повреждением (DAMPs), которые высвобождаются из клеток при стрессе, повреждении, лизисе [34]. Эндосомальные TLR в основном распознают нуклеиновые кислоты вирусов и бактерий, в то время как

цитоплазматические TLR активируются различными компонентами бактериальной стенки, такими как липополисахарид, липотейхоевая кислота, пептидогликаны, флагеллин и липопротеины. В качестве эндогенных активаторов TLR могут выступать матричная PHK, митохондриальная ДНК, белок группы высокой мобильности HMGB1, хроматин, белки теплового шока (HSP), α-синуклеин и т.д. [34].

Сигнализация через рецепторы TLR осуществляется по двум различным путям: MyD88 (белок 88 первичного ответа миелоидной дифферецировки)зависимый путь и TRIF (TIR домен-содержащий адаптор-индуцируемый IFNβ)зависимый путь (Рисунок 7Б) [316]. За исключением рецепторов TLR3, 4 остальные рецепторы используют MyD88-опосредованную сигнализацию [34, 316]. Активация TLR соответствующим лигандом вызывает димеризацию рецептора с последующим взаимодействием MyD88 с доменом TIR [314]. MyD88 рекрутирует серин-треониновые киназы IRAK1, IRAK2, IRAK4, образуя комплекс, называемый миддосомой [315]. Дальнейшее привлечение в комплекс и активация фактора TRAF6 (TNF-рецептор-ассоциированный фактор 6) и киназы TAK1 в конечном счёте приводят к высвобождению транскрипционного фактора NF-кВ в цитоплазме [315]. Транслокация NF-кВ в ядро запускает экпрессию генов провоспалительных цитокинов.

Проведение сигнала по TRIF-зависимому пути характерно только для рецепторов TLR3 и TLR4 [317]. Вовлечение TRIF-пути ассоциировано с активацией транскрипционных факторов NF-кB, AP-1 и членов семейства регуляторных факторов интерферона IRF, стимулирующих синтез провоспалительных цитокинов и IFN1 [314].

ТLR4 функционирует у млекопитающих в качестве рецептора ЛПС [317]. Активация TLR4 в виде комплекса с белком-корецептором MD2 (белок 2 миелоидной дифференцировки TLR4) приводит к развитию ответов ранней фазы и поздней фазы. Образование комплекса TLR4-MD2-ЛПС вначале активирует NFкВ и MAPK в результате рекрутинга MyD88 и адапторов MAL [314]. Последующий эндоцитоз TLR4-MD2-ЛПС внутрь клетки приводит к взаимодействию с TRIF и адапторами TICAM2, вызывая продукцию IFN1, активацию IRF7 и позднего NF-кВ [314].





Рисунок 7. А. 3D модель комплекса TLR3/dsPHK, заякоренного в фосфолипидном бислое. Связывание с двухцепочечной РНК (красный и зелёный) вызывает димеризацию субъединиц TLR3 (синий и маджента). Б. Сигнальные пути рецепторов TLR. Рецептор TLR3 использует TRIFопосредованный путь. Рецептор TLR4 функционирует по обоим сигнальным путям TRIF и MyD88. Остальные рецепторы TLR используют только MyD88опосредованную сигнализацию. Модифицировано из [312].

# 1.4.2. Функции TLR4 в центральной нервной системе: фокус на астроциты

Для Toll-подобных рецепторов известно множество функций, среди которых распознавание эндогенных и экзогенных антигенов, обеспечение связи врождённого и адаптивного иммунитетов, регуляция синтеза цитокинов, регуляция пролиферации и выживания клеток. Нейроны и глиальные клетки человека и грызунов экспрессируют TLR. Человеческие астроциты экспрессируют TLR1-5 и TLR9, астроциты мыши экспрессируют TLR1-9 [34].

TLR-сигнализация вовлечена в патогенез инсульта. Особо значимую роль играют рецепторы TLR2 и TLR4, экспрессия которых в мозге возрастает на фоне ишемии и может усиливать повреждение ткани [35]. В исследовании пациентов, перенёсших клинических инсульт, было показано, что повышенная экспрессия TLR2 и TLR4 ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [35].

ЛПС. Рецептор TLR4 активируется HO также способен узнавать липотейхоевую фибронектин, белок кислоту, слияния респираторного синцитиального вируса (RSV) [33]. Воздействие ЛПС на астроциты стимулирует пролиферацию клеток и миграцию. В исследовании Yang с соавт. ЛПС индуцировал экспрессию астроцитами матриксной металлопротеазы-9, фермента, модулирующего внеклеточный пространство и ассоциированого с миграцией [318]. Под воздействием ЛПС астроциты активно пролиферируют и, как было продемонстрировано в работе Rodegrs с соавт., данный эффект может быть отчасти опосредован TNF-α, экспрессия и секреция которого индуцируется ЛПС [319]. При введение ЛПС *in vivo* астроциты претерпевали морфологические изменения, характерные для активированной астроглии [320].

Активация TLR4 в астроцитах, как правило, приводит к повышению экпрессии и секреции цитокинов IL-1, IL-6, TNF-α, хемокинов CCL и CXCL [34]. Обработка астроцитов крысы ЛПС индуцирует экспрессию iNOS, COX-2, TNF-а, простагландинов, IL-10 [321, 322]. Индукция iNOS сопровождается синтезом и секрецией оксида азота [323] [324]. В работе Vizuete с соавт. была показана секреция S100B астроцитами, стимулированными ЛПС [325]. ЛПС Прекондиционирование астроцитов малыми дозами вызывает так называемую толерантность (невосприимчивость) астроцитов к последующей обработке высокими дозами ЛПС, что может быть связано с ингибированием NFкВ пути [326].

Таким образом, не смотря на широкий спектр исследований, посвященных роли астроцитов в нейровоспалении, остается не ясным в чем особенность действия отдельных повреждающих факторов и какую роль они играют при системном повреждении мозга в результате ишемии, инвазий или травм.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Вещества и растворы

10х HBSS без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2</sup> (Gibco, CША), 1 M HEPES (Gibco, CША), 10х PBS (Gibco, CША), папаин (Sigms, CША), L-Cystein-HCl (Sigma, CША), BSA (Sigma, CША), DMEM/F12 (Gibco, CША), HI FBS (Gibco, CША), антибиотикантимикотик (Gibco, CША), трипсин-ЭДТА (Gibco, CША), A438079 (Tocris, UK), бриллиантовый синий G (BBG) (Sigma, CША), PPADS (Tocris, UK), бензоил-АТФ (Sigma, CША), тромбин 1 KU (Sigma, CША), липополисахарид (Sigma, CША), MTT (Sigma, CША), DMSO (Sigma, CША), MST-1 (Sigma, CША), peaктив Грисса (Sigma, CША), ДНКаза (Sigma, CША), DTT (Sigma, CША), β-меркаптоэтанол (BioRad, CША), ДНКазой (ThermoFisher, CША), анти-Bax [C-2] (Santa-Cruz, CША), анти-Bcl2 [P-19] (Santa-Cruz, CША), анти-p65 XP® [D14E12] (CST, CША), анти-фосфор65 Ser536 [93H1] (CST, CША), анти-HSP90 (StressMarq Biosciences, CША), анти-GAPDH (Abcam, CША), анти-S100B (Dako, Германия), анти-GFAP (Sigma, CША), анти-Iba1 (Abcam, Великобритания), вторичные антитела AlexaFluor (Thermo Scientific, CША), вторичные антитела-HRP (Имтек, Россия), Syto-59 (Sigma, CША), фаллоидин (Thermo Scientific, CША).

# 2.2. Работа с культурой астроцитов

# 2.2.1. Получение культур астроцитов

Астроциты выделяли из мозга новорожденных крысят линии Wistar, либо мышат линии C57BL/6 по протоколу, подробно описанному в работе Ивановой с соавт. [327]. Все опыты с животными производили согласно этическим принципам и нормативным документам, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и декларацией о гуманном обращении с животными. Животных декапитировали, головной мозг извлекали, промывали холодным PBS от крови и переносили в чашку с раствором Хенкса без  $Ca^{2+}$  и  $Mg^2$  (1x HBSS, 1 мМ пируват натрия, 10 мМ HEPES). Большие полушария отделяли и очищали от сосудистой оболочки, после чего переносили в камеру Максимова и механически

измельчали скальпелем. Измельчённый кортекс инкубировали в растворе папаина (5 U/мл папаин, 1х PBS, 0,2 мг/мл L-Cystein-HCl, 0,2 мг/мл BSA, 5 мг/мл глюкоза) при 37 °C, 10 минут. Затем раствор папаина аккуратно отбирали, к осадку клеток добавляли раствор Хенкса без  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  с ДНКазой (0,01 мг/мл). Клеткам давали осесть, после чего раствор Хенкса меняли на свежий в течение ещё двух раз. Отмытые клетки суспендировали и пропускали через нейлоновое сито с диаметром пор 100 мкм (Corning, США). Суспензию клеток центрифугировали при 500 g, 7 минут, 4 °C. Осадок разводили в среде DMEM/F12 с добавлением 1х антибиотика-антимикотика (100 мкг/мл пенициллин/стрептомицин, 0,25 мкг/мл амфотерицин B) и HI FBS 10%. Клетки помещали во флаконы и культивировали в течение 10-12 дней при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. На 5-6-й день флаконы трясли для отделения микроглии 1 час, 100 грт, на шейкере, после чего культуральную среду меняли на свежую.

#### 2.2.2. Пассирование клеток

На 10-12-й день *in vitro* астроциты снимали с культуральных флаконов раствором 0,25% трипсина-ЭДТА в PBS и центрифугировали. Осадок клеток разводили в 1-2 мл свежей среды. Перед пассированием флаконы с культурой трясли для отделения микроглии на шейкере 1 час. Для подсчёта количества клеток 10 мкл суспензии смешивали с 10 мкл трипанового синего (BioRad, CША) в отдельной пробирке, тщательно суспендировали, вносили на специальный слайд и помещали в счётчик клеток (BioRad, CША). В зависимости от целей дальнейшего эксперимента клетки рассевали на чашки с прикреплёнными стёклами (MatTek, CША), в ячейки 6-, 12-, 24-, 48-луночных культуральных клеток составляло 60-70 тысяч на лунку, для других планшетов вносимых клеток составляло 60-70 тысяч на лунку, Астроциты культивировали при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 4 дней. Однородность культуры астроцитов составляла более 90% при окрашивании антителами к специфическому глиальному фибриллярному кислому белку GFAP [328].

#### 2.2.3. Внесение веществ

На 14-й день *in vitro*, когда плотность культуры составляла 80-90%, культуральную среду меняли на свежую с содержанием сыворотки 2%. После этого к клеткам добавляли следующие вещества, эффекты которых в дальнейшем исследовали: бензоил-АТФ (мкМ), тромбин (нМ), ЛПС (мкг/мл). Если протокол эксперимента предполагал применение ингибиторов, то в соответствующие экспериментальные лунки их вносили первыми: A438079 (мкМ), BBG (мкМ), PPADS (мкМ) – ингибиторы пуринергических рецепторов; L-NAME (мкМ) – ингибиторы Пуринергических рецепторов; L-NAME (мкМ) – ингибиторы Пуринергических с ингибиторами к клеткам добавляли бензоил-АТФ (мкМ).

### 2.3. Модель ишемии in vitro – кислородно-глюкозная депривация (КГД)

Депривация кислорода и глюкозы (КГД) широко используется в качестве модели инсульта *in vitro* [329]. Культуры клеток и тканей помещают в среду, не содержащую глюкозу, и инкубируют в деоксигенированной атмосфере [329].

В рамках работы КГД обеспечивали следующим образом. Клетки лишали стандартной культуральной среды, отмывали несколько раз PBS и добавляли среду без глюкозы, после чего астроциты помещали в инкубатор с 5% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub> на 5 часов. По окончании времени инкубации клетки реперфузировали. Для этого клеткам возвращали полную среду (глюкоза 4,5 г/л) и помещали в нормальную атмосферу (нормоксия, газовый состав инкубатора – 21% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>) на 12 часов или 24 часа. При обсчёте результатов в качестве контроля служила группа клеток без воздействий.

#### 2.4. Измерение выживаемости/пролиферации астроцитов

Восстановление солей тетразолия до сильно поглощающих в видимой области спектра формазанов лежит в основе ряда колориметрических тестов, используемых для анализа выживаемости клеток. Восстановление солей тетразолия обеспечивается работой митохондриальных дегидрогеназ и, соответственно, может происходить только в живых клетках. Количество

образуемого формазана, водонерастворимого в случае использования МТТ и водорастворимого в случае теста WST-1, снижается при гибели клеток и, напротив, растёт при пролиферации клеток. Изменение оптической плотности среды, содержащей формазан, отражает изменения доли живых клеток в культуре.

### 2.4.1. МТТ тест

MTT (3-(4,5-диметилтиазол-2-) ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) восстанавливается нерастворимый формазан. Для измерения В пролиферации/выживаемости клеток методом МТТ астроциты инкубировали с исследуемыми веществами в течение 24, либо 48 часов. Затем к клеткам добавляли водный раствор МТТ до конечной концентрации 500 мкг/мл и инкубировали 1 час при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. После этого культуральную среду удаляли, кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде, 300-700 мкл/лунка. Содержимое лунок планшетов перемешивали на шейкере 10 минут, затем пробы переносили в 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа (ИФА) по 100 мкл на лунку. Оптическую плотность измеряли при 570 нм на микроплейтридере iMark (BioRad, CША).

### 2.4.2. WST-1 тест

WST-1 (4-[3-(4-йодофенил)-2-(4-нитрофенил)-2H-5-тетразолио]-1,3бензилдисульфонат) восстанавливается клетками до растворимого В пролиферации/выживаемости культуральной среде формазана. Измерение астроцитов при помощи реагента WST-1 производили через 24/48 часов инкубации с исследуемыми веществами. К астроцитам вносили WST-1 в разведении 1 к 10. Клетки инкубировали в течение 1 часа при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, после чего 100 мкл культуральной среды переносили в 96-луночный планшет для ИФА. Оптическую плотность измеряли при 450 нм на микроплейтридере iMark (BioRad, США). Фоновое поглощение измеряли при 620 нм.

# 2.5. Оценка уровня некроза астроцитов по высвобождению лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

Лактатдегидрогеназа представляет собой стабильный цитозольный фермент, который высвобождается во внеклеточное пространство при лизисе клеток. Лактатдегидрогеназа восстанавливает соли тетразолия, добавленные к клеткам, до красного формазана. Интенсивность образования красного формазана окрашивания соответствует интенсивности культуральной среды, пропорциональна количеству высвобожденной ЛДГ в среду и отражает количество погибших путём некроза клеток.

Для измерения высвободившегося фермента использовали набор CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США). Из лунок 48-луночного планшета отбирали по 30 мкл среды и вносили в лунки 96-луночного планшета, затем добавляли 30 мкл CytoTox 96® Reagent. Планшет запечатывали и инкубировали в темноте 30 минут при комнатной температуре. По истечении времени инкубации в лунки добавляли по 30 мкл Stop Solution. Оптическую плотность измеряли при 490 нм на микроплейтридере iMark (Bio-Rad, CША). При обработке результатов за единицу принимали значения оптической плотности в группе без воздействий.

# 2.6. Измерение относительного содержания оксида азота

Оксид азота (NO) характеризуется крайне коротким периодом полураспада в биологических системах, что связано с его быстрым окислением до нитритов/нитратов [330]. Содержание нитритов/нитратов позволяет косвенно судить об интенсивности секреции NO клетками и измерение их уровня является популярным непрямым методом оценки продукции оксида азота в водных средах [331].

Для измерения нитритов/нитратов относительных количеств В культуральной Грисса. Реактив жидкости использовали реактив Грисса сульфаниловой представляет собой *N*-(1смесь кислоты С Нафтил)этилендиамином, реакция которых с ионами нитритов приводит к образованию окрашенных диазосоединений, поглощающих при длине волны 530-540 нм [331].

Реактив Грисса вносили в лунки 96-луночных ИФА планшетов в количестве 50 мкл и затем добавляли по 50 мкл среды от астроцитов. В эксперименте по измерению накопления нитритов в среде во времени культуральную среду собирали через 2, 6, 12 и 24 часа после стимуляции клеток. В остальных экспериментах измерение относительных количеств нитритов производили через 24 часа инкубации клеток с веществами. После добавления среды к реактиву Грисса планшет инкубировали при комнатной температуре 15 минут, затем относительное количество диазосоединений 530 измеряли при HM на микроплейтридере iMark (BioRad, CША).

# 2.7. Анализ уровней экспрессии iNOS методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени

# 2.7.1. Выделение РНК

Для выделения РНК астроциты культивировали в 12-луночных планшетах. Через 2, 4, 6 и 12 часов после добавления бензоил-АТФ и ингибиторов клетки отмывали от среды холодным PBS и лизировали в 350 мкл раствора RLT (Qiagen, CША) с добавлением β-меркаптоэтанола. Лизат переносили в пробирку, добавляли 350 мкл 96% этанола и тщательно суспендировали. Для очистки РНК использовали набор CleanRNA Standard (Евроген, Россия). Смесь переносили на колонку (не более 700 мкл) и центрифугировали в настольной центрифуге Еррепdorf Minispin 30 сек при 10000 об/мин. Проскок отбрасывали. На колонку наносили 500 мкл промывочного раствора для РНК и центрифугировали 30 сек при 10000 об/мин. Повторяли промывку ещё один раз. Затем спин-колонку переносили в свежую собирательную пробирку и центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин. После этого спин-колонку помещали в 1.5 мл пробирку для сбора элюата и добавляли на фильтр 30-40 мкл деионизованной воды. После 5 минут инкубации при комнатной температуре колонку центрифугировали 30 сек при 10000 об/мин, элюат собирали и наносили на фильтр повторно для обогащения содержания РНК в элюате. Концентрацию выделенной РНК определяли при помощи спектрофотометра Implen NanoPhotometer C, позволяющего производить измерения нуклеиновой кислоты в малом объёме образца (1-3 мкл) и экономить, таким образом, препарат. Кроме того, производили измерение отношения поглощения образца при длинах волн 260 нм и 280 нм, позволяющего оценить степень загрязнения препарата белком, и при длинах волн 260 нм и 230 нм, показывающего загрязение образца органическими веществами, используемыми во время процедуры выделения РНК. В дальнейшей работе использовали образцы РНК, удовлетворяющие критериям A260/280 = 1.85 - 2.05; A260/230 = 1.8 - 2.2.

# 2.7.2. Очистка препарата РНК от примеси ДНК

Для очистки РНК от примесей геномной ДНК образцы обрабатывали ферментом ДНКазой (ThermoFisher, США). На 600 нг РНК добавляли 0,6 мкл ДНКазы (1 U/мкл), 1,5 мкл 10х коммерческого буфера и воды до конечного объёма реакции 15 мкл. Смесь инкубировали при 37 °C в течение 30 минут. Для остановки реакции добавляли ЭДТА и инкубировали при 65 °C, 10 минут. Пробы охлаждали и измеряли концентрацию РНК.

### 2.7.3. Обратная транскрипция

Для синтеза комплементарной цепи кДНК использовали набор MMLV RT (Евроген, Россия), где ключевым реагентом является обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей Молони. В пробирку вносили матрицу PHK, олиго-(dT)-праймер, 5х буфер (280 мМ Трис-HCl, pH 8.7, 375 мМ KCl, 30 мМ MgCl2), смесь дезоксирибонуклеозидфосфатов, DTT, ревертазу и воду, свободную от PHKaз и ДНКаз, до конечного объёма 20 мкл. Обратную транскрипцию производили в амплификаторе по следующей программе: 42 °C 60 минут, 70 °C 10 минут. Синтезированные образцы кДНК использовали далее в постановке полимеразно-цепной реакции в реальном времени.

### 2.7.4. Постановка ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали премикс 5х qPCRmix-HS SYBR, содержащий Таq ДНК полимеразу с горячим стартом, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, интеркалирующий краситель SYBR, Mg<sup>2+</sup> и реакционный буфер (Евроген, Россия). Последовательности праймеров были 5'-TCATCACTATCGGCAATGAGCGGT-3', следующими: в-актин прямой обратный 5'-ACAGCACTGTGTTGGCATAGAGGT-3'; iNOS прямой 5'-5'-CCACAATAGTACAATACTACTTGG-3', обратный АССААССТСТССАСС-3' [322]. Образцы кДНК в количестве 50 нг смешивали с 5х qPCRmix-HS SYBR, праймерами и водой до конечного объёма реакции 25 мкл в 200 мкл пробирках, которые затем загружали в амплификатор для ПЦР в реальном времени DTlite 4 (ДНК-Технология, Россия). Образцы анализировали в трех повторах. Программа амплификации состояла из этапа первичной денатурации кДНК в течение 2 минут при 95 °C и 40 циклов плавления в течение 20 секунд при 95 °C, отжига праймеров в течение 20 секунд при 57 °C и элонгации при 72 °С в течение 30 секунд. При постановке ПЦР использовали следующие контроли: негативный контроль с водой (вместо матрицы вносили эквивалентное количество воды, данный контроль характеризует чистоту реакции); эндогенный контроль на одинаковое внесение матрицы кДНК (используется уровень экспрессии β-актина). Для контроля специфичности реакций снимали кривую плавления. Продукты ПЦР визуализовали в агарозном геле. Для сравнения содержания транскриптов iNOS в образцах применяли пороговый метод анализа накопления ДНК, суть которого заключается в том, чтобы для каждого образца определить цикл ПЦР, когда количество ДНК (сигнал флуоресценции) достигнет одинаковой для всех образцов пороговой величины. Уровни iNOS экспрессии нормализовали относительно экспрессии конститутивного гена  $\beta$ -актина, эндогенного контроля ( $\Delta$ Ct). В качестве контроля сравнения использовали уровень экспрессии в нестимулированных клетках. Финальный расчёт изменений уровней экспрессии генов в исследуемых образцах производили по формуле 2 - ( $\Delta Ctofpasua - \Delta Ctkohtponb$ ) [332].

## 2.7.5. Горизонтальный электрофорез ДНК в агарозном геле

методом ПЦР продукты анализировали Полученные при помощи агарозного электрофореза. Для этого готовили агарозный гель 1-2% путём смешивания сухой агарозы с соответствующим количеством ТАЕ буфера (40 мМ Трис-ацетат, 1 мМ ЭДТА, pH 8,5). Агарозу расплавляли в микроволновой печи, чего добавляли этидиум бромид для возможности дальнейшей после визуализации фрагментов ДНК в геле. Расплавленную агарозу заливали в камеру, установленную на заливочном столике. После застывания геля его помещали в камеру для горизонтольного электрофореза с добавлением ТАЕ буфера. Образцы амплифицированной ДНК смешивали с загрузочным буфером для образцов (Евроген) и наносили в карманы геля. В качестве стандарта использовали набор маркёров длин ДНК (Евроген). Электрофоретическое разделение фрагментов проводили при 100-200 мА в течение 30-50 минут. Полосы ДНК визуализировали при помощи трансиллюминатора.

#### 2.8. Анализ уровней секреции цитокинов

Измерение секреции IL-6 TNF-α И производили методом иммуноферментного анализа С использованием коммерческих наборов. Астроциты культивировали в 24-луночных планшетах с исследуемыми веществами в течение 6 часов, после чего среду отбирали в пробирки, центрифугировали 10-15 минут 10000 g при 4 °C и замораживали. Клетки отмывали от остатков среды и дебриса и добавляли буфер для лизирования клеток  $Mg^{2+}$  (Sigma, CIIIA) с добавлением ингибиторов протеаз (Calbiochem, CIIIA). Клетки инкубировали 10 мин на льду и снимали пипетированием. Лизаты центрифугировали, супернатанты переносили в отдельные предварительно охлаждённые пробирки, после чего концентрацию общего белка измеряли при помощи реактива Брэдфорда (BioRad, CША).

### 2.8.1. Измерение секреции интерлейкина 6

Секрецию IL-6 оценивали с использованием набора Rat IL-6 Quantikine ELISA Kit (R6000B, R&D, CIIIA). Перед измерением образцы среды размораживали и центрифугировали 10000 g, 10 минут, 4 °C. Стандарт IL-6 крысы разводили в калибровочном буфере RD5-16 до конечной концентрации 4000 пг/мл и на основе стокового раствора готовили серию разведений. Контрольный образец IL-6 крысы разводили в 1 мл деионизованной воды. Измерения всех образцов производили в дуплетах. В лунки 96-луночного планшета с пресорбированными антителами против IL-6 вносили по 50 мкл буфера RD1-54, после чего вносили по 50 мкл образца, стандарта соответствующего разведения, либо контрольного образца. Планшет заклеивали адгезивной плёнкой и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. По истечении времени инкубации содержимое лунок вытряхивали и промывали 5 раз промывочным буфером по 300 мкл на лунку. В отмытые лунки добавляли по 100 мкл конъюгата IL-6, лунки запечатывали и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. Процедуру отмывки от несвязавшегося конъюгата повторяли по вышеизложенной схеме, после чего вносили по 100 мкл субстрата на 30 минут. Реакцию останавливали внесением 100 мкл стоп-раствора. Измерение оптической плотности производили при 450 нм. Рассчитанные по калибровочной кривой концентрации интерлейкина 6 нормировали на содержание белка В соответствующем клеточном лизате.

# 2.8.2. Измерение секреции TNF-а

Секрецию TNF-α измеряли при помощи набора Rat TNF-α ELISA kit (CSB-E11987r, Cusabio, CША). Образцы анализируемой среды размораживали, центрифугировали 10000 g, 10 минут, 4 °C. Стандарт разводили в 1 мл буфера Sample diluent и на его основе готовили калибровочные разведения. Пробы анализировали в дуплетах. В лунки 96-луночного планшета с сорбированными антителами добавляли по 100 мкл образца, запечатывали плёнкой и инкубировали в течение 2 часов при 37<sup>0</sup>C. По истечении времени инкубации лунки вытряхивали и добавляли антитела, конъюгированные с биотином (1x biotin-antibody). Лунки инкубировали с биотинилированными антителами 1 час при 37 °C, после чего жидкость отбрасывали и планшет отмывали от несвязавшихся антител промывочным буфером, 200 мкл/лунка, 3 раза. Далее вносили по 100 мкл раствора авидина, конъюгированного с HRP (1x HRP-avidin) и инкубировали 1 час при 37 °C. Далее планшет отмывали 5 раз, вносили по 90 мкл субстрата ТМБ и инкубировали 15-30 минут в темноте при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл стоп-раствора и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при 450 нм. Концентрации TNF-α определяли при помощи калибровочной кривой и нормировали на количество белка в соответствующих пробах.

# 2.9. Вестерн-блоттинг

Для вестерн-блоттинга подготовку проб проводили следующим образом. Планшеты с астроцитами помещали на лёд, отбирали культуральную среду и отмывали от остатков среды и дебриса холодным PBS. Затем в лунки с клетками вносили охлаждённый буфер для лизирования клеток Mg<sup>2+</sup> (Sigma, CША) с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (Calbiochem, США). Лизаты снимали с пластика пипетированием, либо скребком, помещали в пробирки и центрифугировали 10000 g, 10 минут, 4 °С. Содержание белка в супернатантах оценивали при помощи реактива Брэдфорда. Для проведения ΠΑΑΓэлектрофореза готовили 12% разделяющий гель на основе Трис-глицина, либо на основе бис-Трис. Одинаковое количество белка каждого образца смешивали в отдельных пробирках с 4х буфером Лэммли (0,25 M Tris/HCl, pH=6.8, 8% SDS, 40% глицерол, 0,008% бромфеноловый синий, 20% β-меркаптоэтанол, pH=6.8), после чего кипятили при 95 °C в течение 5-10 минут и наносили в карманы геля. Разделение белков в электрическом поле осуществляли при 80 В в концентрирующем геле с переключением на 120 В при достижении фронтом разделяющего геля. Перенос белков на мембрану осуществляли либо мокрым способом, либо полусухим. В случае мокрого переноса использовали PVDF

65

мембрану и параметры процедуры 200 мА, 1 час. В случае полусухого переноса использовали нитроцеллюлозную мембрану, перенос осуществляли при 20 V, 400 мА, 1 час. В обоих случая использовали буфер для переноса (25 мМ Трис, 190 мМ глицин, 10% метанол, 0,1% SDS). Мембрану блокировали 5% обезжиренным молоком 1 час при постоянном покачивании. Первичные антитела разводили в отдельных пробирках в 5% молоке следующим образом: анти-Вах 1:500 (С-2, Santa-Cruz, CIIIA), анти-Bcl2 1:200 (P-19, Santa-Cruz, CIIIA), анти-p65 1:1000 (D14E12, XP®, CST, США), анти-фосфор65 Ser536 1:1000 (93H1, CST, США), анти-HSP90 1:1000 (StressMarq Biosciences, США), анти-GAPDH 1:10000 (Abcam, США). Антитела добавляли к мембране и инкубировали в течение ночи при + 4 °С на шейкере. На следующий день мембрану отмывали 3 раза буфером TBST (20 мМ Трис, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween-20) в течение 15, 10 и 5 минут. Далее мембрану инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена HRP, в течение 1-1,5 часов при комнатной температуре, в TBST по описанной схеме отмывали И проявляли при помощи хемилюменисцентного набора ECL (Thermo Scientific, CША), либо при помощи FemtoLUCENT Plus-HRP (G-Biosciences, США). Свечение бэндов визуализовали при помощи гель-документирующей системы BioRad (США). Для повторного окрашивания мембрану ополаскивали водой от остатков проявителя И инкубировали 30 минут в стрип-буфере (Thermo Scientific, США), после чего заново блокировали и производили процедуру окрашивания другого белка по аналогичной схеме. Денситометрию полос проводили при помощи программы ImageJ (NIH, США). В качестве контрольного белка использовали окрашивание на GAPDH. Результаты по целевым белкам нормировали к уровню белка GAPDH в конкретной пробе.

# 2.10. Иммуноцитохимическое окрашивание

Для иммуноцитохимии клетки культивировали на специальных стёклах (MatTek, США). Астроциты промывали тёплым PBS и фиксировали в 4% параформальдегиде 15 минут. Клетки отмывали по следующей схеме: 1х 10 мин

120 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1х 10 мин низкосолевой буфер (150 мМ NaCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) и 2х 10 мин высокосолевой буфер (0,5 М NaCl, 20 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Клетки пермеабилизовали и блокировали буфером FSBB (0,1% Triton X-100, 5% FBS в PBS) 20 минут. Затем клетки инкубировали ночь при +4 °C с первичными антителами, разведёнными в FSBB. Использовали следующие антитела: антитела к S100B (1:400, Dako, Германия) для определения уровня S100B, анти-GFAP (1:100, Sigma, США) для детекции доли астроцитов в культуре, анти-Iba1 (1:200, Abcam, Великобритания) для определения доли микроглии. Для анализа формирования стресс-фибрилл в астроцитах клетки окрашивали фаллоидином, специфически связывающего F-актин (1:20, Thermo Scientific, США), с пришитой флуоресцентной меткой. На следующий день астроциты отмывали 1х 10 мин низкосолевым буфером, 2х 10 мин высокосолевым буфером и инкубировали со вторичными антителами (1:500, AlexaFluor, Thermo Scientific, США) 1,5 часа. По истечение времени инкубации клетки отмывали от несвязавшихся антител по аналогичной схеме, после чего инкубировали с ДНК-тропным красителем Syto-59 (1:20000, Sigma, США) 20 минут. Избыток красителя отмывали 3х 5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Клетки, окрашенные фаллоидином, инкубировали только с Syto-59, вторичные антитела не использовали. Астроциты визуализовали при помощи конфокального микроскопа. В работе использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 510 (Carl Zeiss, Германия). С каждого стекла снимали не менее пяти произвольно выбранных полей. Стёкла были продублированы для каждой анализировали, Микрофотографии группы. используя программу ImageJ. Экспрессию S100B в клетках и уровень образования стресс-фибрилл F-актина оценивали по изменению интенсивности флуоресценции антител к S100B И фаллоидина в экспериментальных стёклах по сравнению с контрольными. Отношение интенсивности флуоресценции анти-S100В И фаллоидина К количеству ядер на микрофотографиях экспериментальных групп нормировали к аналогичному параметру в контрольной группе. Для анализа различий в формировании пустых полей рассчитывали среднее отношение площади этих полей к общей площади снимка для каждой экспериментальной группы,

полученные значения нормировали относительно значений в контрольных группах. Пустыми полями считали такие, в которых в проходящем свете отсутствовали клетки и флуоресцентный сигнал не превышал фоновый более, чем на 10%. Фоновым считался сигнал с той же чашки, заполненной буфером, но не содержащей клеток.

### 2.11. Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили с помощью программ GraphPad Prism 5 для Windows и GraphPad Prism 6 для MacOS (GraphPad Software Inc., США). Для анализа использовали непараметрическую статистику (Kruskal-Wallis случае test), нормального test, Mann-Witney В распределения выборок использовали one-way ANOVA. Нормальность распределения выборок проверяли с использованием 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 повторах, п-число независимых экспериментов. В качестве независимого биологического повтора принимали результаты, полученные с одной посадки клеток. Данные представлены в виде среднего ± ошибка среднего арифметического (SEM). Различия считали статистически значимыми при p < 0.05.

# ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Влияние ишемии/реперфузии на культивируемые астроциты крысы

Для симуляции ишемии *in vitro* мы использовали модель депривации кислорода и глюкозы, ключевых факторов, недостаток которых вызывает нарушение метаболизма и гибель клеток [329].

### 3.1.1. Характеристика культуры астроцитов

Культура астроцитов, используемая в данном исследовании, была охарактеризована по процентному содержанию астроцитов и микроглии (Рисунок 8). Чистота культуры астроцитов составила 90% и содержала не более 10% примесей микроглии.



Рисунок 8. Иммунофлуоресцентное окрашивание культуры астроцитов, используемой в исследовании. Анти-GFAP (зелёная флуоресценция, маркер астроцитов), анти-Iba1 (маркер микроглии, здесь отсутствует) и Syto-59 (синия флуоресценция, ядра).

# 3.1.2. 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 сниженного уровня кислорода (депривация кислорода, КД) и группа, лишённая глюкозы в условиях сниженного уровня кислорода (кислород-глюкозная депривация, КГД). Астроциты подвергали депривации в течение 5 часов (0 г/мл глюкоза и/или гипоксия 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), после чего реперфузировали, то есть возвращали в нормальные условия (4,5 г/л глюкоза и/или нормоксия 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>).

Сразу после 5-ти часовой ишемии мы детектировали выброс ЛДГ в группах КГ и КГД, что указывает на гибель клеток путём некроза. Превышение уровня ЛДГ составило около 21% для обеих групп по сравнению с контролем (Kruskal-Wallis test: H (4, 47)=32.54, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.05) (Рисунок 9А). Через 12 часов после начала реперфузии выживаемость астроцитов в группах КД и КГД оказалась ниже на 20% и 17% по сравнению с контрольной группой (Kruskal-Wallis test: H (4, 18)=14.8, p < 0.01, post hoc Dunn's test, p < 0.05) (Рисунок 9Б). Через 24 часа в группах КД и КГД происходило повышение пролиферации астроцитов на 22% и 26%, соответственно (Kruskal-Wallis test: H (4, 17)=14.2, p < 0.01, post hoc Dunn's test, p < 0.05) (Рисунок 9Б). Повышение пролиферации является характерным признаком реактивной активации астроглии.



Рисунок 9. Влияние депривации кислорода и глюкозы на уровень ЛДГ после 5-ти часов ишемии (А) и на выживаемость астроцитов через 12 и 24 часа (Б) после начала реперфузии. Данные отображены в виде среднего ± SEM

 $(n\geq 3)$ . \*p < 0.05 относительно контрольной группы, Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

# 3.1.3. Депривация кислорода и глюкозы стимулирует перестройку актинового цитоскелета астроцитов

Повышение пролиферации астроцитов через 24 часа после перенесённой ишемии может свидетельствовать об активации астроглии. Известно, что астроциты при активации могут претерпевать морфологические изменения [333]. Одним из характерных признаков изменения морфологии астроцитов является реорганизация актинового цитоскелета, сопровождающаяся появлением выраженных фибрилл F-актина, называемых стресс-фибриллами, пересекающих астроцит в различных направлениях [334, 335]. Стресс-фибриллы служат сократительным аппаратом в немышечных клетках. Их появление ассоциировано с мобилизацией клеток, изменением их формы, то есть с процессами, которые характерны для активированной астроглии.

В связи с этим, мы решили проверить влияние ишемии на перестройку астроцитов. Для актиновый актинового цитоскелета ЭТОГО цитоскелет конфокальным визуализовали под микроскопом при помощи метода иммуноцитохимии с использованием фаллоидина (маркёра F-актина), меченного флуоресцентной меткой.

Было обнаружено, что депривация кислорода и глюкозы действительно влияет на перестройку актинового цитоскелета и появление стресс-фибрилл. Флуоресценция фаллоидина, нормализованная к числу клеток, оказалась в 2,5 раза выше в группе КГД по сравнению с контролем (р < 0.05, Mann-Whitney test) (Рисунок 10).



Рисунок 10. Депривация глюкозы и кислорода влияет на актиновый цитоскелет астроцитов крысы. А - флуоресценция фаллоидина, специфически окрашивающего F-актин, в астроцитах в норме и в условиях депривации кислорода и глюкозы. 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 ± SEM (n=3). \*p < 0.05 относительно контрольной группы, Mann-Whitney test.

Таким образом, астроциты крысы наиболее чувствительны к депривации кислорода и депривации кислорода и глюкозы. 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.

# **3.2.** Провоспалительные эффекты тромбина на культивируемые астроциты грызунов

В результате патологических процессов в ЦНС, сопровождающихся воспалением ткани и повреждением ГЭБ, в очаге повреждения может появляться

72
тромбин в высоких концентрациях (>10 нМ) [100, 105, 123, 124, 141]. В нашей работе мы исследовали влияние тромбина на астроциты. Из анализа литературы известно, что тромбин способен стимулировать пролиферацию астроглии, вызывая активацию астроцитов [9] [22] [130]. Активация астроцитов, процесс, наблюдаемый при заболеваниях ЦНС, характеризуется изменением морфологического и функционального состояния клеток, сменой секреторного профиля на провоспалительный. Мы охарактеризовали влияние тромбина в различных концентрациях на ряд параметров, которые могут изменяться при активации астроцитов, среди которых пролиферация, состояние цитоскелета, синтез белка S100B, синтез NO.

#### 3.2.1. Дозозависимое влияние тромбина на выживаемость астроцитов грызунов

Действие тромбина на выживаемость клеток оценивали в диапазоне концентраций 10-100 нМ. Астроциты инкубировали в течение 48 часов с сериновой протеазой в соответствующей концентрации, после чего производили анализ выживаемости с помощью тестов МТТ, либо WST-1.

Было обнаружено, что тромбин дозозависимо повышает выживаемость астроцитов крысы, то есть запускает пролиферацию (Рисунок 11). Тромбин в концентрации 10 нМ повышал пролиферацию на 11% по сравнению с контролем (one-way ANOVA: F (3, 40)=18.39, p < 0.0001, post hoc Dunnett's test, p < 0.05). Тромбин в концентрациях 50 нМ и 100 нМ (высокие концентрации тромбина, лежащие в физиологическом диапазоне) оказывал более существенное влияние и повышал пролиферацию на 28% и 37%, соответственно (one-way ANOVA: F (3, 40)=18.39, p < 0.0001, post hoc Dunnett's test, p < 0.001 и p < 0.0001, соответственно). Полученные результаты по пролиферации согласуются с данными литературы [131, 336].



Рисунок 11. Тромбин в концентрациях 10-100 нМ стимулирует пролиферацию астроцитов крысы. Данные отображены в виде среднего  $\pm$  SEM (n $\geq$ 8). \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001 относительно контрольной группы, one-way ANOVA, post-hoc Dunnett's test.

Чтобы проверить универсальность митогенного эффекта тромбина на астроциты, мы использовали первичные культуры астроцитов, полученные из мыши. Клетки инкубировали с различными концентрациями тромбина по аналогичному протоколу.

Было обнаружено, что тромбин в использованных концентрациях 10-100 нМ не влияет на выживаемость астроцитов мыши (Kruskal-Wallis test: H (4, 12)=2.9, p=0.45, post hoc Dunn's test, p > 0.05) (Рисунок 12). Отсутствие митогенного эффекта тромбина оказалось неожиданным, поскольку в литературе описано стимулирующее действие тромбина на пролиферацию астроцитов мыши [9, 337, 338]. В исследовании Nicole с соавт. обработка астроцитов мыши специфическим пептидом-агонистом PAR1 (основной рецептор тромбина) дозозависимо стимулировала пролиферацию, повышая её минимум в 2,5 раза по сравнению с контрольными значениями [9]. В исследовании Sorensen с соавт. воздействие 50 пкМ тромбина приводило к увеличению пролиферации кортикальных астроцитов мыши приблизительно в 4-5 раз по сравнению с контрольными [337].

Поскольку в нашей работе не удалось обнаружить какого-либо митогенного эффекта тромбина на астроглию мыши, в дальнейших исследованиях тромбина клетки данного происхождения решено было не использовать.



Рисунок 12. Тромбин не оказывает влияния на пролиферацию астроцитов мыши. Данные отображены в виде среднего ± SEM (n=3). Для поиска статистически значимых различий между группами использован Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

# 3.2.2. Влияние тромбина на экспрессию белка S100B в астроцитах крысы

Повреждение ЦНС может сопровождаться повышением уровня экспрессии белка S100B астроглией [336]. S100B относится к группе кальций-связывающих низкомолекулярных белков, регулирует процессы пролиферации И дифференцировки клеток, а также стабилизирует актиновый цитоскелет [339]. Подавление его экспрессии в астроцитах приводит к разборке стресс-фибрилл, уменьшению подвижности клеток, что указывает на участие S100B в регуляции морфологии астроцитов [339]. В связи с этим, мы исследовали уровень S100B в астроцитах под воздействием тромбина. Уровень белка S100B в контроле и на фоне тромбина в широком диапазоне концентраций (1-1000 нМ) оценивали с помощью иммуноцитохимического окрашивания специфическими антителами к S100B.

В результате было установлено, что интенсивность флуоресценции S100B (флуоресценция S100B/кол-во ядер) в астроцитах крысы возрастает в присутствии тромбина 10, 100 и 1000 нМ в 1,5 раза, 1,8 раза и в 2 раза, соответственно, по сравнению с контрольными значениями (Kruskal-Wallis test: H (5, 43)=30.53, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.05, p < 0.0001 и p < 0.0001, соответственно) (Рисунок 13). Для тромбина в концентрации 1 нМ не было обнаружено статистически значимого различия (Kruskal-Wallis test: H (5, 43)=30.53, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p > 0.05).



Рисунок 13. Тромбин дозозависимо влияет на уровень белка S100B в астроцитах крысы. А - флуоресценция белка S100B, окрашенного

специфическими антителами, в астроцитах под воздействием тромбина в разных концентрациях. Б - типичные микрофотографии астроцитов в контроле и в присутствии тромбина (Тр) (зелёная флуоресценция – антитела к S100B, синяя флуоресценция – ДНК-тропный краситель Syto-59). 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.

# 3.2.3. Тромбин стимулирует перестройку актинового цитоскелета астроцитов крысы

В процессе активации астроглия может претерпевать морфологические изменения, одним из признаков которых служит реорганизация актинового цитоскелета и появление внутриклеточных стресс-фибрилл. Мы оценили влияние тромбина на перестройку актинового цитоскелета. Актиновый цитоскелет окрашивали флуоресцентно-меченым фаллоидином (маркёр F-актина) и визуализовали при помощи конфокальной микроскопии.

Было обнаружено, что тромбин в концентрациях 100 и 1000 нМ вызывает реорганизацию актина в астроцитах и приводит к образованию стресс-фибрилл флуоресценции (Рисунок 14). Интенсивность фаллоидина клетках в (флуоресценция фаллоидина/кол-во ядер) возрастала в 1,67 и 2,52 раза на фоне тромбина 100 нМ и 1000 нМ через 24 часа от начала воздействия по сравнению с контрольными значениями (Kruskal-Wallis test: H (5, 32)=31.23, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.05 и p < 0.0001, соответственно). Тромбин в концентрациях 1 нМ и 10 нМ не оказывал статистически значимого влияния на перестройку цитоскелета (Kruskal-Wallis test: H (5, 32)=31.23, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p > 0.05).



Рисунок 14. Тромбин дозозависимо влияет на перестройку актинового цитоскелета астроцитов крысы. А - флуоресценция фаллоидина, специфически окрашивающего F-актин, В астроцитах на фоне тромбина В разных концентрациях. Б - типичные микрофотографии актинового цитоскелета астроцитов (красная флуоресценция) в контроле и на фоне тромбина (Тр). Данные отображены в виде среднего ± SEM (n≥3). \*p < 0.05, \*\*\*\*p < 0.0001 относительно контрольной группы, Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

3.2.4. Тромбин индуцирует образование пустых полей в культуре астроцитов

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, но не с гибелью клеток [328].

Мы изучили влияние тромбина на образование пустых полей в монослое астроцитов кортекса крысы. Культуру клеток инкубировали с тромбином, после чего окрашивали на GFAP (кислый фибриллярный белок, маркёр астроцитов) и визуализовали под конфокальным микроскопом. Интенсивность образования пустых полей оценивали как суммарную площадь зон, свободных от клеток, на снимке к общей площади снимка. Было обнаружено, что доля пустых полей возрастала на фоне тромбина 100 и 1000 нМ в 15 и 16 раз, соответственно, по сравнению с контрольными значениями (Kruskal-Wallis test: H (5, 19)=16.49, p < 0.01, post hoc Dunn's test, p < 0.01 и p < 0.05, соответственно) (Рисунок 15).



Рисунок 15. Тромбин вызывает формирование пустых полей в культуре астроцитов крысы. А - доля пустых полей в культуре астроцитов крысы при воздействии тромбина в разных концентрациях. Б - микрофотографии контрольной культуры клеток и на фоне тромбина (Тр) (зелёная флуоресценция - антитела к GFAP). Пустые поля отмечены белым контуром. Данные отображены в виде среднего  $\pm$  SEM (n $\geq$ 3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 относительно контрольной группы, Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что тромбин вызывает морфологические изменения астроцитов крысы, свойственные для реактивной астроглии.

#### 3.2.5. Тромбин стимулирует синтез NO астроцитами крысы

Смена секреторного профиля клеток на провоспалительный является характерной чертой активированной астроглии. Известно, ЧТО астроциты способны секретировать плеяду провоспалительных цитокинов, хемокинов и ростовых факторов (подробно описано в Главе 1). Оксид азота (NO) - одна из сигнальных молекул, обеспечивающая релаксацию сосудов, выступает в качестве медиатора воспаления при патологических состояниях организма, сопровождающихся гиперпродукцией NO [340]. Астроциты синтезируют и секретируют NO под воздействием разнообразных провоспалительных стимулов [341]. По сравнению с измерением уровня цитокинов, являющихся белковыми молекулами и требующими использования специфических антител и набора реагентов, измерение уровня NO азота является более простым, быстрым, дешёвым и доступным способом оценить провоспалительный статус клеток.

Мы оценили продукцию NO астроцитами при воздействии тромбина. Астроциты инкубировали с тромбином 10 нМ и 100 нМ в течение 24 часов, после чего анализировали содержание нитритов/нитратов, продуктов окисления NO, в среде культивирования. Было обнаружено, что тромбин в концентрации 100 нМ вызывает статистически значимое повышение уровня нитритов в среде (Kruskal-Wallis test: H (3, 17)=12.71, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.01) (Рисунок 16). В группе, обработанной тромбином 10 нМ, подобного не наблюдалось (Kruskal-Wallis test: H (3, 17)=12.71, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p > 0.05).



81

Рисунок 16. Влияние тромбина на синтез NO астроцитами крысы. Данные отображены в виде среднего ± SEM (n≥5). \*\*p < 0.01 относительно контрольной группы, Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

Таким образом, в результате комплексной оценки состояния астроцитов установлено, что тромбин оказывает активирующее влияние на астроглию, начиная с концентрации 10 нМ и наиболее эффективно в концентрациях 100 нМ и выше. Тромбин стимулирует пролиферацию астроцитов, влияет на морфологию клеток, повышая экспрессию S100B и изменяя состояние цитоскелета, вызывает продукцию оксида азота. Образование пустых полей в культуре может также свидетельствовать об изменении морфологии клеток и, возможно, миграции. Подобные эффекты тромбина на астроциты описаны в литературе, однако в нашем исследовании впервые проанализировано действие протеазы в широком концентрационном диапазоне. Кроме того, впервые ΜЫ обнаружили стимулирующее действие тромбина в высокой концентрации (в физиологическом диапазоне) на секрецию оксида азота астроцитами крысы.

#### 3.3. Влияние АТФ на активацию астроцитов крысы

Повреждения ЦНС, сопровождающиеся гибелью клеток и воспалением, приводят к локальному многократному повышению концентрации АТФ в межклеточном пространстве (мкмоль/л и ммоль/л) [26]. АТФ в высоких концентрациях 0,1-1 мМ активирует особый ионотропный рецептор Р2Х7, являющийся одним из ключевых драйверов воспаления в ЦНС.

Мы исследовали влияние 2',3'-О-(бензоил-4-бензоил)-АТР (бензоил-АТФ), стабильного аналога АТФ и активного агониста Р2Х7, на ряд параметров культуры астроцитов крысы.

#### 3.3.1. Бензоил-АТФ вызывает гибель астроцитов крысы

Действие бензоил-АТФ на выживаемость астроцитов крысы оценивали в диапазоне концентраций 100-500 мкМ. Астроциты инкубировали с бензоил-АТФ 48 часов, после чего анализировали выживаемость клеток методом WST-1.

Было обнаружено, что инкубация астроцитов с бензоил-АТФ 300 мкМ и 500 мкМ приводит к гибели клеток, снижая выживаемость на 10% и 25%, соответственно, по сравнению с контрольными значениями (one-way ANOVA: F (3, 28)=32.23, p < 0.0001, post hoc Dunnett's test, p < 0.05 и p < 0.0001, соответственно) (Рисунок 17).

Подобные эффекты бензоил-АТФ на выживаемость астроцитов известны из литературы. Например, в исследовании Salas с соавт. добавление 500 мкМ бензоил-АТФ к астроцитам мозжечка мыши вызывало формирование крупных пор в мембране и клеточную гибель [342].



Рисунок 17. Влияние бензоил-АТФ (бзАТФ) на выживаемость астроцитов крысы. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM (n $\geq$ 7). \*p < 0.05, \*\*\*\*p < 0.0001, one-way ANOVA, post-hoc Dunnett's test.

# 3.3.2. Снижение выживаемости астроцитов на фоне бензоил-АТФ обусловлено активацией рецепторов Р2Х7

Далее мы оценили роль отдельных типов рецепторов в гибели астроцитов крысы, вызванной бензоил-АТФ. Для этого мы использовали арсенал ингибиторов пуринергических рецепторов.

Астроциты инкубировали с неселективным ингибитором рецепторов Р2, пиродаксальфосфат-6-азофенил-2,4-дисульфоновой кислотой (PPADS), в концентрации 100 мкМ в течение 1 часа, после чего клетки отмывали и добавляли

свежую среду. Затем добавляли бензоил-АТФ 500 мкМ, через 48 часов инкубации выживаемость измеряли методом WST-1.

Предварительная обработка астроцитов ингибитором PPADS статистически значимо блокировала гибель клеток, вызванную бензоил-АТФ (Рисунок 18). Выживаемость астроцитов крысы в группе «PPADS + бензоил-АТФ» не отличалась от контрольных значений (Kruskal-Wallis test: H (4, 27)=27.81, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p > 0.05). Значение выживаемости в группе «PPADS + бензоил-АТФ» превышало выживаемость в группе, обработанной одним бензоил-АТФ, на 23% (Kruskal-Wallis test: H (4, 27)=27.81, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.01). Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении рецепторов P2 в реализацию гибели астроцитов крысы, индуцируемую бензоил-АТФ.



Рисунок 18. Использование неселективного ингибитора рецепторов P2, PPADS 100 мкМ, отменяет гибель астроцитов крысы на фоне бензоил-АТФ 500 мкМ. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM (n $\geq$ 3). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

Чтобы доказать участие P2X7 в бензоил-АТФ-опосредованной гибели астроцитов, мы использовали специфические ингибиторы рецептора P2X7: ортостерический ингибитор A438079, блокирующий центры связывания рецептора с АТФ и являющийся производным тетразолия, и аллостерический антагонист бриллиантовый синий G (BBG) [237, 244] [243]. К клеткам добавляли обозначенные антагонисты до конечных концентраций 10 мкМ и 100 мкМ и

инкубировали в течение 1 часа, после чего среду меняли и вносили бензоил-АТФ 300 мкМ и 500 мкМ. Через 48 часов измеряли выживаемость астроцитов методом WST-1.

В результате было обнаружено, что антагонисты Р2Х7 статистически значимо блокируют гибель астроцитов на фоне токсического действия бензоил-АТФ 300 мкМ и 500 мкМ (Рисунок 19А, Б). Выживаемость астроцитов крысы в группах «ингибитор P2X7 + бензоил-АТФ» не отличалась, либо превосходила значения в контроле. Выживаемость в группе «А438079 100 мкМ + бензоил-АТФ 300 мкМ» на 33% превосходила значение выживаемости в группе, получавшей один бензоил-АТФ 300 мкМ (Kruskal-Wallis test: H (7, 39)=28.6, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.01). Значения выживаемости в группах «А438079 10 мкМ + бензоил-АТФ 500 мкМ», «А438079 100 мкМ + бензоил-АТФ 500 мкМ» превышали выживаемость клеток, обработанных одним бензоил-АТФ 500 мкМ, на 36% и 42%, соответственно (Kruskal-Wallis test: H (7, 39)=28.6, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.001). Выживаемость астроцитов в группе «BBG 100 мкМ + бензоил-АТФ 300 мкМ» на 25% превосходила значение выживаемости в группе, получавшей один бензоил-АТФ 300 мкМ (Kruskal-Wallis test: H (7, 48)=36.79, p <0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.01). Значение выживаемости в группе «BBG 100 мкМ + бензоил-АТФ 500 мкМ» на 25% превышало значение выживаемости клеток, обработанных одним бензоил-АТФ 500 мкМ (Kruskal-Wallis test: Н (7, 48)=36.79, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.001).

Эти данные свидетельствуют об участии рецепторов P2X7 в реализации гибели астроцитов крысы при воздействии бензоил-АТФ.



Рисунок 19. Использование ингибиторов Р2Х7 блокирует гибель астроцитов крысы, индуцируемую бензоил-АТФ. А - выживаемость астроцитов на фоне ингибитора рецепторов Р2Х7 (А438079, 10 и 100 мкМ) и бензоил-АТФ 300 и 500 мкМ. Б - выживаемость астроцитов на фоне ингибитора рецепторов Р2Х7 (BBG, 10 и 100 мкМ) и бензоил-АТФ 300 и 500 мкМ. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM (n $\geq$ 3). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

#### 3.3.1. Бензоил-АТФ стимулирует синтез NO астроцитами крысы

С целью дальнейшей характеристики процессов, запускаемых в астроцитах воздействием бензоил-АТФ, крысы под ΜЫ решили исследовать провоспалительный секреторный профиль клеток. В качестве показателя провоспалительного статуса астроцитов, как и В случае тромбином, С использовали уровень синтеза NO клетками. Измерение осуществляли через 24 часа инкубации с веществами.

Было обнаружено, что инкубация астроцитов крысы с бензоил-АТФ 300 мкМ и 500 мкМ приводит к повышению уровня нитритов в культуральной среде клеток на 36% и 32%, соответственно, по сравнению с контролем (one-way ANOVA: F (3, 25)=12.28, p < 0.0001, post hoc Dunnett's test, p < 0.001) (Рисунок 20А). Продукция оксида азота единичной клеткой, рассчитанная как отношение уровня нитритов к значению выживаемости клеток, в группах, обработанных бензоил-АТФ 300 мкМ и 500 мкМ, превышала значения в контроле на 45% и 72%, соответственно (one-way ANOVA: F (3, 25)=17.40, p < 0.0001, post hoc Dunnett's test, p < 0.01 и p < 0.0001, соответственно) (Рисунок 20Б).





среднего  $\pm$  SEM (n $\geq$ 7). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001, one-way ANOVA, post hoc Dunnett's test.

Далее мы исследовали накопление нитритов в культуральной среде во времени и обнаружили, что уже через 12 часов после воздействия бензоил-АТФ 500 мкМ наблюдается пик содержания нитросоединений. Уровни содержания нитритов через 12 и 24 часа после воздействия бензоил-АТФ превышали значения в аналогичных контрольных группах на 32% и 35% (p < 0.05, Mann-Whitney test). Уровень нитритов через 24 часа после воздействия бензоил-АТФ не отличался от уровня нитритов через 12 часов, что свидетельствует о выходе на условное плато (p>0.1, Mann-Whitney test) (Рисунок 21).



Рисунок 21. Накопление нитритов в культуральной среде астроцитов крысы во времени. Данные отображены в виде среднего ± SEM (n=3). \*p < 0.05, Mann-Whitney test.

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

Чтобы проверить вовлечение рецепторов Р2Х7 в активацию синтеза NO астроцитами под воздействием бензоил-АТФ, мы использовали, как и в случае с исследованием выживаемости, специфические ингибиторы Р2Х7 – А438079 и BBG. Клетки обрабатывали по раннее описанному протоколу и через 24 часа инкубации с веществами проводили измерение содержания нитритов.

Неожиданно мы обнаружили, что предварительная обработка астроцитов ингибиторами P2X7 не только не блокирует накопление нитритов В культуральной жидкости астроцитов, но, напротив, усиливает синтез NO клетками, обработанными бензоил-АТФ (Рисунок 22А). В группе «А438079 100 мкМ + бензоил-АТФ 300 мкМ» содержание нитритов было повышено на 64% по сравнению с группой «бензоил-АТФ 300 мкМ» (Kruskal-Wallis test: Н (7, 39)=29.62, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.01). Для групп «A438079 10 мкМ + бензоил-АТФ 500 мкМ» и «А438079 100 мкМ + бензоил-АТФ 500 мкМ» превышение синтеза NO составило 54% и 92% по сравнению с группой, обработанной одним бензоил-АТ $\Phi$  500 мкМ (Kruskal-Wallis test: H (7, 39)=29.62, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.05 и p < 0.001). Анализ уровня продукции нитритов в пересчёте на единичную клетку показал статистически значимое превышение уровней нитритов в группах «А438079 + бензоилАТФ» по сравнению с контрольными клетками (Рисунок 22Б).



Рисунок 22. Влияние ингибитора Р2Х7 на стимулированную бензоил-АТФ продукцию NO астроцитами крысы. А - продукция NO астроцитами на фоне ингибитора Р2Х7 (А438079, 10 и 100 мкМ) и бензоил-АТФ 300 и 500 мкМ. Б - продукция NO единичной клеткой на фоне ингибитора Р2Х7 (А438079, 10 и 100 мкМ) и бензоил-АТФ 300 и 500 мкМ. Данные представлены в виде среднего  $\pm$ SEM (n≥3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001, Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

Использование антагониста с другим механизмом действия, BBG, также усиливало синтез NO клетками на фоне бензоил-АТФ (Рисунок 23А). В группах

«BBG 100 мкМ + бензоил-АТФ 300 мкМ» и «BBG 100 мкМ + бензоил-АТФ 500 мкМ» наблюдалось статистически значимое увеличение содержания нитритов на 57% и 68% по сравнению с группами «бензоил-АТФ 300 мкМ» и «бензоил-АТФ 500 мкМ» (Kruskal-Wallis test: H (7, 48)=33.86, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.05 и p < 0.001). Анализ уровня продукции нитритов в пересчёте на единичную клетку показал статистически значимое превышение содержания нитритов в группах «BBG + бензоилАТФ» по сравнению с контролем (Рисунок 23Б).



Рисунок 23. Влияние ингибитора Р2Х7 на стимулированную бензоил-АТФ продукцию NO астроцитами крысы. А - продукция NO астроцитами на фоне ингибитора P2X7 (BBG, 10 и 100 мкМ) и бензоил-АТФ 300 и 500 мкМ. Б продукция NO единичной клеткой на фоне ингибитора P2X7 (BBG, 10 и 100 мкМ) и бензоил-АТФ 300 и 500 мкМ. Данные представлены в виде среднего  $\pm$ SEM (n≥3). \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001, Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's test.

Тот факт, что схожий эффект проявляется при использовании обоих антагонистов P2X7, отличающихся по механизмам блокады рецептора, свидетельствует о специфичности процесса, чем об артефакте исследования. Наиболее логичным объяснением наблюдаемого усиления синтеза оксида азота на фоне блокады P2X7 может служить гипотеза об активации бензоил-АТФ других рецепторов семейства P2. Известно, что бензоил-АТФ, являясь наиболее активным агонистом P2X7, тем не менее неселективен и способен активировать другие подтипы P2, например, P2X1 и P2X3, а также метаболизироваться до производных аденина [237] [186]. Чтобы доказать вовлечение рецепторов P2 в синтез оксида азота, мы обработали клетки неселективным антагонистом рецепторов P2, PPADS.

Использование антагониста PPADS полностью блокировало синтез оксида азота астроцитами на фоне воздействия бензоил-АТФ 500 мкМ (Рисунок 24А, Б). Более того, одновременная обработка астроцитов ингибиторами A438079 10 мкМ и PPADS 100 мкМ с последующей стимуляцией бензоил-АТФ 500 мкМ приводила к полной блокаде синтеза оксида азота по сравнению с группой, обработанной A438079 10 мкМ совместно с бензоил-АТФ 500 мкМ (Kruskal-Wallis test: H (5, 37)=30.05, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.05).

Полученный результат позволяет сделать два основных вывода: 1) синтез оксида азота астроцитами под воздействием бензоил-АТФ 500 мкМ обусловлен активацией рецепторов семейства Р2; 2) синтез оксида азота астроцитами под воздействием бензоил-АТФ 500 мкМ реализуется через активацию рецепторов Р2, отличных от Р2Х7.



Рисунок 24. Использование неселективного ингибитора рецепторов P2, PPADS, блокирует синтез NO астроцитами крысы на фоне бензоил-АТФ. А продукция NO астроцитами на фоне ингибитора PPADS 100 мкМ, A438079 10 мкМ и бензоил-АТФ 500 мкМ. Б - продукция NO единичной клеткой на фоне ингибитора PPADS 100 мкМ, A438079 10 мкМ и бензоил-АТФ 500 мкМ. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM (n $\geq$ 3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001, Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

# 3.3.3. Синтез NO астроцитами крысы под воздействием бензоил-АТФ обусловлен активацией индуцибельной NO-синтазы

Оксид азота является одним из продуктов реакции окисления L-аргинина, катализируемой ферментом NO-синтазой [343]. На сегодняшний день известно три NO-синтазы, являющиеся продуктами разных генов: нейрональная NOсинтаза (nNOS), эндотелиальная eNOS индуцибельная iNOS И [343]. Нейрональная и эндотелиальная NO-синтазы являются кальций-зависимыми ферментами и экспрессируются конститутивно в различных типах клеток, преимущественно в нейронах и эндотелии [344]. Экспрессия индуцибельной NOсинтазы происходит под воздействием провоспалительных стимулов, например, цитокинов, липополисахарида [344] [345]. Астроциты экспрессируют все три типа NO-синтаз [345] [346] [347] [348].

Мы использовали неселективный ингибитор NO-синтаз, L-NAME, совместно с обработкой астроцитов бензоил-АТФ 500 мкМ. Ингибитор L-NAME вносили к клеткам за час до добавления бензоил-АТФ до конечных концентраций 100 мкМ и 1000 мкМ. Измерение уровня нитритов, как и в предыдущих исследованиях, производили через 24 часа совместной инкубации астроцитов с веществами.

Оказалось, что использование ингибитора **NO-**синтаз блокировало механизм синтеза оксида азота в клетках, стимулированных бензоил-АТФ 500 мкМ. В группах «L-NAME 100 мкМ + бензоил-АТФ» и «L-NAME 1000 мкМ + бензоил-АТФ» наблюдалось статистически значимое снижение уровней содержания нитритов на 34% и 36%, соответственно, по сравнению с группой, обработанной одним лишь бензоил-АТФ (Kruskal-Wallis test: H (4, 50)=24.8, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.05) (Рисунок 25).



Рисунок 25. Использование неселективного ингибитора NO-синтазы, L-NAME, влияет на синтез NO астроцитами крысы в условиях стимуляции бензоил-АТФ 500 мкМ. Концентрации L-NAME 100 мкМ и 1000 мкМ. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM (n $\geq$ 3). \*p < 0.05, Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test. Вовлечение NO-синтаз подтвердило специфичность наблюдаемого в ходе экспериментов повышения уровня нитритов при воздействии бензоил-АТФ на астроциты. Мы предположили, что в усилении синтеза NO может принимать участие индуцибельная NO-синтаза, поскольку её экспрессия индуцируется медиаторами воспаления. Измерение относительной экспрессии iNOS проводили в разных временных точках после внесения веществ к астроцитам методом количественной ПЦР.

Было обнаружено, что относительная экспрессия iNOS впервые детектируется через 6 часов после внесения бензоил-АТФ 500 мкМ (Рисунок 26). Нам не удалось обнаружить транскрипты iNOS через 12 часов 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 часа после добавления веществ к клеткам. Через 6 часов в группах «A438079 + бензоил-АТФ» и «BBG + бензоил-АТФ» наблюдалась отчётливая экспрессия iNOS, которая достигала максимума через 12 часов в исследуемом временном интервале.

Результаты количественной ПЦР согласуются и подтверждают результаты измерений уровней нитритов. Как монообработка астроцитов крысы бензоил-АТФ, так и совместная обработка с ингибиторами Р2Х7 приводит к запуску экспрессии индуцибельной NO-синтазы. В случае блокады Р2Х7 активация экспресии iNOS значительно более выражена и пролонгирована во времени по сравнению с монообработкой бензоил-АТФ, что опять же согласуется с результатами по измерению нитритов, полученных для соответствующих экспериментальных групп.



Рисунок 26. Изменение относительной экспрессии гена iNOS в астроцитах во времени на фоне использования ингибиторов P2X7, A438079 и BBG, и бензоил-АТФ 500 мкМ. Концентрация A438079 10 мкМ, BBG 10 мкМ. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM (n $\geq$ 3). \*p < 0.05 относительно контрольного значения, Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

Таким образом, стимуляция астроцитов крысы бензоил-АТФ вызывает гибель клеток и синтез оксида азота, обусловенный запуском экспрессии индуцибельной NO-синтазы. Активация рецептора P2X7 играет ключевую роль в выживаемости астроцитов, но не в запуске синтеза оксида азота, обусловленного активацией других рецепторов семейства P2, отличных от P2X7.

#### 3.4. Провоспалительные эффекты ЛПС

Одним из осложнений, наблюдающихся у пациентов с ишемией, является инфекционное заражение [349]. Мы использовали липополисахарид, компонент бактериальной стенки и агонист TLR4, для симуляции воспаления, наблюдающегося при ишемии, осложнённой инфекцией. Мы исследовали влияние ЛПС на выживаемость астроцитов и секрецию NO.

# 3.4.1. Эндотоксинемия стимулирует выраженную пролиферацию астроцитов крысы

Астроциты крысы инкубировали с ЛПС в широком диапазоне концентраций и через 48 часов измеряли выживаемость методом WST-1.

Было обнаружено, что ЛПС в концентрациях от 0,01 мкг/мл до 10 мкг/мл стимулировал мощную пролиферацию астроцитов. Уровень пролиферации был максимальным при обработке астроцитов ЛПС в минимальной концентрации 0,01 мкг/мл, в 2,5 раза превышая контрольные значения (Kruskal-Wallis test: H (8, 76)=59.23, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.05) (Рисунок 27). 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 (Kruskal-Wallis test: H (8, 76)=59.23, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.05).



Рисунок 27. ЛПС в концентрации 0,01-10 мкг/мл стимулирует пролиферацию астроцитов крысы. Влияние липополисахарида (ЛПС) на выживаемость астроцитов. Данные представлены в виде среднего ± SEM (n=7). \*p < 0.05 относительно контроля (к), #p < 0.05 относительно ЛПС 0.01 мкг/мл, Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

3.4.2. Эндотоксинемия стимулирует синтез оксида азота астроцитами крысы

Астроциты обрабатывали ЛПС и измеряли уровень нитритов в культуральной среде по протоколу, описанному раннее.

ЛПС во всех использованных концентрациях кроме 0,01 мкг/мл вызывал значительное высвобождение NO клетками (Рисунок 28). Максимальное высвобождение оксида азота наблюдалось на фоне ЛПС 2 мкг/мл и превышало значения в контроле в 3,7 раза (Kruskal-Wallis test: H (8, 70)=58.93, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.05). Уровень нитритов на фоне остальных концентраций ЛПС превышал контрольный приблизительно в 2 раза (Kruskal-Wallis test: H (8, 70)=58.93, p < 0.0001, post hoc Dunn's test, p < 0.001, post hoc Dunn's test, p < 0.05).



Рисунок 28. Влияние липополисахарида (ЛПС) на синтез NO астроцитами крысы. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM (n=7). \*p < 0.05 относительно контроля (к), Kruskal-Wallis test, post hoc Dunn's test.

# 3.5. Внутриклеточные эффекты тромбина, бензоил-АТФ и липополисахарида

Многие заболевания ЦНС сопровождаются активацией провоспалительных сигнальных систем [350]. На предыдущих этапах работы мы охарактеризовали влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на выживаемость астроцитов, состояние

цитоскелета, провоспалительную секрецию. В качестве первичного маркёра провоспалительной секреции был исследован уровень высвобождения NO стимулированными клетками. Определив действующие концентрации используемых веществ, вызывающие выраженный клеточный ответ, далее мы изучали влияние стимуляции на внутриклеточные сигнальные молекулы и охарактеризовали индуцируемый провоспалительный профиль секреции астроцитов более полно.

# 3.5.1. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на индекс Bax/Bcl-2 в астроцитах крысы

Мы исследовали влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на индекс апоптоза Bax/Bcl-2. Белок Bax стимулирует клеточную гибель, вызывая пермеабилизацию мембраны митохондрий [351] [352]. Белок Bcl-2, напротив, блокирует апоптоз, ингибируя Bax [352]. Баланс проапоптотических (Bax) и антиапоптотических (Bcl-2) белков, синтезируемых клетками, определяет судьбу клетки, поддерживая её выживаемость, либо вызывая гибель путём апоптоза [351].

Астроциты инкубировали с тромбином 100 нМ, бензоил-АТФ 500 мкМ, A438079 10 мкМ + бензоил-АТФ 500 мкМ и ЛПС 1 мкг/мл. Через 24 часа клетки лизировали. Уровень Вах и Bcl-2 оценивали с помощью вестерн-блота с использованием специфических антител.

Индекс Bax/Bcl-2 оказался статистически значимо выше в группах, получавших тромбин, либо ЛПС, превышая контрольные значения в 2,23 и 2,84 раза, соответственно (р < 0.05, Mann-Whitney test) (Рисунок 29). Изменение Bax/Bcl-2 в большей степени было обусловлено увеличением уровня белка Bax, чем уменьшением Bcl-2. Инкубация с бензоил-АТФ 500 мкМ не приводила к значимому изменению индекса Bax/Bcl-2 (р > 0.05, Mann-Whitney test).



Рисунок 29. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на содержание белков Вах и Bcl-2 в астроцитах крысы. А – соотношение уровней белков Вах и Bcl-2 в астроцитах, обработанных тромбином (100 нМ), бензоил-АТФ (500 мкМ), A438079 (10 мкМ), A438079 (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 ± SEM (n≥3). \*p < 0.05 относительно контроля, Mann-Whitney test.

#### 3.5.2. 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 принадлежит к семейству высококонсервативных белковшаперонов, обнаруживающихся у всех эукариот [353]. HSP90 участвует в фолдинге и стабилизации белков-клиентов, их активации и препятствует

неспецифической [353]. аггрегации белков Многие белки-клиенты, обслуживающиеся HSP90, вовлечены в регуляцию выживаемости/гибели клетки [353]. Белки теплового шока могут активироваться под воздействием различных стрессорных факторов [354]. Было показано, что применение ингибиторов HSP90 блокировало провоспалительную активацию И облегчало глии течение множественного склероза у мышей [354].

Уровень HSP90 через 24 часа инкубации астроцитов с веществами оценивали методом вестерн-блота с использованием специфических антител к HSP90. Нам не удалось обнаружить значимого изменения в содержании белка HSP90 ни для одной из исследуемых групп по сравнению с контролем (p > 0.05, Mann-Whitney test) (Рисунок 30). Тромбин, бензоил-АТФ и ЛПС не влияют на содержание HSP90 в астроцитах.



Рисунок 30. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на содержание белка HSP90. А – уровень 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 ± SEM (n≥3).

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

Для расширения понимания провоспалительный активации астроцитов при воздействии тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС был проведён анализ уровней 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 в область воспаления [355] [356] [357].

Астроциты инкубировали с веществами в течение 6 часов, после чего среду отбирали, клетки лизировали. Содержание цитокинов в среде определяли с помощью коммерческих наборов для ELISA.

IL-6 наблюдалось Значительное увеличение секреции BO всех экспериментальных группах, кроме группы, получавшей один ингибитор A438079 10 мкМ (p < 0.05, Mann-Whitney test) (Рисунок 31). В абсолютных значениях (нормированных на белок) содержание IL-6 составило: группа «контроль» - 64 пг/мл, группа «бензоил-АТФ 500 мкМ» - 560 пг/мл, группа «бензоил-АТФ 500 мкМ + А438079 10 мкМ» - 1336 пг/мл, группа «А438079 10 мкМ» - 78 пг/мл, группа «тромбин 100 нМ» - 1885 пг/мл, группа «ЛПС 1 мкг/мл» - 4744 пг/мл. Наиболее сильным провоспалительным стимулом, как и при измерении уровня оксида азота, оказался липополисахарид. Примечательно, что в группе «бензоил-АТФ 500 мкМ + А438079 10 мкМ» уровень секреции IL-6 оказался выше по сравнению с группой, получавшей только бензоил-АТФ. Подобный эффект мы наблюдали раннее при измерении секреции оксида азота.



Рисунок 31. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на секрецию IL-6 астроцитами крысы. А - секреция IL-6 в абсолютных значения (пг/мл) на фоне обработки клеток тромбином (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 IL-6 (контроль=1). Данные представлены в виде среднего ± SEM (n=4). \*p < 0.05 относительно контроля, Mann-Whitney test.

Неожиданными оказались результаты измерения секреции TNF- $\alpha$  (Рисунок 32). Абсолютные значения содержания цитокина (нормированные на белок) составили: группа «контроль» - 100 пг/мл, группа «бензоил-АТФ 500 мкМ» - 249 пг/мл, группа «бензоил-АТФ 500 мкМ + А438079 10 мкМ» - 297 пг/мл, группа «А438079 10 мкМ» - 82 пг/мл, группа «тромбин 100 нМ» - 50 пг/мл, группа «ЛПС 1 мкг/мл» - 95 пг/мл. Стимуляция секреции TNF- $\alpha$  наблюдалась только на фоне обработки бензоил-АТФ в концентрации 500 мкМ, причём использование ингибитора Р2Х7 совместно с бензоил-АТФ повышенную секрецию не отменяло (р < 0.05, Mann-Whitney test). Обработка ЛПС и тромбином не влияла на секрецию TNF- $\alpha$  (р > 0.05, Mann-Whitney test).



Рисунок 32. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на секрецию TNFа астроцитами крысы. А - секреция TNF- $\alpha$  в абсолютных значения (пг/мл) на фоне обработки клеток тромбином (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- $\alpha$  (контроль=1). Данные представлены в виде среднего ± SEM (n=4). \*p < 0.05 относительно контроля, Mann-Whitney test.

# 3.5.4. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на активацию транскрипционного фактора NF-кВ в астроцитах крысы

Семейство транскрипционных факторов NF-кВ представляет собой группу структурно-родственных белков, вовлечённых в регуляцию таких процессов в эукариотической клетке, как воспалительный ответ, апоптоз, пролиферация [358]. NF-кВ контролирует транскрипцию генов многих провоспалительных факторов, среди которых iNOS, TNF-а, IL-1β и IL-6 [359]. Белки данного семейства находятся в цитоплазме в комплексе с белками ІкВ. В условиях активации клеточного ответа на определённый стимул/стресс NF-кВ и ІкВ подвергаются фосфорилированию, в результате чего фосфо - NF-кВ высвобождается из комплекса и транслоцируется в ядро, где запускает транскрипцию целевых генов [358]. Субъединица р65 в комплексе с р50 является наиболее часто фосфорилируемой при активации канонического пути активации NF-кВ [360].

Поскольку предыдущих работы были на этапах выявлены провоспалительные эффекты исследуемых веществ на астроциты, мы решили проверить активацию NF-кВ в условиях стимуляции, как вероятного механизма провоспалительного ответа клеток. Астроциты обрабатывали бензоил-АТФ, тромбином, ЛПС и инкубировали 4 часа, после чего клетки лизировали. Активацию р65 исследовали методом вестерн-блота при помощи специфического окрашивания фосфорилированной формы р65 (активная форма р65) и общего пула р65 (активный + неактивный р65) в лизате. Отношение интенсивности окрашивания фосфорилированного р65 к интенсивности тотального р65 отражает уровень активации р65 в клетках.

Было обнаружено, что обработка астроцитов как бензоил-АТФ 500 мкМ, так и тромбином 100 нМ повышает уровень фосфорилирования p65 в клетках в 2,6 и в 2 раза, соответственно (p < 0.05 и p < 0.001, Mann-Whitney test) (Рисунок 33). В случае групп «бензоил-АТФ 500 мкМ + А438079 10 мкМ» и получавших ЛПС наблюдалась тенденция к повышению содержания фосфорилированной формы относительно контрольных значений (p=0.06 и p=0.1, Mann-Whitney test).



Рисунок 33. Влияние тромбина, бензоил-АТФ и ЛПС на активацию транскрипционного фактора NF-кВ в астроцитах крысы. А - отношение интенсивности бэндов активной фосфорилированной формы NF-кВ (фосфо рб5) к интенсивности общего NF-кВ (тотал рб5) 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 - 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.

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Ограничение доступа кислорода и питательных веществ к клеткам центральной нервной системы, развивающееся вследствие тромбоза сосудов, кровоизлияния, травмы, приводит к гибели нейронов, воспалению и повреждению Ишемическое повреждение многофакторный мозга. мозга \_ процесс, затрагивающий ЦНС, сопровождается все типы клеток вовлечением разнообразных молекул и систем клеточной сигнализации. В данной работе мы сфокусировались на астроглии и поставили целью исследовать влияние как непосредственно депривации кислорода и глюкозы на астроциты, так и роль ряда молекул и систем сигнализации, задействованных в ишемическом повреждении.

Для модулирования ишемии *in vitro* был использован метод депривации глюкозы и кислорода. Было обнаружено, что в острый период после ишемии в группах КД и КГД происходит гибель астроцитов. В отставленный период наблюдается, напротив, пролиферация клеток, что может свидетельствовать о астроглии. Реактивный реактивной активации астроглиоз, ЭВОЛЮЦИОННО консервативный механизм, при высокой степени выраженности может приводить к формированию глиального рубца, затрудняя регенерацию нейронов в области повреждения. Для реактивных астроцитов характерен ряд неспецифических признаков, среди которых усиление пролиферации, изменение морфологии и функционального состояния астроглии. Гибель астроцитов и нейронов при депривации глюкозы и кислорода описана в литературе [361, 362]. В исследовании Huang с соавт. высвобождение лактатдегидрогеназы, маркёра некроза, происходило уже через 1 час после начала ишемии и достигало пика через 2 часа, сохраняясь приблизительно на одном уровне вплоть до 6 часов от старта КГД [362]. При этом было показано, что гибель клеток осуществлялась как путём некроза, так и апоптоза и онкоза (ишемическая гибель клетки) [362, 363]. В исследовании Almeida с соавт., напротив, депривация кислорода и глюкозы в течение 1 часа не влияла на уровень некроза и апоптоза астроцитов крысы, в то время как нейроны подвергались гибели [364]. В исследовании Zhao с соавт.

пролиферация астроцитов наблюдалась уже через 6 часов от начала реперфузии после 4-часовой ишемии, достигала пика через 12 часов и сохранялась на повышенном уровне через 24 часа [365]. В исследовании Shi с соавт. пик пролиферации также приходился на 12 часов от начала реперфузии и снижался через 24 часа [366]. Отличия в результатах приведённых исследований с нашими результатами могут объясняться различиями протоколов КГД, применяемых научными группами. Интересным, на наш взгляд, является выявленное в данной работе различие влияния основных факторов ишемии. Продемонстрировано, что наиболее значимым повреждающим воздействием на астроциты является депривация кислорода, а не глюкозы. Такая особенность чувствительности астроцитов к ишемическому повреждению, вероятно, связана с особенностью метаболизма данного типа клеток мозга.

Ишемия, как травма и ряд других видов поражения мозга, неразрывно связана с активацией системы гемостаза, ключевым фактором которой является мультифункциональная тромбин. Тромбин. сериновая протеаза co специфическими функциями и системой рецепторов, обнаруживается В паренхиме головного мозга при воспалении. В зависимости от концентрации влияние тромбина на состояние клеток и ответ на повреждение в ЦНС может варьироваться. Тромбин в низких концентрациях (< 1-10 нМ) усиливает долговременную потенциацию нейронов и защищает нейроны от клеточной гибели [367]. Тромбин в высоких концентрациях (>100 нМ), которые обнаруживаются в местах повреждения и воспаления нервной ткани, напротив, индуцирует апоптоз нейронов и стимулирует воспаление [367]. Из литературы известно активирующее воздействие тромбина на астроглию. Мы решили исследовать и дополнить существующее представление о роли тромбина в влияние пролиферацию, морфологию, активации астроглии, оценив на провоспалительный профиль секреции клеток. Мы обнаружили, что тромбин, начиная с концентрации 10 нМ, активирует астроглию, влияя на ряд параметров (пролиферация, экспрессия S100B), однако наиболее комплексно и выражено влияние тромбина проявляется в концентрации 100 нМ и более. Тромбин 100 нМ
стимулирует пролиферацию астроцитов крысы и перестройку актинового цитоскелета, повышает экспрессию S100B, вызывает формирование пустых полей и инициирует секрецию медиаторов воспаления, среди которых NO и IL-6. Тромбин 100 нМ влияет на внутриклеточные пути апоптоза астроцитов, повышая проапоптотический индекс Bax/Bcl-2, И активирует провоспалительный транскрипционный фактор NF-кB, регулирующий транскрипцию iNOS и IL-6. Полученные результаты согласуются с данными из литературы и дополняют их. Пролиферация астроцитов под воздействием тромбина 100 нМ и пептидовагонистов PAR1 описана в литературе, как и сигнальные механизмы, её которых фосфорилирование ERK1/2, усиление обуславливающие, среди метаболизма глюкозы и стимуляция клеточного цикла [9, 131] [22]. В отличие от исследования Zhu с соавт., где пролиферация достигала пика уже при 5-10 нМ тромбина, в нашей работе астроциты оказались менее чувствительными и похожий уровень пролиферации достигался при концентрациях тромбина 50-100 нМ [22]. Нами было показано повышение индекса апоптоза Bax/Bcl-2 в астроцитах на фоне тромбина. Данный эффект тромбина может быть опосредован АФК, продукция которых под воздействием протеазы обнаружена для астроцитов и тромбоцитов [368] [22, 138, 369]. Формирование пустых полей под воздействием тромбина 100 нМ описано в литературе для смешанной культуры гиппокампальных нейронов и астроцитов [328]. Мы показали, что культура астроцитов может формировать подобные участки под влиянием тромбина 100-1000 нМ без участия нейронов, что указывает на морфологические изменения астроцитов. Изменение морфологии, связанное с формированием стресс-фибрилл и повышением экспрессии S100B в астроцитах, под воздействием тромбина 10 нМ было продемонстрировано в исследовании Shirakawa с соавт. [336]. При анализе результатов перестройки актинового цитоскелета астроцитов мы, в отличие от работы Shirakawa, использовали специфичный для F-актина маркер фаллоидин, что позволило нам выявить, что изменение цитоскелета на фоне обработки тромбином 100 нМ и выше связано с образованием фибрилл именно данного типа актина. Экспрессия белка S100B в наших экспериментах, как и в

109

исследовании Shirakawa с соавт., возрастала под воздействием тромбина в концентрации 10 нМ и продолжала увеличиваться с повышением концентрации тромбина [336]. В работе Meli с соавт. тромбин 10-100 нМ, как и синтетический пептид-агонист PAR1, усиливали накопление нитритов в среде клеточной линии глиомы C6, стимулированной IFN-γ и TNF-α [370]. Мы показали накопление нитритов на фоне тромбина 100 нМ в среде первичных нативных астроцитов крысы. Данные литературы о секреции астроцитами провоспалительных факторов и цитокинов на фоне тромбина являются противоречивыми. Астроциты человека активируются тромбином, но не продуцируют IL-6 и IL-1b [139] [125]. В исследовании Wang с соавт. тромбин 10 нМ и 100 нМ стимулировал накопление мРНК IL-6, а также мРНК TNF-α и IL-1b в астроцитах крысы [371]. Подобное накопление мРНК наблюдалось и при стимуляции пептидом-агонистом рецептора PAR1 (но не в случае IL-6) [371]. Тем не менее, измерение содержания белков IL-6, TNF-α, IL-1b в среде через 2-24 часа после начала стимуляции тромбином показало отсутствие секреции цитокинов [371]. Согласно другому исследованию воздействие тромбина 135 нМ на астроциты мыши вызывало выраженное высвобождение IL-6 клетками и весьма слабую секрецию TNF-α, но не влияло на выделение IL-1b [130]. В нашем исследовании тромбин 100 нМ стимулировал секрецию IL-6, что согласуется с наблюдениями Radulovic с соавт., но, как и в работе Wang с соавт., не приводил к высвобождению TNF-α астроцитами крысы. Тем не менее, мы не проводили анализ накопления мРНК TNF-α, поэтому возможно экспрессия гена происходила, но, как и в работе Wang с соавт., без наработки белкового продукта, либо его высвобождения. Активация NF-<sub>K</sub>B канонического ПУТИ лежит В основе индукции экспрессии провоспалительных цитокинов [359] [372]. В исследовании Dusaban с соавт. тромбин уже в концентрации 5 нМ вызывал транслокацию р65 в ядро в астроцитах мыши [350]. В рамках нашей работы мы показали увеличение доли фосфорилированного р65 в астроцитах крысы под воздействием тромбина 100 нМ, что свидетельствует об активации пути NF-кВ и может являться механизмом повышения синтеза IL-6 в астроцитах, обработанных тромбином.

В результате ишемии нервной ткани происходит высвобождение в интерстиций больших количеств АТФ [154] [23] [155] [24]. Выделение АТФ может осуществляться пассивным образом за счёт гибели клеток, так и по активным механизмам [159] [160] [161]. Рецепторы пуринергической системы, обеспечивающие сигнальную функцию АТФ, экспрессируются в нейронах и глиальных клетках мозга [145]. АТФ в высоких концентрациях выступает в качестве значимого универсального образа опасности (DAMP), запуская процессы воспаления [149] [26]. Рецептор Р2Х7, имеющий высокий порог активации, играет ключевую роль в обеспечении патологических эффектов АТФ, являясь важным драйвером воспаления в ЦНС [25]. Мы исследовали эффекты патологической активации пуринергической сигнализации в астроцитах крысы. 2',3'-О-(бензоил-4-бензоил)-АТР в качестве стабильного Мы использовали аналога АТФ и одновременно активного агониста рецептора Р2Х7 для моделирования ситуации с высвобождением высоких доз АТФ в ЦНС. Применение АТФ в исследовании было найдено нежелательным в виду низкой стабильности и распада до производных, также обладающих собственными сигнальными функциями. Как и в случае с исследованием эффектов тромбина, мы охарактеризовали влияние бензоил-АТФ на ряд параметров астроцитов крысы, среди которых выживаемость, синтез оксида азота, секреция цитокинов и т.д., однако в большей степени сосредоточившись на расшифровке рецепторных механизмов наблюдаемых эффектов. Было обнаружено, что бензоил-АТФ в концентрациях 300 мкМ и 500 мкМ вызывает гибель астроцитов кортекса крысы. Снижение выживаемости астроцитов было наиболее выражено на фоне обработки клеток бензоил-АТФ 500 мкМ. Применение неселективного ингибитора рецепторов P2, PPADS, отменяло бензоил-АТФ-опосредованную гибель клеток, что указывает на специфичность эффекта и вовлечение пуринергической сигнализации. Использование ингибиторов Р2Х7 доказало участие данного типа рецепторов в гибели астроцитов под воздействием бензоил-АТФ. Снижение выживаемости астроцитов при стимуляции Р2Х7 описано в литературе. В исследовании Salas с соавт. бензоил-АТФ в концентрации 500 мкМ вызывал

111

похожий процент гибели астроцитов мозжечка мыши, причём было показано, что гибель не связана с ионами кальция и активацией каспазы 3 и вероятно имеет некротическую природу [342]. Мы исследовали участие апоптоза в наблюдаемом снижении выживаемости астроцитов кортекса крысы и не обнаружили изменений в содержании белков апоптоза Bax/Bcl-2 в клетках, получавших безоил-АТФ, и, как и в работе Salas с соавт., предполагаем, что гибель астроцитов кортекса крысы вероятно обусловлена некрозом [342]. В других типах клеток, например в миоцитах и нейронах, активация P2X7 приводит к гибели клеток либо через активацию каспаз, либо по механизму аутофагии [373-375]. Итак, механизм/тип P2X7-опосредованной гибели клеток определяется типом клеток.

Мы исследовали провоспалительный профиль секреции кортикальных астроцитов крысы под воздействием бензоил-АТФ. Было обнаружено, что бензоил-АТФ в концентрациях ≥ 300 мкМ вызывает повышение секреции оксида азота. При этом, уровни секреции NO через 12 часов и 24 часа после воздействия бензоил-АТФ значимо не различались. Использование неселективного антагониста P2, PPADS, отменяло бензоил-АТФ-стимулированную секрецию NO, что, как и в случае с выживаемостью, указывает на участие пуринергических данном процессе. Применение специфических рецепторов 2-ого типа в ингибиторов Р2Х7, тем не менее, оказалось не только не эффективным в наоборот подавлении синтеза оксида но В некоторых случаях азота. потенциировало синтез NO в группах, получавших бензоил-АТФ и ингибитор одновременно. Важно отметить, что сами по себе ингибиторы ни в одной из использованных концентраций не влияли ни на выживаемость, ни на синтез оксида азота астроцитами. Поскольку бензоил-АТФ является активным, но не строго селективным агонистом Р2Х7, наиболее вероятным объяснением этого явления может быть участие других типов пуринергических рецепторов 2-ого типа в реализации синтеза NO кортикальными астроцитами крысы [237] [186]. При блокаде P2X7 большее количество агониста бензоил-АТФ, не задействованного в активации Р2Х7, способно активировать большее количество пуринергических рецепторов, опосредующих синтез NO, что может служить

112

NO возможным объяснением потенциации синтеза стимулированными астроцитами на фоне ингибиторов Р2Х7. Мы не обнаружили в литературе сведений о подобных эффектах. Существует ряд работ, свидетельствующих об усилении продукции NO астроцитами под воздействием АТФ/бензоил-АТФ, однако клетки В данных исследованиях были предварительно стимулированы/праймированы цитокинами IL-1β, IFN- γ, эндотоксином ЛПС, либо комбинациями этих веществ. Так, в исследовании Narcisse с соавт., выполненном на фетальных астроцитах человека, добавление бензоил-АТФ в различных дозах к предварительно активированным IL-1β клеткам усиливало синтез NO [29]. В исследовании Liu с соавт. неселективная блокада рецепторов P2 несколькими видами ингибиторов значительно снижала продукцию NO фетальными астроцитами человека, стимулированными IL-1β [258]. Следует отметить, что фетальные человеческие астроциты имеют свои особенности, в частности низкую экспрессию рецепторов Р2Х7 на клетках и слабый кальциевый ответ при стимуляции бензоил-АТФ [29] [345]. В более актуальной работе Murakami с соавт., выполненной на эмбриональных астроцитах крысы, добавление к праймированным ЛПС астроцитам АТФ в различных дозах 0.15 - 5 мМ усиливало синтез NO астроглией в несколько раз [32]. Применение различных агонистов рецепторов Р2, в том числе и бензоил-АТФ (≥ 100 мкМ), вызывало похожее усиление продукции NO, что может указывать как на вовлечение P2X7, так и других рецепторов P2X и P2Y в синтез NO [32].

литературе встречаются свидетельства Одновременно с этим в 0 противовоспалительном влиянии АТФ на астроциты. Так, в работе Adzic с соавт. добавление к астроцитам, которые были предварительно праймированы ЛПС/ ЛПС + IFN-у, АТФ в широком диапазоне концентраций (5 мкМ-1 мМ) не приводило к образованию активных форм кислорода и азота, но наоборот И стимулировало активность супероксиддисмутаз увеличивало уровень глутатиона [260]. Таким образом, обнаруженная в нашей работе продукция NO нативными астроцитами крысы под воздействием бензоил-АТФ и вовлечение в этот процесс рецепторов, отличных от Р2Х7, является новой информацией и

детализирует существующие знания о свойствах пуринергической активации астроглии. В связи с этим мы дополнительно исследовали возможные механизмы синтеза NO, которые могли быть задействованы в данном случае. Применение неселективного ингибитора NO-синтаз, L-NAME, показало вовлечение NO-синтаз в продукцию оксида азота астроцитами. Анализ методом количественной ПЦР показал индукцию экспрессии iNOS через 6 часов после стимуляции бензоил-АТФ. Обработка астроцитов бензоил-АТФ в сочетании с ингибиторами Р2Х7 усиливала экспрессию iNOS клетками. Экспрессия iNOS достигала пика через 12 стимуляции. Вовлечение индуцибельной NO-синтазы, часов OT начала обнаруженное в ходе работы, подтверждает результаты, полученные при измерении уровня нитритов, и дополняет их. Усиление NO синтеза стимулированными астроцитами на фоне блокады Р2Х7 следует принимать во внимание при разработках и испытаниях ингибиторов Р2Х7 в терапевтических целях.

Похожие эффекты бензоил-АТФ мы получили в отношении уровня провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-а. Стимуляция астроцитов бензоил-АТФ в концентрации 500 мкМ вызывала значительное высвобождение IL-6 и TNF-α из клеток в культуральную среду через 6 часов после добавления вещества. Использование ингибитора Р2Х7 не влияло на уровень провоспалительной секреции цитокинов, что, как и в случае с оксидом азота, указывает на вовлечение пуринергических рецепторов в обеспечение других типов наблюдаемых эффектов. Высвобождение IL-6 под воздействием АТФ/бензоил-АТФ ИЗ астроцитов было показано раннее в литературе. В работе Lu с соавт., выполненной на сетчатке глаза, было показано, что увеличение внутриглазного давления in vivo и растяжение астроцитов верхушки зрительного нерва in vitro приводит к увеличению экспрессии и секреции IL-6 астроцитами и увеличению экспрессии гена ENTPD1, кодирующего эктоАДФазу NTPDase1, маркёра повышенного уровня АТФ во внеклеточном пространстве [253]. Эффект в отношении IL-6 был нивелирован как добавлением к культуре астроцитов антагонистов P2X7, BBG и A839977, так и при внутриглазном введении BBG.

Отсутствие увеличения IL-6 было установлено и при использовании в экспериментах астроцитов мышей-нокаутов по гену P2X7 (Pfizer) [253]. Внутриглазное введение агониста Р2Х7, бензоил-АТФ, и добавление его (250 мкМ) к культуре астроцитов верхушки зрительного нерва само по себе стимулировало увеличение экспрессии и секреции IL-6 по сравнению с контролем [253]. В исследовании Munoz с соавт. активация рецепторов P2X7 в астроцитах спинного мозга стимулировала продукцию АФК, способствуя возникновению окислительного стресса, и было показано, что частично данный эффект опосредуется оксидазой NADPH [255]. Обработка клеток АТФ 1 мМ, либо бензоил-АТФ 300 мкМ значительно стимулировала секрецию астроцитами IL-6, которая была полностью блокирована антагонистом Р2Х7, А438079 (10 мкМ). Использование различных ингибиторов АФК, а также ингибитора NADPH оксидазы, апоницина, сопровождалось снижением высвобождения IL-6, из чего был сделан вывод о по крайней мере частичной зависимости секреции IL-6 астроцитами от активности NADPH-оксидазы [255]. Таким образом, результаты обеих подробно рассмотренных здесь работ в сумме свидетельствуют о вкладе Р2Х7 в реализацию повышения уровня IL-6 астроцитами. В нашем исследовании использование ингибитора А438079 (10 мкМ), специфического антагониста Р2Х7, секрецию IL-6 не влияло на кортикальными астроцитами крысы, стимулированными бензоил-АТФ 500 мкМ, но блокировало гибель клеток. Возможным объяснением отсутствия согласованности наших результатов с результатами работ групп исследователей Lu и Munoz может служить различие свойств структур мозга, из которых были выделены астроциты. Данные работы были выполнены на астроцитах верхушки зрительного нерва, либо астроцитах спинного мозга, в то время как наша работа проводилась на астроцитах кортекса крысы. В пользу приведённого объяснения косвенно свидетельствует наблюдение Bianco с соавт. о различиях свойств P2X7 в астроцитах, выделенных из гиппокампа и из кортекса крысы, в обеспечении секреции цитокина IL-1β [30]. Было показано, что активация Р2Х7 в астроцитах гиппокампа сопровождается повышением экспрессии, но не секреции IL-1β, в то время как активация P2X7 в

астроцитах кортекса крысы приводит к значительному высвобождению IL-1β клетками [30].

Бензоил-АТФ-опосредованное усиление секреции TNF-а астроцитами, обнаруженное в нашем исследовании, согласуется с работой Хіа с соавт., где было показано усиление экспрессии TNF-α под воздействием ATΦ (0.01-10 мM) в астроцитах спинного мозга [254]. В исследовании Kucher с соавт. добавление АТФ 1 мМ, либо бензоил-АТФ (0.1-1 мМ) к астроцитам кортекса, предварительно ЛПС, способствовало ЛПСпраймированных напротив, снижению стимулированной продукции TNF-α астроглией, в то время как ATΦ в низких концентрациях (10-100 мкмоль) усиливал секрецию TNF-а [259]. Исследование активации канонического пути NF-кB, как возможного внутриклеточного механизма усиления синтеза провоспалительных цитокинов, показало увеличение фосфорилированного р65 в кортикальных астроцитах крысы доли под воздействием бензоил-АТФ 500 мкМ. Для группы, получавшей ингибитор Р2Х7 и бензоил-АТФ, была выявлена тенденция к повышению доли активного р65 в клетках относительно значений в контроле.

Развитие эндотоксинемии вследствие нарушения ГЭБ, травмы мозга является осложнением, с которым могут столкнуться пациенты, перенесшие ишемию [349]. Было обнаружено, что обработка астроцитов кортекса крысы ЛПС, компонентом бактериальной стенки, вызывала пролиферацию клеток, продукцию NO и IL-6. Стимулирующий эффект ЛПС на пролиферацию астроцитов и синтез провоспалительных факторов описан в литературе, зависит от применяемой дозы эндотоксина и характеристик культуры клеток, таких как чистота культуры и вид животного. В исследовании Каtо с соавт. обработка фетальных астроцитов человека ЛПС 1 мкг/мл приводила к повышению пролиферации клеток [376]. Стимуляция пролиферации может быть опосредована простагландином Е, синтезируемым под воздействием ЛПС как астроцитами, так и микроглией [377] [378]. В нашей работе достоверное повышение пролиферации астроцитов наблюдалось при минимальной применяемой дозе ЛПС 10 нг/мл и существенно не изменялось при повышении дозы ЛПС. Запуск экспрессии индуцибельной

обработанных ЛПС 100 NO-синтазы В астроцитах крысы, нг/мл. продемонстрирован в работах Chistyakov с соавт. [322, 379]. Мы не исследовали содержание мРНК iNOS в клетках, но оценивали содержание нитритов в культуральной среде, что может служить функциональной оценкой активности фермента. Как и в работе группы Chistyakov, где астроциты крысы были толерантны к дозе ЛПС 10 нг/мл, но реагировали запуском экспрессии iNOS на фоне стимуляции ЛПС 100 нг/мл, мы наблюдали статистически значимое повышение уровня нитритов в среде при концентрациях ЛПС 100 нг/мл и выше [322]. Астроциты человека, напротив, не реагируют на стимуляцию ЛПС повышением экспрессии iNOS [345]. В исследовании Köller с соавт. астроциты продуцировали IL-6 под воздействием ЛПС в дозе 5 мкг/мл [380]. Для исследования секреции IL-6 мы использовали ЛПС в единственной концентрации 1 мкг/мл и показали высокий уровень секреции IL-6 клетками через 6 часов от воспаление начала стимуляции. Среди всех стимулирующих вешеств. использованных в нашей работе, таких как бензоил-АТФ 500 мкМ и тромбин 100 нМ, обработка липополисахаридом оказалась наиболее эффективной, вызывая максимальный ответ астроцитов по изучаемым параметрам. Отсутствие секреции TNF-α астроцитами крысы на фоне ЛПС 1 мкг/мл, выявленное в ходе нашей работы, явилось неожиданным. Повышение экспрессии и секреции TNF-а астроцитами при воздействии эндотоксина описано в литературе [319, 381]. Секреция астроцитами провоспалительных факторов IL-6 и NO под воздействием ЛПС и одновременное отсутствие секреции TNF-а позволила исключить вероятность какой-либо ошибки в ходе исследования, поскольку астроциты явно активировались. Мы полагаем, что наблюдаемое отсутствие секреции TNF-а может быть предметом дальнейшего изучения и исследований, например, на уровне мРНК методом количественной ПЦР.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Астроциты, как наиболее многочисленный тип клеток в мозге, могут представлять особый интерес качестве мишени для фармакотерапии В разнообразных нейропатологий. Воспаление, сопряженное как С нейродегенерацией, так и с ишемическим или травматическим повреждениями мозга, развивается в мозговой ткани с отсроченной активацией как истинных иммунных клеток – микроглии, так и иммунокомпетентных – астроцитов. Характер активации клеток может определяться комплексом повреждающих факторов. В настоящее время не ясны особенности активации астроцитов в ответ на воздействие разнообразных факторов воспаления. В данной работе проведен анализ влияния широкого спектра провоспалительных повреждающих факторов на морфофункциональное состояние культивируемых астроцитов крысы. Сумма полученных эффектов представлена в виде схемы (Рисунок 34).

В качестве модели ишемии *in vitro* был использован подход депривации кислорода и глюкозы (КГД). Мы обнаружили, что КГД вызывает гибель астроцитов крысы на коротком промежутке времени и последующее за этим усиление пролиферации. Воздействие КГД было ассоциировано с изменением морфологии астроглии, что совместно с усилением пролиферации свидетельствуют об активирующем влиянии КГД на астроциты кортекса крысы.

Гибель клеток в острый период ишемии сопровождается быстрым высвобождением во внеклеточное пространство больших количеств АТФ. Мы использовали бензоил-АТФ, стабильный аналог АТФ и активный агонист рецептора Р2Х7, для исследования эффектов АТФ в отношении астроцитов крысы. Мы показали, что бензоил-АТФ вызывает Р2Х7-опосредованную апоптознезависимую гибель астроцитов кортекса крысы и Р2Х7-независимую секрецию клетками провоспалительных факторов NO, IL-6, TNF-α. Синтез NO, запускаемый бензоил-АТФ, происходит с вовлечением индуцибельной NO-синтазы в клетках. Таким образом, АТФ, высвобождающийся из погибших в результате ограничения доступа кислорода и глюкозы клеток, стимулирует

дальнейшую гибель астроцитов в области ишемии и развитие процессов воспаления.

Тромбин, ключевая сериновая протеаза гемостаза, присутствует в области воспаления головного мозга в результате активации каскада свёртывания, проникновения через повреждённый ГЭБ и локального синтеза. Мы обнаружили, что тромбин вызывает пролиферацию астроцитов и изменение морфологии через увеличение экспрессии белка S100B в клетках и перестройку актинового цитоскелета, ведущую к появлению пустых полей в культуре. Тромбин, как и бензоил-АТФ, стимулировал локальное воспаление за счёт индукции секреции NO, IL-6 и активации транскрипционного фактора NF-кB, но в отличии от бензоил-АТФ тромбин не влиял на секрецию TNF-α.

Липополисахарид, компонент бактериальной стенки, может обнаруживаться в паренхиме головного мозга при ишемии, связанной с травмой и при повреждении ГЭБ. В нашем исследовании эффекты ЛПС в отношении астроцитов крысы оказались сходны с эффектами тромбина. ЛПС стимулирует пролиферацию астроцитов крысы и секрецию провоспалительных факторов NO, IL-6, но, как и тромбин, не влияет на уровень секреции TNF-α. Оба фактора, ЛПС и тромбин, участвуют в регуляции апоптоза астроцитов крысы.

Таким образом, ишемию можно рассматривать как системный фактор, чьи провоспалительные эффекты при воздействии на астроциты могут быть опосредованы комплексом воздействий изолированных провоспалительных факторов в области повреждения. АТФ вызывает гибель астроцитов, в то время как тромбин и ЛПС индуцируют пролиферацию. Все три фактора в той или иной степени вызывают провоспалительную секрецию астроцитами кортекса крысы, что инициирует/усиливает воспаление в области ишемического повреждения мозга.

119



Рисунок 34. 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.

 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 пуринергических рецепторов 2-ого типа, отличных от P2X7.

6) Вызванное тромбином И липополисахаридом повышение индекса астроцитах апоптотического В указывает на участие этих факторов регуляции провоспалительных В апоптоза В культивируемых астроцитах.

7) Тромбин и бензоил-АТФ вызывают активацию транскрипционного фактора NF-кВ 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 СОКРАЩЕНИЙ

123

- 2-MeSATP 2-метилтио АТФ
- АДФ аденозиндифосфат
- АМФ аденозинмонофосфат
- АТФ аденозинтрифосфат
- АФК активные формы кислорода
- БАС боковой амиотрофический склероз
- Бензоил-АТФ (бзАТФ) 2,3'- О-(бензоил-4-бензоил)- аденозинтрифосфат
- ВКП внеклеточное пространство
- ГАМК гамма-аминомасляная кислота
- ГД депривация глюкозы
- ГТФ-аза гидролаза, расщепляющая гуанозинтрифосфат
- ГЭБ гематоэнцефалический барьер
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДНКаза фермент, расщепляющий ДНК
- ИФА иммуноферментный анализ
- КГД депривация кислорода и глюкозы
- КД депривация кислорода
- кДНК кодирующая ДНК
- ЛПС липополисахарид
- мРНК матричная рибонуклеиновая кислота
- МС множественный склероз
- о<br/>АТ $\Phi$  окисленный АТ $\Phi$
- ОСМА окклюзия средней мозговой артерии
- ПЦР полимеразно-цепная реакция
- РНК рибонуклеиновая кислота
- ТМ трансмембранный участок
- ТМБ тетраметилбензидин
- ТМП трансмембранное пространство
- УДФ уридиндифосфат

УТФ - уридинтрифосфат

- цАМ $\Phi$  циклический АМ $\Phi$
- ЦНС центральная нервная система
- ЭДТА этилендиаминтетрауксусная кислота
- ALDH1L1 альдегиддегидрогеназа 1 член семейства L1
- АР-1 активирующий белок 1

AQP4 – аквапорин 4

- ВВG бриллиантовый синий G
- BDNF нейротрофический фактор мозга

bFGF - основной фактор роста фибробластов

- BSA бычий сывороточный альбумин
- CCL С-С мотив хемокин лиганд (от С-С Motif Chemokine Ligand)
- CNTF цилиарный нейротрофический фактор
- СОХ-2 циклооксигеназа 2

Сх - коннексин

- CXCL C-X-C мотив хемокин лиганд (от C-X-C motif chemokine ligand)
- DAMP универсальный образ опасности
- DMEM/F12 модифицированная Дульбекко среда Игла с добавкой F12
- DMSO диметилсульфоксид
- DTT дитиотреитол, сильный восстанавливающий агент

EAAT-1 – транспортер 1 возбуждающей аминокислоты (от excitatory amino acid transporter 1)

- ЕЕТ эпоксиэйкозатриеновые кислоты (от epoxyeicosatrienoic)
- EGF эпидермальный фактор роста
- eNOS эндотелиальная NO-синтаза
- EPCR эндотелиальный рецептор протесина С (от endothelial protein C receptor)
- ЕРО эритропоэтин
- ERK МАР-киназы (от extracellular signal-regulated kinases)
- ESF Европейский научный фонд
- FGF фактор роста фибробластов

G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (от granulocyte colonystimulating factor)

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (от glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

GAT3 – транспортер 3-его типа гамма-аминомасляной кислоты (от GABA transporter type 3)

GDNF - глиальный нейротрофический фактор

GFAP - глиальный фибриллярный кислый белок

GLAST – транспортер глутамата/аспартата (от glutamate/aspartate transporter)

GLT-1 – транспортер 1 глутамата (от glutamate transporter 1)

GLUT1 – транспортер 1 глюкозы (от glucose transporter 1)

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (от granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

GRO-a (CXCL1) -or growth-regulated alpha Protein C-X-C motif chemokine 1

GRO/CINC-1 -or growth-regulated gene product/cytokine-induced neutrophil

chemoattractant

HBSS – сбалансированный солевой раствор Хэнкса

HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

НІ FBS – бычья эмбриональная сыворотка, инактивированная нагревом

НІГ-1α –фактор 1α, индуцируемый гипоксией

HMGB1 - белок группы высокой мобильности 1

HPLC - высокоэффективная жидкостная хроматография

HRP – пероксидаза хрена

HSP - белок теплового шока

IFN1 – интерферон 1-ого типа

IGF - инсулиновый фактор роста

IL-1β - интерлейкин 1β

IL-6 – интерлейкин 6

IL-8 – интерлейкин 8

INF- $\gamma$  - интерферон  $\gamma$ 

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

IP3 - инозитол-трифосфат

IRAK – интерлейкин-1 рецептор-ассоциированная киназа (от interleukin-1 receptor-associated kinase)

IRF - регуляторный фактор интерферона

ЈАК – Янус-киназа

JNK - с-Jun N-терминальные киназы (от с-Jun N-terminal kinases)

LIF - фактор ингибирования лейкемии

LRR - обогащённый лейцином повтор

MAL – белок, ассоциированный с созреванием Т-лифоцитов (от T-lymphocyte maturation associated protein)

MAPK – митоген-активируемая киназа (mitogen-activated protein kinases)

МСТ - монокарбоксилатный траспортер

MD2 - белок 2 миелоидной дифференцировки

mGluR – метаботропный рецептор глутамата

MIF – фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (от macrophage migration

inhibitory factor)

ММР-9 – металлопротеаза-9

mTOR – мишень рапамицина млекопитающих (от mammalian target of rapamycin)

МТТ - (3-(4,5-диметилтиазол-2-)ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид

MyD88 - белок 88 первичного ответа миелоидной дифферецировки

NADPH - восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

NF-кВ – ядерный фактор каппа В

NGF - фактор роста нервов

NLRP3 - NOD-, LRR и пирин-содержащий белок 3

NMDA – N-метил-D-аспартат (N-methyl-D-aspartate)

nNOS - нейрональная NO-синтаза

NO – оксид азота

NT-3 - нейротрофин 3

NTPDase1 – экто-нуклеозидтрифосфат дифосфогидролаза 1 (от ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1)

Р1 – пуринергический рецептор 1-ого типа, рецептор аденозина

- Р2 пуринергический рецептор 2-ого типа
- P2R пуринергический рецептор 2-ого типа
- Р2Х пуринергический рецептор 2-ого типа Х
- Р2Ү пуринергический рецептор 2-ого типа Ү
- р44/42 белок 44/42, МАР-киназа, ERK1/2
- РАМР молекулярный паттерн (образ) патогенов
- Panx1 паннексин 1
- РАR рецептор, активируемый протеазами
- PBS фосфатно-солевой буфер
- PDGF тромбоцитарный ростовой фактор
- PGE2 простагландин E2
- РІЗК фосфоинозитид-З-киназа
- РКС протеинкиназа С
- РLС фосфолипаза С
- PPADS пиродаксальфосфат-6-азофенил-2, 4-дисульфоновая кислота
- PRR рецептор распознавания образов (pattern receptor recognition)
- PVDF поливинилиденфторид
- RSV респираторный синцитиальный вирус
- S100B S100 кальций-связывающий белок В
- Serpin E1 серпин E1
- SOD2 супероксиддисмутаза 2
- STAT преобразователи сигнала и активаторы транскрипции (от signal
- transducers and activators of transcription)
- ТАЕ трис-ацетатный буфер
- TAFI тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза
- ТАК1 киназа 1, активируемая TGF- $\beta$  (от Transforming Growth Factor-Beta-
- Activated Kinase 1)

TGF - трасформирующий фактор роста

TICAM2 – молекула-адаптор 2 Toll-подобного рецептора (от Toll Like Receptor

Adaptor Molecule 2)

TIR - Toll/IL-1 рецептор

TLR4 – толл-подобный рецептор 4-ого типа

 $TNF\mathchar`- \varphi a$ ктор некроза опухоли а

TNP-ATP - 2', 3'-О-(2,4,6-тринитрофенил) аденозин 5'-трифосфат

TRAF6 - TNF-рецептор-ассоциированный фактор 6

TRIF - TIR домен-содержащий адаптор-индуцируемый IFN $\beta$ 

VEGF - фактор роста эндотелия сосудов

WST-1 - (4-[3-(4-йодофенил)-2-(4-нитрофенил)-2H-5-тетразолио]-1,3-

бензилдисульфонат

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Donkor, E. S. Stroke in the 21(st) Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life / E. S. Donkor // Stroke Res Treat. – 2018. – Vol. 2018 -. – P. 3238165.

2. Kawabori, M. Inflammatory responses in brain ischemia / M. Kawabori, M. A. Yenari // Curr Med Chem. – 2015. – Vol. 22 - № 10. – P. 1258-1277.

3. Jover-Mengual, T. The Role of NF-κB Triggered Inflammation in Cerebral Ischemia / T. Jover-Mengual, J. Y. Hwang, H. R. Byun, B. L. Court-Vazquez, J. M. Centeno, M. C. Burguete, R. S. Zukin // Front Cell Neurosci. – 2021. – Vol. 15 -. – P. 633610.

4. Verkhratsky, A. Physiology of Astroglia / A. Verkhratsky, M. Nedergaard // Physiol Rev. – 2018. – Vol. 98 - № 1. – P. 239-389.

5. Sofroniew, M. V. Astrogliosis / M. V. Sofroniew // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2014. – Vol. 7 - № 2. – P. a020420.

6. Pekny, M. Astrocytes: a central element in neurological diseases / M. Pekny, M. Pekna, A. Messing, C. Steinhäuser, J. M. Lee, V. Parpura, E. M. Hol, M. V. Sofroniew, A. Verkhratsky // Acta Neuropathol. – 2016. – Vol. 131 - № 3. – P. 323-345.

7. Burda, J. E. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease / J. E. Burda, M. V. Sofroniew // Neuron. – 2014. – Vol. 81 - № 2. – P. 229-248.

8. Adams, K. L. The diversity and disparity of the glial scar / K. L. Adams, V. Gallo // Nat Neurosci. – 2018. – Vol. 21 - № 1. – P. 9-15.

 9. Nicole, O. Activation of protease-activated receptor-1 triggers astrogliosis after brain injury / O. Nicole, A. Goldshmidt, C. E. Hamill, S. D. Sorensen, A. Sastre, P. Lyuboslavsky, J. R. Hepler, R. J. McKeon, S. F. Traynelis // J Neurosci. – 2005. – Vol. 25 - № 17. – P. 4319-4329.

10. Sokolova, E. Prothrombin/thrombin and the thrombin receptors PAR-1 and PAR-4 in the brain: localization, expression and participation in neurodegenerative diseases /
E. Sokolova, G. Reiser // Thromb Haemost. – 2008. – Vol. 100 - № 4. – P. 576-581.

11. Rajput, P. S. Neuron-generated thrombin induces a protective astrocyte response via protease activated receptors / P. S. Rajput, J. Lamb, S. Kothari, B. Pereira, D.

Soetkamp, Y. Wang, J. Tang, J. E. Van Eyk, E. S. Mullins, P. D. Lyden // Glia. – 2020. – Vol. 68 - № 2. – P. 246-262.

12. Striggow, F. The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations / F. Striggow, M. Riek, J. Breder, P. Henrich-Noack, K. G. Reymann, G. Reiser // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2000. – Vol. 97 -  $N_{2}$  5. – P. 2264-2269.

13. Striggow, F. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia / F. Striggow, M. Riek-Burchardt, A. Kiesel, W. Schmidt, P. Henrich-Noack, J. Breder, M. Krug, K. G. Reymann, G. Reiser // Eur J Neurosci. – 2001. – Vol. 14 - № 4. – P. 595-608.

14. Wang, H. Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling / H. Wang, J. J. Ubl, G. Reiser // Glia. – 2002. – Vol. 37 -  $N_{2}$  1. – P. 53-63.

15. Wang, J. Role of protease-activated receptor-1 in brain injury after experimental global cerebral ischemia / J. Wang, H. Jin, Y. Hua, R. F. Keep, G. Xi // Stroke. – 2012.
– Vol. 43 - № 9. – P. 2476-2482.

16. Chen, B. Thrombin mediates severe neurovascular injury during ischemia / B. Chen, Q. Cheng, K. Yang, P. D. Lyden // Stroke. – 2010. – Vol. 41 - № 10. – P. 2348-2352.

17. Chen, B. Thrombin activity associated with neuronal damage during acute focal ischemia / B. Chen, B. Friedman, M. A. Whitney, J. A. Winkle, I. F. Lei, E. S. Olson, Q. Cheng, B. Pereira, L. Zhao, R. Y. Tsien, P. D. Lyden // J Neurosci. – 2012. – Vol. 32 - № 22. – P. 7622-7631.

18. Möller, T. Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia / T. Möller,
U. K. Hanisch, B. R. Ransom // J Neurochem. – 2000. – Vol. 75 - № 4. – P. 1539-1547.

19. Suo, Z. Participation of protease-activated receptor-1 in thrombin-induced microglial activation / Z. Suo, M. Wu, S. Ameenuddin, H. E. Anderson, J. E. Zoloty, B. A. Citron, P. Andrade-Gordon, B. W. Festoff // J Neurochem. – 2002. – Vol. 80 - № 4. – P. 655-666.

20. Han, C. Tripartite motif containing protein 37 involves in thrombin stimulated BV-2 microglial cell apoptosis and interleukin 1β release / C. Han, X. Xia, S. Jiao, G. Li, Q. Ran, S. Yao // Biochem Biophys Res Commun. – 2019. – Vol. 516 - № 4. – P. 1252-1257.

21. Krenzlin, H. The Importance of Thrombin in Cerebral Injury and Disease / H. Krenzlin, V. Lorenz, S. Danckwardt, O. Kempski, B. Alessandri // Int J Mol Sci. – 2016. – Vol. 17 - № 1.

22. Zhu, Z. Signaling mechanism of protease activated receptor 1-induced proliferation of astrocytes: stabilization of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  triggers glucose metabolism and accumulation of cyclin D1 / Z. Zhu, G. Reiser // Neurochem Int. – 2014. – Vol. 79 -. – P. 20-32.

23. Melani, A. ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia / A. Melani, D. Turchi, M. G. Vannucchi, S. Cipriani, M. Gianfriddo, F. Pedata // Neurochem Int. – 2005. – Vol. 47 -  $N_{2}$  6. – P. 442-448.

24. Dale, N. Release of adenosine and ATP during ischemia and epilepsy / N. Dale,
B. G. Frenguelli // Curr Neuropharmacol. – 2009. – Vol. 7 - № 3. – P. 160-179.

25. Rodrigues, R. J. ATP as a multi-target danger signal in the brain / R. J. Rodrigues, A. R. Tome, R. A. Cunha // Front Neurosci. – 2015. – Vol. 9 -. – P. 148.

26. Di Virgilio, F. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation / F. Di Virgilio,
A. C. Sarti, R. Coutinho-Silva // Am J Physiol Cell Physiol. – 2020. – Vol. 318 - № 5. –
P. C832-c835.

27. Fischer, W. Increase of intracellular Ca2+ by P2X and P2Y receptor-subtypes in cultured cortical astroglia of the rat / W. Fischer, K. Appelt, M. Grohmann, H. Franke, W. Norenberg, P. Illes // Neuroscience. – 2009. – Vol. 160 -  $N_{2}$  4. – P. 767-783.

28. Del Puerto, A. Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease / A. Del Puerto, F. Wandosell, J. J. Garrido // Front Cell Neurosci. – 2013. – Vol. 7 -. – P. 197.

29. Narcisse, L. The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes / L. Narcisse, E. Scemes, Y. Zhao, S. C. Lee, C. F. Brosnan // Glia. – 2005. – Vol. 49 -  $N_{2}$  2. – P. 245-258.

30. Bianco, F. Different properties of P2X(7) receptor in hippocampal and cortical astrocytes / F. Bianco, A. Colombo, L. Saglietti, D. Lecca, M. P. Abbracchio, M. Matteoli, C. Verderio // Purinergic Signal. – 2009. – Vol. 5 - № 2. – P. 233-240.

31. Xu, J. Prostaglandin E2 production in astrocytes: regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents / J. Xu, M. Chalimoniuk, Y. Shu, A. Simonyi, A. Y. Sun, F. A. Gonzalez, G. A. Weisman, W. G. Wood, G. Y. Sun // Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. – 2003. – Vol. 69 -  $N_{2}$  6. – P. 437-448.

32. Murakami, K. Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes / K. Murakami, Y. Nakamura, Y. Yoneda // Neuroscience. – 2003. – Vol. 117 -  $N_{0}$  1. – P. 37-42.

33. Pålsson-McDermott, E. M. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4 / E. M. Pålsson-McDermott, L. A. O'Neill // Immunology. – 2004. – Vol. 113 - № 2. – P. 153-162.

34. Li, L. Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases / L. Li, C. Acioglu, R. F. Heary, S. Elkabes // Brain Behav Immun. – 2021. – Vol. 91 -. – P. 740-755.

35. Jiang, Q. Immunosuppression and Neuroinflammation in Stroke Pathobiology / Q. Jiang, C. R. Stone, K. Elkin, X. Geng, Y. Ding // Exp Neurobiol. – 2021. – Vol. 30 - № 2. – P. 101-112.

36. Kettenmann, H. Neuroglia: the 150 years after / H. Kettenmann, A. Verkhratsky // Trends Neurosci. – 2008. – Vol. 31 - № 12. – P. 653-659.

37. Herculano-Houzel, S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution / S. Herculano-Houzel // Glia. – 2014. – Vol. 62 -  $N_{2}$  9. – P. 1377-1391.

38. Khakh, B. S. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits /
B. S. Khakh, M. V. Sofroniew // Nat Neurosci. – 2015. – Vol. 18 - № 7. – P. 942-952.

39. Verkhratsky, A. The Concept of Neuroglia / A. Verkhratsky, M. S. Ho, R. Zorec,
V. Parpura // Adv Exp Med Biol. – 2019. – Vol. 1175 -. – P. 1-13.

40. Jäkel, S. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation / S. Jäkel, L. Dimou // Front Cell Neurosci. – 2017. – Vol. 11 -. – P. 24.

41. Verkhratsky, A. Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain / A. Verkhratsky, R. Zorec, V. Parpura // Brain Pathol. – 2017. – Vol. 27 - № 5. – P. 629-644.

42. Oberheim, N. A. Uniquely hominid features of adult human astrocytes / N. A. Oberheim, T. Takano, X. Han, W. He, J. H. Lin, F. Wang, Q. Xu, J. D. Wyatt, W. Pilcher, J. G. Ojemann, B. R. Ransom, S. A. Goldman, M. Nedergaard // J Neurosci. – 2009. – Vol. 29 - № 10. – P. 3276-3287.

43. Palmer, A. L. Astrocytes and Aging / A. L. Palmer, S. S. Ousman // Front Aging Neurosci. – 2018. – Vol. 10 -. – P. 337.

44. Verkhratsky, A. The Special Case of Human Astrocytes / A. Verkhratsky, N. A.
O. Bush, M. Nedergaard, A. Butt // Neuroglia. – 2018. – Vol. 1 - № 1. – P. 21-29.

45. Han, X. Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice / X. Han, M. Chen, F. Wang, M. Windrem, S. Wang, S. Shanz, Q. Xu, N. A. Oberheim, L. Bekar, S. Betstadt, A. J. Silva, T. Takano, S. A. Goldman, M. Nedergaard // Cell Stem Cell. – 2013. – Vol. 12 - № 3. – P. 342-353.

46. Preston, A. N. Visualizing the brain's astrocytes / A. N. Preston, D. A. Cervasio,
S. T. Laughlin // Methods Enzymol. – 2019. – Vol. 622 -. – P. 129-151.

47. Pekny, M. Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally / M. Pekny, P. Levéen, M. Pekna, C. Eliasson, C. H. Berthold, B. Westermark, C. Betsholtz // Embo j. – 1995. – Vol. 14 -  $N_{2}$  8. – P. 1590-1598.

48. Wilhelmsson, U. The role of GFAP and vimentin in learning and memory / U.
Wilhelmsson, A. Pozo-Rodrigalvarez, M. Kalm, Y. de Pablo, Å. Widestrand, M. Pekna,
M. Pekny // Biol Chem. – 2019. – Vol. 400 - № 9. – P. 1147-1156.

49. Oberheim, N. A. Heterogeneity of astrocytic form and function / N. A. Oberheim,
S. A. Goldman, M. Nedergaard // Methods Mol Biol. – 2012. – Vol. 814 -. – P. 23-45.

50. Yang, Y. Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice / Y. Yang, S. Vidensky, L. Jin, C. Jie, I. Lorenzini, M. Frankl, J. D. Rothstein // Glia. – 2011. – Vol. 59 - № 2. – P. 200-207.

51. Verkhratsky, A. Physiology of Astroglia / A. Verkhratsky, V. Parpura, N. Vardjan, R. Zorec // Adv Exp Med Biol. – 2019. – Vol. 1175 -. – P. 45-91.

52. Sofroniew, M. V. Astrocytes: biology and pathology / M. V. Sofroniew, H. V. Vinters // Acta Neuropathol. – 2010. – Vol. 119 -  $N_{2}$  1. – P. 7-35.

53. Fujii, Y. Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels / Y. Fujii, S. Maekawa, M. Morita // Sci Rep. – 2017. – Vol. 7 -  $N_{2}$  1. – P. 13115.

54. Matias, I. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease / I. Matias, J. Morgado, F. C. A. Gomes // Frontiers in Aging Neuroscience. – 2019. – Vol. 11 - № 59.

55. Potokar, M. Astrocyte Aquaporin Dynamics in Health and Disease / M. Potokar,
J. Jorgačevski, R. Zorec // Int J Mol Sci. – 2016. – Vol. 17 - № 7.

56. Petit, J. M. Regulation of neuron-astrocyte metabolic coupling across the sleepwake cycle / J. M. Petit, P. J. Magistretti // Neuroscience. – 2016. – Vol. 323 -. – P. 135-156.

57. Bélanger, M. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation / M. Bélanger, I. Allaman, P. J. Magistretti // Cell Metab. – 2011. – Vol. 14
- № 6. – P. 724-738.

58. Bak, L. K. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer / L. K. Bak, A. Schousboe, H. S. Waagepetersen // J Neurochem. – 2006. – Vol. 98 - № 3. – P. 641-653.

59. McKenna, M. C. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain / M. C. McKenna // J Neurosci Res. – 2007. – Vol. 85 - № 15. – P. 3347-3358.

60. Schousboe, A. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes / A. Schousboe, S. Scafidi, L. K. Bak, H. S. Waagepetersen, M. C. McKenna // Adv Neurobiol. – 2014. – Vol. 11 -. – P. 13-30.

61. Liu, C.-Y. Emerging Roles of Astrocytes in Neuro-Vascular Unit and the Tripartite Synapse With Emphasis on Reactive Gliosis in the Context of Alzheimer's Disease / C.-Y. Liu, Y. Yang, W.-N. Ju, X. Wang, H.-L. Zhang // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2018. – Vol. 12 - № 193.

62. Dienel, G. A. Contributions of glycogen to astrocytic energetics during brain activation / G. A. Dienel, N. F. Cruz // Metab Brain Dis. – 2015. – Vol. 30 -  $N_{2}$  1. – P. 281-298.

63. Mason, S. Lactate Shuttles in Neuroenergetics—Homeostasis, Allostasis and Beyond / S. Mason // Frontiers in Neuroscience. – 2017. – Vol. 11 - № 43.

64. Pekny, M. Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases / M. Pekny, M. Pekna // Biochim Biophys Acta. – 2016. – Vol. 1862 - № 3. – P. 483-491.

65. Araya, R. BMP signaling through BMPRIA in astrocytes is essential for proper cerebral angiogenesis and formation of the blood-brain-barrier / R. Araya, M. Kudo, M. Kawano, K. Ishii, T. Hashikawa, T. Iwasato, S. Itohara, T. Terasaki, A. Oohira, Y. Mishina, M. Yamada // Mol Cell Neurosci. – 2008. – Vol. 38 - № 3. – P. 417-430.

66. Jessen, N. A. The Glymphatic System: A Beginner's Guide / N. A. Jessen, A. S. Munk, I. Lundgaard, M. Nedergaard // Neurochem Res. – 2015. – Vol. 40 - № 12. – P. 2583-2599.

67. Mestre, H. The Brain's Glymphatic System: Current Controversies / H. Mestre,
Y. Mori, M. Nedergaard // Trends Neurosci. – 2020. – Vol. 43 - № 7. – P. 458-466.

68. Bialas, A. R. TGF-β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement / A. R. Bialas, B. Stevens // Nat Neurosci. – 2013. – Vol. 16 -  $N_{2}$  12. – P. 1773-1782.

69. Santello, M. Gliotransmission and the tripartite synapse / M. Santello, C. Calì, P. Bezzi // Adv Exp Med Biol. – 2012. – Vol. 970 -. – P. 307-331.

70. Verkhratsky, A. Astroglial cradle in the life of the synapse / A. Verkhratsky, M. Nedergaard // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2014. – Vol. 369 - № 1654. – P. 20130595.

71. Filosa, J. A. Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone / J. A. Filosa, H. W. Morrison, J. A. Iddings, W. Du, K. J. Kim // Neuroscience. – 2016. – Vol. 323 -. – P. 96-109.

72. MacVicar, B. A. Astrocyte regulation of blood flow in the brain / B. A. MacVicar, E. A. Newman // Cold Spring Harb Perspect Biol.  $-2015. - Vol. 7 - N_{\odot} 5$ .

73. Attwell, D. Glial and neuronal control of brain blood flow / D. Attwell, A. M.
Buchan, S. Charpak, M. Lauritzen, B. A. Macvicar, E. A. Newman // Nature. – 2010. –
Vol. 468 - № 7321. – P. 232-243.

74. Verkhratsky, A. Astroglia in Alzheimer's Disease / A. Verkhratsky, V. Parpura,
J. J. Rodriguez-Arellano, R. Zorec // Adv Exp Med Biol. – 2019. – Vol. 1175 -. – P.
273-324.

75. Messing, A. Alexander disease / A. Messing, M. Brenner, M. B. Feany, M. Nedergaard, J. E. Goldman // J Neurosci. – 2012. – Vol. 32 - № 15. – P. 5017-5023.

76. Molofsky, A. V. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective / A.
V. Molofsky, R. Krencik, E. M. Ullian, H. H. Tsai, B. Deneen, W. D. Richardson, B. A.
Barres, D. H. Rowitch // Genes Dev. – 2012. – Vol. 26 - № 9. – P. 891-907.

77. Brenner, M. A new mutation in GFAP widens the spectrum of Alexander disease / M. Brenner, A. Messing // Eur J Hum Genet. – 2015. – Vol. 23 -  $N_{2}$  1. – P. 1-2.

78. Olabarria, M. Disorders of Astrocytes: Alexander Disease as a Model / M. Olabarria, J. E. Goldman // Annu Rev Pathol. – 2017. – Vol. 12 -. – P. 131-152.

79. Steinhäuser, C. Crucial role of astrocytes in temporal lobe epilepsy / C. Steinhäuser, M. Grunnet, G. Carmignoto // Neuroscience. – 2016. – Vol. 323 -. – P. 157-169.

80. Capuani, C. Defective glutamate and K+ clearance by cortical astrocytes in familial hemiplegic migraine type 2 / C. Capuani, M. Melone, A. Tottene, L. Bragina, G. Crivellaro, M. Santello, G. Casari, F. Conti, D. Pietrobon // EMBO Mol Med. – 2016. – Vol. 8 - № 8. – P. 967-986.

81. Rossi, D. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis / D.
Rossi, L. Brambilla, C. F. Valori, C. Roncoroni, A. Crugnola, T. Yokota, D. E.
Bredesen, A. Volterra // Cell Death Differ. – 2008. – Vol. 15 - № 11. – P. 1691-1700.

82. Rodríguez-Arellano, J. J. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease / J. J. Rodríguez-Arellano, V. Parpura, R. Zorec, A. Verkhratsky // Neuroscience. – 2016. – Vol. 323 -. – P. 170-182.

83. Rajkowska, G. Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia / G. Rajkowska, J. J. Miguel-Hidalgo, Z. Makkos, H. Meltzer, J. Overholser, C. Stockmeier // Schizophr Res. – 2002. – Vol. 57 -  $N_{2}$  2-3. – P. 127-138.

84. Moraga-Amaro, R. Role of astrocytes in memory and psychiatric disorders / R. Moraga-Amaro, J. M. Jerez-Baraona, F. Simon, J. Stehberg // J Physiol Paris. – 2014. – Vol. 108 - № 4-6. – P. 240-251.

85. Koyama, Y. Functional alterations of astrocytes in mental disorders: pharmacological significance as a drug target / Y. Koyama // Front Cell Neurosci. – 2015. – Vol. 9 -. – P. 261.

86. Sofroniew, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation / M. V. Sofroniew // Trends Neurosci. – 2009. – Vol. 32 - № 12. – P. 638-647.

87. Robel, S. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis / S. Robel,
B. Berninger, M. Götz // Nat Rev Neurosci. – 2011. – Vol. 12 - № 2. – P. 88-104.

88. Zamanian, J. L. Genomic analysis of reactive astrogliosis / J. L. Zamanian, L. Xu,
L. C. Foo, N. Nouri, L. Zhou, R. G. Giffard, B. A. Barres // J Neurosci. – 2012. – Vol.
32 - № 18. – P. 6391-6410.

89. Liddelow, S. A. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia / S. A. Liddelow, K. A. Guttenplan, L. E. Clarke, F. C. Bennett, C. J. Bohlen, L. Schirmer, M. L. Bennett, A. E. Münch, W. S. Chung, T. C. Peterson, D. K. Wilton, A. Frouin, B. A. Napier, N. Panicker, M. Kumar, M. S. Buckwalter, D. H. Rowitch, V. L. Dawson, T. M. Dawson, B. Stevens, B. A. Barres // Nature. – 2017. – Vol. 541 - № 7638. – P. 481-487.

90. Sofroniew, M. V. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity / M. V. Sofroniew // Trends Immunol. – 2020. – Vol. 41 - № 9. – P. 758-770.

91. Pekny, M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits / M. Pekny, M. Pekna // Physiol Rev. – 2014. – Vol. 94 - № 4. – P. 1077-1098.

92. Verkhratsky, A. Astrogliopathology in neurological, neurodevelopmental and psychiatric disorders / A. Verkhratsky, V. Parpura // Neurobiol Dis. – 2016. – Vol. 85 -.
– P. 254-261.

93. Pekny, M. Astrocyte activation and reactive gliosis-A new target in stroke? / M.
Pekny, U. Wilhelmsson, T. Tatlisumak, M. Pekna // Neurosci Lett. – 2019. – Vol. 689 -.
– P. 45-55.

94. Sirko, S. Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected] / S. Sirko, G. Behrendt, P. A. Johansson, P. Tripathi, M. Costa, S. Bek, C. Heinrich, S. Tiedt, D. Colak, M. Dichgans, I. R. Fischer, N. Plesnila, M. Staufenbiel, C. Haass, M. Snapyan, A. Saghatelyan, L. H. Tsai, A. Fischer, K. Grobe, L. Dimou, M. Götz // Cell Stem Cell. – 2013. – Vol. 12 - № 4. – P. 426-439.

95. LeComte, M. D. Notch1-STAT3-ETBR signaling axis controls reactive astrocyte proliferation after brain injury / M. D. LeComte, I. S. Shimada, C. Sherwin, J. L. Spees // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2015. – Vol. 112 - № 28. – P. 8726-8731.

96. Liebner, S. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease / S. Liebner, R. M. Dijkhuizen, Y. Reiss, K. H. Plate, D. Agalliu, G. Constantin // Acta Neuropathol. – 2018. – Vol. 135 -  $N_{2}$  3. – P. 311-336.

97. Patabendige, A. Astrocyte Activation in Neurovascular Damage and Repair Following Ischaemic Stroke / A. Patabendige, A. Singh, S. Jenkins, J. Sen, R. Chen // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22 -  $N_{2}$  8.

98. Lamers, K. J. Cerebrospinal neuron-specific enolase, S-100 and myelin basic protein in neurological disorders / K. J. Lamers, B. G. van Engelen, F. J. Gabreëls, O. R. Hommes, G. F. Borm, R. A. Wevers // Acta Neurol Scand. – 1995. – Vol. 92 - № 3. – P. 247-251.

99. Michetti, F. Growing role of S100B protein as a putative therapeutic target for neurological- and nonneurological-disorders / F. Michetti, G. Di Sante, M. E. Clementi, B. Sampaolese, P. Casalbore, C. Volonté, V. Romano Spica, P. P. Parnigotto, R. Di Liddo, S. Amadio, F. Ria // Neurosci Biobehav Rev. – 2021. – Vol. 127 -. – P. 446-458.

100. Strukova, S. M. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues / S. M. Strukova // Biochemistry (Mosc).  $-2001. - Vol. 66 - N \ge 1. - P. 8-18.$ 

101. Göbel, K. The Coagulation Factors Fibrinogen, Thrombin, and Factor XII in Inflammatory Disorders—A Systematic Review / K. Göbel, S. Eichler, H. Wiendl, T. Chavakis, C. Kleinschnitz, S. G. Meuth // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9 - № 1731.

102. Crawley, J. T. The central role of thrombin in hemostasis / J. T. Crawley, S. Zanardelli, C. K. Chion, D. A. Lane // J Thromb Haemost. – 2007. – Vol. 5 Suppl 1 -. – P. 95-101.

103. Larsen, J. B. Thrombin: A Pivotal Player in Hemostasis and Beyond / J. B. Larsen, A. M. Hvas // Semin Thromb Hemost. – 2021.10.1055/s-0041-1727116 -.

104. Brummel, K. E. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation / K. E. Brummel, S. G. Paradis, S. Butenas, K. G. Mann // Blood. -2002. - Vol. 100 - No 1. - P. 148-152.

105. Shlobin, N. A. Role of Thrombin in Central Nervous System Injury and Disease
/ N. A. Shlobin, M. Har-Even, Z. Itsekson-Hayosh, S. Harnof, C. G. Pick // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11 - № 4.

106. Siller-Matula, J. M. Thrombin as a multi-functional enzyme. Focus on in vitro and in vivo effects / J. M. Siller-Matula, M. Schwameis, A. Blann, C. Mannhalter, B. Jilma // Thromb Haemost. – 2011. – Vol. 106 -  $N_{2}$  6. – P. 1020-1033.

107. Heuberger, D. M. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases / D. M. Heuberger, R. A. Schuepbach // Thromb J. -2019. - Vol. 17 -. - P. 4.

108. O'Brien, P. J. Protease activated receptors: theme and variations / P. J. O'Brien, M. Molino, M. Kahn, L. F. Brass // Oncogene. – 2001. – Vol. 20 - № 13. – P. 1570-1581.

109. Галков, М. Д. 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. – Vol. 36 - № 6. – Р. 400-408.

110. Steinhoff, M. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response / M. Steinhoff, J. Buddenkotte, V. Shpacovitch, A. Rattenholl, C. Moormann, N. Vergnolle, T. A. Luger, M. D. Hollenberg // Endocr Rev. – 2005. – Vol. 26 -  $N_{2}$  1. – P. 1-43.

111. Posma, J. J. Coagulation and non-coagulation effects of thrombin / J. J. Posma,
J. J. Posthuma, H. M. Spronk // J Thromb Haemost. – 2016. – Vol. 14 - № 10. – P.
1908-1916.

112. Grishina, Z. Activity of recombinant trypsin isoforms on human proteinaseactivated receptors (PAR): mesotrypsin cannot activate epithelial PAR-1, -2, but weakly activates brain PAR-1 / Z. Grishina, E. Ostrowska, W. Halangk, M. Sahin-Tóth, G. Reiser // Br J Pharmacol. – 2005. – Vol. 146 -  $N_{2}$  7. – P. 990-999.

113. Wang, Y. Mesotrypsin, a brain trypsin, activates selectively proteinase-activated receptor-1, but not proteinase-activated receptor-2, in rat astrocytes / Y. Wang, W. Luo, T. Wartmann, W. Halangk, M. Sahin-Tóth, G. Reiser // J Neurochem. – 2006. – Vol. 99
- № 3. – P. 759-769.

114. Ossovskaya, V. S. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease / V. S. Ossovskaya, N. W. Bunnett // Physiol Rev. – 2004. – Vol. 84 - № 2. – P. 579-621.

115. Zhao, P. Biased Signaling of Protease-Activated Receptors / P. Zhao, M. Metcalf, N. W. Bunnett // Frontiers in Endocrinology. – 2014. – Vol. 5 - № 67.

116. Klages, B. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinasemediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets / B. Klages, U. Brandt, M. I. Simon, G. Schultz, S. Offermanns // J Cell Biol. – 1999. – Vol. 144 - № 4. – P. 745-754.

117. Dihanich, M. Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system /
M. Dihanich, M. Kaser, E. Reinhard, D. Cunningham, D. Monard // Neuron. – 1991. –
Vol. 6 - № 4. – P. 575-581.

118. Arai, T. Thrombin and prothrombin are expressed by neurons and glial cells and accumulate in neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain / T. Arai, J. Miklossy, A. Klegeris, J. P. Guo, P. L. McGeer // J Neuropathol Exp Neurol. – 2006. – Vol. 65 –  $N_{2}$  1. – P. 19-25.

119. Deschepper, C. F. Production of thrombin and antithrombin III by brain and astroglial cell cultures / C. F. Deschepper, V. Bigornia, M. E. Berens, M. C. Lapointe // Brain Res Mol Brain Res. – 1991. – Vol. 11 -  $N_{2}$  3-4. – P. 355-358.

120. Shikamoto, Y. Expression of factor X in both the rat brain and cells of the central nervous system / Y. Shikamoto, T. Morita // FEBS Lett. – 1999. – Vol. 463 -  $N_{\odot}$  3. – P. 387-389.

121. Xi, G. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? / G. Xi, G. Reiser, R. F. Keep // J Neurochem. – 2003. – Vol. 84 -  $N_{2}$  1. – P. 3-9.

122. Rohatgi, T. Protease-activated receptors in neuronal development, neurodegeneration, and neuroprotection: thrombin as signaling molecule in the brain / T. Rohatgi, F. Sedehizade, K. G. Reymann, G. Reiser // Neuroscientist. – 2004. – Vol.  $10 - N_{\rm P} 6. - P. 501-512.$ 

123. Itsekson-Hayosh, Z. Minimal Traumatic Brain Injury in Mice: Protease-Activated Receptor 1 and Thrombin-Related Changes / Z. Itsekson-Hayosh, E. Shavit-Stein, A. Katzav, V. Rubovitch, N. Maggio, J. Chapman, S. Harnof, C. G. Pick // J Neurotrauma. – 2016. – Vol. 33 - № 20. – P. 1848-1854.

124. Iannucci, J. Thrombin, a Mediator of Coagulation, Inflammation, and Neurotoxicity at the Neurovascular Interface: Implications for Alzheimer's Disease / J. Iannucci, W. Renehan, P. Grammas // Front Neurosci. – 2020. – Vol. 14 -. – P. 762.

125. Ishida, Y. Upregulation of protease-activated receptor-1 in astrocytes in Parkinson disease: astrocyte-mediated neuroprotection through increased levels of glutathione peroxidase / Y. Ishida, A. Nagai, S. Kobayashi, S. U. Kim // J Neuropathol Exp Neurol. – 2006. – Vol. 65 -  $N_{2}$  1. – P. 66-77.

126. Kim, H. N. The thrombin receptor modulates astroglia-neuron trophic coupling and neural repair after spinal cord injury / H. N. Kim, E. M. Triplet, M. Radulovic, S. Bouchal, L. S. Kleppe, W. L. Simon, H. Yoon, I. A. Scarisbrick // Glia. – 2021. – Vol.  $69 - N_{2} 9. - P. 2111-2132.$ 

127. Xi, G. Attenuation of thrombin-induced brain edema by cerebral thrombin preconditioning / G. Xi, R. F. Keep, Y. Hua, J. Xiang, J. T. Hoff // Stroke. – 1999. – Vol. 30 -  $N_{0}$  6. – P. 1247-1255.

128. Masada, T. The effects of thrombin preconditioning on focal cerebral ischemia in rats / T. Masada, G. Xi, Y. Hua, R. F. Keep // Brain Res. – 2000. – Vol. 867 - № 1-2. – P. 173-179.

129. Hanisch, U. K. The microglia-activating potential of thrombin: the protease is not involved in the induction of proinflammatory cytokines and chemokines / U. K. Hanisch, D. van Rossum, Y. Xie, K. Gast, R. Misselwitz, S. Auriola, G. Goldsteins, J. Koistinaho, H. Kettenmann, T. Möller // J Biol Chem. – 2004. – Vol. 279 - № 50. – P. 51880-51887.

130. Radulovic, M. Targeting the thrombin receptor modulates inflammation and astrogliosis to improve recovery after spinal cord injury / M. Radulovic, H. Yoon, J. Wu, K. Mustafa, I. A. Scarisbrick // Neurobiol Dis. – 2016. – Vol. 93 -. – P. 226-242.

131. Wang, H. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways / H. Wang, J. J. Ubl, R. Stricker, G. Reiser // Am J Physiol Cell Physiol. – 2002. – Vol. 283 -  $N_{2}$  5. – P. C1351-1364.

132. Walsh, C. T. Thrombin receptor and RhoA mediate cell proliferation through integrins and cysteine-rich protein 61 / C. T. Walsh, J. Radeff-Huang, R. Matteo, A. Hsiao, S. Subramaniam, D. Stupack, J. H. Brown // Faseb j. – 2008. – Vol. 22 - № 11. – P. 4011-4021.

133. Bao, X. Thrombin-induced tolerance against oxygen-glucose deprivation in astrocytes: role of protease-activated receptor-1 / X. Bao, Y. Hua, R. F. Keep, G. Xi // Cond Med. – 2018. – Vol. 1 -  $N_{2}$  2. – P. 57-63.

134. Zhu, Z. PAR-1 activation rescues astrocytes through the PI3K/Akt signaling pathway from chemically induced apoptosis that is exacerbated by gene silencing of  $\beta$ -arrestin 1 / Z. Zhu, G. Reiser // Neurochem Int. – 2014. – Vol. 67 -. – P. 46-56.

135. Wang, Y. The role of calcium in protease-activated receptor-induced secretion of chemokine GRO/CINC-1 in rat brain astrocytes / Y. Wang, W. Luo, G. Reiser // J Neurochem. – 2007. – Vol. 103 -  $N_{2}$  2. – P. 814-819.

136. Ramos-Mandujano, G. Thrombin potently enhances swelling-sensitive glutamate efflux from cultured astrocytes / G. Ramos-Mandujano, E. Vázquez-Juárez, R. Hernández-Benítez, H. Pasantes-Morales // Glia. – 2007. – Vol. 55 - № 9. – P. 917-925.

137. Vázquez-Juárez, E. Thrombin potentiates D-aspartate efflux from cultured astrocytes under conditions of K+ homeostasis disruption / E. Vázquez-Juárez, R. Hernández-Benítez, A. López-Domínguez, H. Pasantes-Morales // J Neurochem. – 2009. – Vol. 111 -  $N_{2}$  6. – P. 1398-1408.

138. Zündorf, G. The phosphorylation status of extracellular-regulated kinase 1/2 in astrocytes and neurons from rat hippocampus determines the thrombin-induced calcium release and ROS generation / G. Zündorf, G. Reiser // J Neurochem. – 2011. – Vol. 119 –  $N_{\rm P}$  6. – P. 1194-1204.

139. Simmons, S. Thrombin induces release of proinflammatory chemokines interleukin-8 and interferon- $\gamma$ -induced protein-10 from cultured human fetal astrocytes / S. Simmons, R. V. Lee, T. Möller, J. R. Weinstein // Neuroreport. – 2013. – Vol. 24 -  $N_{2}$  1. – P. 36-40.

140. Lin, C. C. C-Src/Jak2/PDGFR/PKCδ-dependent MMP-9 induction is required for thrombin-stimulated rat brain astrocytes migration / C. C. Lin, I. T. Lee, P. L. Chi, H. L. Hsieh, S. E. Cheng, L. D. Hsiao, C. J. Liu, C. M. Yang // Mol Neurobiol. – 2014. – Vol. 49 - № 2. – P. 658-672.

141. Hu, S. Astrocytic thrombin-evoked VEGF release is dependent on p44/42 MAPKs and PAR1 / S. Hu, G. Wu, J. Zheng, X. Liu, Y. Zhang // Biochem Biophys Res Commun. – 2019. – Vol. 509 - № 2. – P. 585-589.

142. Kreda, S. M. Thrombin-promoted release of UDP-glucose from human astrocytoma cells / S. M. Kreda, L. Seminario-Vidal, C. Heusden, E. R. Lazarowski // Br J Pharmacol. – 2008. – Vol. 153 - № 7. – P. 1528-1537.

143. Lazarowski, E. Regulated release of nucleotides and UDP sugars from astrocytoma cells / E. Lazarowski // Novartis Found Symp. – 2006. – Vol. 276 -. – P. 73-84; discussion 84-90, 107-112, 275-181.

144. Blum, A. E. Rho-family GTPases modulate Ca(2+) -dependent ATP release from astrocytes / A. E. Blum, S. M. Joseph, R. J. Przybylski, G. R. Dubyak // Am J Physiol Cell Physiol. – 2008. – Vol. 295 - № 1. – P. C231-241.

145. Fields, R. D. Purinergic signalling in neuron-glia interactions / R. D. Fields, G. Burnstock // Nat Rev Neurosci. – 2006. – Vol. 7 -  $N_{2}$  6. – P. 423-436.

146. Burnstock, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission / G. Burnstock // Physiol Rev. – 2007. – Vol. 87 - № 2. – P. 659-797.

147. Koizumi, S. Synchronization of Ca2+ oscillations: involvement of ATP release in astrocytes / S. Koizumi // Febs j. – 2010. – Vol. 277 - № 2. – P. 286-292.

148. Halassa, M. M. Tripartite synapses: roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior / M. M. Halassa, T. Fellin, P. G. Haydon // Neuropharmacology. – 2009. – Vol. 57 -  $N_{2}$  4. – P. 343-346.

149. Koizumi, S. Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors / S. Koizumi, K. Ohsawa, K. Inoue, S. Kohsaka // Glia. – 2013. – Vol. 61 -  $N_{2}$  1. – P. 47-54.

150. Moro, N. Massive efflux of adenosine triphosphate into the extracellular space immediately after experimental traumatic brain injury / N. Moro, S. S. Ghavim, R. L. Sutton // Exp Ther Med. – 2021. – Vol. 21 -  $N_{0}$  6. – P. 575.

151. Franke, H. Pathophysiology of astroglial purinergic signalling / H. Franke, A. Verkhratsky, G. Burnstock, P. Illes // Purinergic Signal. – 2012. – Vol. 8 - № 3. – P. 629-657.
152. Schwiebert, E. M. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells
/ E. M. Schwiebert, A. Zsembery // Biochim Biophys Acta. – 2003. – Vol. 1615 - № 12. – P. 7-32.

153. Falzoni, S. Detecting adenosine triphosphate in the pericellular space / S. Falzoni, G. Donvito, F. Di Virgilio // Interface Focus. – 2013. – Vol. 3 - № 3. – P. 20120101.

154. Jurányi, Z. Involvement of P2 purinoceptors and the nitric oxide pathway in [3H]purine outflow evoked by short-term hypoxia and hypoglycemia in rat hippocampal slices / Z. Jurányi, B. Sperlágh, E. S. Vizi // Brain Res. – 1999. – Vol. 823 - № 1-2. – P. 183-190.

155. Frenguelli, B. G. Temporal and mechanistic dissociation of ATP and adenosine release during ischaemia in the mammalian hippocampus / B. G. Frenguelli, G. Wigmore, E. Llaudet, N. Dale // J Neurochem. – 2007. – Vol. 101 - № 5. – P. 1400-1413.

156. Melani, A. Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release under physiological and ischemic in vivo conditions in the rat striatum / A. Melani, F. Corti, H. Stephan, C. E. Müller, C. Donati, P. Bruni, M. G. Vannucchi, F. Pedata // Exp Neurol. – 2012. – Vol. 233 -  $N_{2}$  1. – P. 193-204.

157. Lämmer, A. Neuroprotective effects of the P2 receptor antagonist PPADS on focal cerebral ischaemia-induced injury in rats / A. Lämmer, A. Günther, A. Beck, U. Krügel, H. Kittner, D. Schneider, P. Illes, H. Franke // Eur J Neurosci. – 2006. – Vol. 23 - № 10. – P. 2824-2828.

158. Ciccarelli, R. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain / R. Ciccarelli, P. Ballerini, G. Sabatino, M. P. Rathbone, M. D'Onofrio, F. Caciagli, P. Di Iorio // Int J Dev Neurosci. – 2001. – Vol. 19 - № 4. – P. 395-414.

159. Coco, S. Storage and release of ATP from astrocytes in culture / S. Coco, F. Calegari, E. Pravettoni, D. Pozzi, E. Taverna, P. Rosa, M. Matteoli, C. Verderio // J Biol Chem. – 2003. – Vol. 278 - № 2. – P. 1354-1362.

160. Pangršič, T. Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes / T. Pangršič,
M. Potokar, M. Stenovec, M. Kreft, E. Fabbretti, A. Nistri, E. Pryazhnikov, L. Khiroug,
R. Giniatullin, R. Zorec // J Biol Chem. – 2007. – Vol. 282 - № 39. – P. 28749-28758.

161. Harada, K. Gliotransmitter release from astrocytes: functional, developmental and pathological implications in the brain / K. Harada, T. Kamiya, T. Tsuboi // Frontiers in Neuroscience. – 2016. – Vol. 9 - № 499.

162. Xiong, Y. Ca(2+)-Dependent and Ca(2+)-Independent ATP Release in Astrocytes / Y. Xiong, S. Sun, S. Teng, M. Jin, Z. Zhou // Front Mol Neurosci. – 2018.
– Vol. 11 -. – P. 224.

163. Giuliani, A. L. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules
/ A. L. Giuliani, A. C. Sarti, F. Di Virgilio // Immunol Lett. – 2019. – Vol. 205 -. – P.
16-24.

164. Vultaggio-Poma, V. Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy /
V. Vultaggio-Poma, A. C. Sarti, F. Di Virgilio // Cells. – 2020. – Vol. 9 - № 11.

165. Brambilla, R. A novel gliotic P2 receptor mediating cyclooxygenase-2 induction in rat and human astrocytes / R. Brambilla, S. Ceruti, W. Malorni, F. Cattabeni, M. P. Abbracchio // J Auton Nerv Syst. – 2000. – Vol. 81 - № 1-3. – P. 3-9.

166. Neary, J. T. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells / J. T. Neary, M. P. Rathbone, F. Cattabeni, M. P. Abbracchio, G. Burnstock // Trends Neurosci. – 1996. – Vol. 19 -  $N_{2}$  1. – P. 13-18.

167. Abbracchio, M. P. Effects of ATP analogues and basic fibroblast growth factor on astroglial cell differentiation in primary cultures of rat striatum / M. P. Abbracchio, S. Ceruti, R. Langfelder, F. Cattabeni, M. J. Saffrey, G. Burnstock // Int J Dev Neurosci. – 1995. – Vol. 13 - № 7. – P. 685-693.

168. Neary, J. T. Destabilization of glial fibrillary acidic protein mRNA in astrocytes by ammonia and protection by extracellular ATP / J. T. Neary, S. R. Whittemore, Q. Zhu, M. D. Norenberg // J Neurochem. – 1994. – Vol. 63 - № 6. – P. 2021-2027.

169. Neary, J. T. Extracellular ATP induces stellation and increases glial fibrillary acidic protein content and DNA synthesis in primary astrocyte cultures / J. T. Neary, L.

Baker, S. L. Jorgensen, M. D. Norenberg // Acta Neuropathol. – 1994. – Vol. 87 - № 1. – P. 8-13.

170. Abbracchio, M. P. Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum / M. P. Abbracchio, M. J. Saffrey, V. Höpker, G. Burnstock // Neuroscience. – 1994. – Vol. 59 - № 1. – P. 67-76.

171. Brambilla, R. Induction of COX-2 and reactive gliosis by P2Y receptors in rat cortical astrocytes is dependent on ERK1/2 but independent of calcium signalling / R. Brambilla, J. T. Neary, F. Cattabeni, L. Cottini, G. D'Ippolito, P. C. Schiller, M. P. Abbracchio // J Neurochem. – 2002. – Vol. 83 -  $N_{2}$  6. – P. 1285-1296.

172. Washburn, K. B. P2 purinergic receptors signal to STAT3 in astrocytes: Difference in STAT3 responses to P2Y and P2X receptor activation / K. B. Washburn, J. T. Neary // Neuroscience. – 2006. – Vol. 142 -  $N_{2}$  2. – P. 411-423.

173. Lecca, D. Purinergic trophic signalling in glial cells: functional effects and modulation of cell proliferation, differentiation, and death / D. Lecca, S. Ceruti, M. Fumagalli, M. P. Abbracchio // Purinergic Signal. – 2012. – Vol. 8 -  $N_{2}$  3. – P. 539-557.

174. Franke, H. P2 receptor-mediated proliferative effects on astrocytes in vivo / H. Franke, U. Krügel, P. Illes // Glia. – 1999. – Vol. 28 - № 3. – P. 190-200.

175. Franke, H. P2 receptor-types involved in astrogliosis in vivo / H. Franke, U. Krügel, R. Schmidt, J. Grosche, A. Reichenbach, P. Illes // Br J Pharmacol. – 2001. – Vol. 134 - № 6. – P. 1180-1189.

176. Franke, H. P2 receptor-mediated stimulation of the PI3-K/Akt-pathway in vivo / H. Franke, C. Sauer, C. Rudolph, U. Krügel, J. G. Hengstler, P. Illes // Glia. – 2009. – Vol. 57 - № 10. – P. 1031-1045.

177. Kuboyama, K. Astrocytic P2Y(1) receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia / K. Kuboyama, H. Harada, H. Tozaki-Saitoh, M. Tsuda, K. Ushijima, K. Inoue // J Cereb Blood Flow Metab. – 2011. – Vol. 31 -  $N_{2}$  9. – P. 1930-1941.

178. Quintas, C. P2Y receptors on astrocytes and microglia mediate opposite effects in astroglial proliferation / C. Quintas, S. Fraga, J. Gonçalves, G. Queiroz // Purinergic Signal. – 2011. – Vol. 7 -  $N_{2}$  2. – P. 251-263.

179. Quintas, C. Microglia P2Y(13) Receptors Prevent Astrocyte Proliferation Mediated by P2Y(1) Receptors / C. Quintas, N. Vale, J. Gonçalves, G. Queiroz // Front Pharmacol. – 2018. – Vol. 9 -. – P. 418.

180. Shinozaki, Y. Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y(1) Receptor Downregulation / Y. Shinozaki, K. Shibata, K. Yoshida, E. Shigetomi, C. Gachet, K. Ikenaka, K. F. Tanaka, S. Koizumi // Cell Rep. – 2017. – Vol. 19 - № 6. – P. 1151-1164.

181. John, G. R. Extracellular nucleotides differentially regulate interleukin-1beta signaling in primary human astrocytes: implications for inflammatory gene expression / G. R. John, J. E. Simpson, M. N. Woodroofe, S. C. Lee, C. F. Brosnan // J Neurosci. – 2001. – Vol. 21 - № 12. – P. 4134-4142.

182. Neary, J. T. Opposing effects of P2X(7) and P2Y purine/pyrimidine-preferring receptors on proliferation of astrocytes induced by fibroblast growth factor-2: implications for CNS development, injury, and repair / J. T. Neary, Y. F. Shi, Y. Kang, M. D. Tran // J Neurosci Res. – 2008. – Vol. 86 -  $N_{\rm P}$  14. – P. 3096-3105.

183. Neary, J. T. P2 receptor signalling, proliferation of astrocytes, and expression of molecules involved in cell-cell interactions / J. T. Neary, Y. Kang, Y. F. Shi, M. D. Tran, I. B. Wanner // Novartis Found Symp. – 2006. – Vol. 276 -. – P. 131-143; discussion 143-137, 233-137, 275-181.

184. Bolego, C. Characterization of the signalling pathways involved in ATP and basic fibroblast growth factor-induced astrogliosis / C. Bolego, S. Ceruti, R. Brambilla, L. Puglisi, F. Cattabeni, G. Burnstock, M. P. Abbracchio // Br J Pharmacol. – 1997. – Vol. 121 -  $N_{2}$  8. – P. 1692-1699.

185. Neary, J. T. Synergistic activation of DNA synthesis in astrocytes by fibroblast growth factors and extracellular ATP / J. T. Neary, S. R. Whittemore, Q. Zhu, M. D. Norenberg // J Neurochem. – 1994. – Vol. 63 -  $N_{2}$  2. – P. 490-494.

186. Burnstock, G. Purine and purinergic receptors / G. Burnstock // Brain Neurosci Adv. – 2018. – Vol. 2 -. – P. 2398212818817494. 187. Territo, P. R. P2X(7) Receptors in Neurodegeneration: Potential Therapeutic Applications From Basic to Clinical Approaches / P. R. Territo, H. Zarrinmayeh // Front Cell Neurosci. – 2021. – Vol. 15 -. – P. 617036.

188. Pedata, F. Purinergic signalling in brain ischemia / F. Pedata, I. Dettori, E.
Coppi, A. Melani, I. Fusco, R. Corradetti, A. M. Pugliese // Neuropharmacology. –
2016. – Vol. 104 -. – P. 105-130.

189. Fumagalli, M. Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors / M. Fumagalli, R. Brambilla, N. D'Ambrosi, C. Volonte, M. Matteoli, C. Verderio, M. P. Abbracchio // Glia. – 2003. – Vol. 43 - № 3. – P. 218-203.

190. Abbracchio, M. P. Pathophysiological roles of P2 receptors in glial cells / M. P. Abbracchio, C. Verderio // Novartis Found Symp. – 2006. – Vol. 276 -. – P. 91-103; discussion 103-112, 275-181.

191. Stelmashenko, O. Activation of trimeric P2X2 receptors by fewer than three ATP molecules / O. Stelmashenko, U. Lalo, Y. Yang, L. Bragg, R. A. North, V. Compan // Mol Pharmacol. – 2012. – Vol. 82 -  $N_{2}$  4. – P. 760-766.

192. North, R. A. P2X receptors / R. A. North // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2016. – Vol. 371 - № 1700.

193. Illes, P. P2X7 Receptors Amplify CNS Damage in Neurodegenerative Diseases /
P. Illes // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21 - № 17.

194. Kawate, T. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state / T. Kawate, J. C. Michel, W. T. Birdsong, E. Gouaux // Nature. – 2009. – Vol. 460 - № 7255. – P. 592-598.

195. Hattori, M. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors / M. Hattori, E. Gouaux // Nature. – 2012. – Vol. 485 - № 7397. – P. 207-212.

196. Jiang, L. H. Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and Contributions in Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms / L. H. Jiang, J. M. Baldwin, S. Roger, S. A. Baldwin // Front Pharmacol. – 2013. – Vol. 4 -. – P. 55.

197. Saul, A. Heteromeric assembly of P2X subunits / A. Saul, R. Hausmann, A. Kless, A. Nicke // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2013. – Vol. 7 - № 250.

198. Surprenant, A. Signaling at purinergic P2X receptors / A. Surprenant, R. A. North // Annu Rev Physiol. – 2009. – Vol. 71 -. – P. 333-359.

199. Franke, H. P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats / H. Franke, J. Grosche, H. Schädlich, U. Krügel, C. Allgaier, P. Illes // Neuroscience. – 2001. – Vol. 108 - № 3. – P. 421-429.

200. Dixon, S. J. Activation of P2 nucleotide receptors stimulates acid efflux from astrocytes / S. J. Dixon, R. Yu, N. Panupinthu, J. X. Wilson // Glia. – 2004. – Vol. 47 -  $N_{2}$  4. – P. 367-376.

201. Kukley, M. Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus / M. Kukley, J. A. Barden, C. Steinhäuser, R. Jabs // Glia. – 2001. – Vol. 36 - № 1. – P. 11-21.

202. Loesch, A. Electron-immunocytochemical localization of P2X1 receptors in the rat cerebellum / A. Loesch, G. Burnstock // Cell Tissue Res. – 1998. – Vol. 294 - № 2. – P. 253-260.

203. Cavaliere, F. P2 receptor antagonist trinitrophenyl-adenosine-triphosphate protects hippocampus from oxygen and glucose deprivation cell death / F. Cavaliere, S. Amadio, K. Dinkel, K. G. Reymann, C. Volonté // J Pharmacol Exp Ther. – 2007. – Vol. 323 - N 1. – P. 70-77.

204. Cavaliere, F. Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists / F. Cavaliere, F. Florenzano, S. Amadio, F. R. Fusco, M. T. Viscomi, N. D'Ambrosi, F. Vacca, G. Sancesario, G. Bernardi, M. Molinari, C. Volontè // Neuroscience. – 2003. – Vol. 120 - № 1. – P. 85-98.

205. Wang, Q. Impaired calcium signaling in astrocytes modulates autism spectrum disorder-like behaviors in mice / Q. Wang, Y. Kong, D. Y. Wu, J. H. Liu, W. Jie, Q. L. You, L. Huang, J. Hu, H. D. Chu, F. Gao, N. Y. Hu, Z. C. Luo, X. W. Li, S. J. Li, Z. F. Wu, Y. L. Li, J. M. Yang, T. M. Gao // Nat Commun. – 2021. – Vol. 12 -  $N_{2}$  1. – P. 3321.

206. Lee, J. Electrophysiological Evidence for Functional Astrocytic P2X(3) Receptors in the Mouse Trigeminal Caudal Nucleus / J. Lee, J. Y. Bae, C. J. Lee, Y. C. Bae // Exp Neurobiol. – 2018. – Vol. 27 -  $N_{2}$  2. – P. 88-93.

207. Mah, W. A role for the purinergic receptor P2X(3) in astrocytes in the mechanism of craniofacial neuropathic pain / W. Mah, S. M. Lee, J. Lee, J. Y. Bae, J. S. Ju, C. J. Lee, D. K. Ahn, Y. C. Bae // Sci Rep. – 2017. – Vol. 7 -  $N_{2}$  1. – P. 13627.

208. Burnstock, G. Physiopathological roles of P2X receptors in the central nervous system / G. Burnstock // Curr Med Chem. – 2015. – Vol. 22 - № 7. – P. 819-844.

209. Su, W. F. Overexpression of P2X4 receptor in Schwann cells promotes motor and sensory functional recovery and remyelination via BDNF secretion after nerve injury / W. F. Su, F. Wu, Z. H. Jin, Y. Gu, Y. T. Chen, Y. Fei, H. Chen, Y. X. Wang, L. Y. Xing, Y. Y. Zhao, Y. Yuan, X. Tang, G. Chen // Glia. – 2019. – Vol. 67 - № 1. – P. 78-90.

210. Ashour, F. Electron microscopic localisation of P2X4 receptor subunit immunoreactivity to pre- and post-synaptic neuronal elements and glial processes in the dorsal vagal complex of the rat / F. Ashour, J. Deuchars // Brain Res. – 2004. – Vol. 1026 -  $N_{\rm P}$  1. – P. 44-55.

211. Ho, T. Immunolocalization of the P2X4 receptor on neurons and glia in the mammalian retina / T. Ho, K. A. Vessey, E. L. Fletcher // Neuroscience. -2014. - Vol. 277 -. - P. 55-71.

212. Köles, L. P2X and P2Y receptors as possible targets of therapeutic manipulations in CNS illnesses / L. Köles, S. Furst, P. Illes // Drug News Perspect. – 2005. – Vol. 18 - № 2. – P. 85-101.

213. James, G. P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca2+ signalling in glial cell pathology in the central nervous system / G. James, A. M. Butt // Eur J Pharmacol. – 2002. – Vol. 447 -  $N_{2}$  2-3. – P. 247-260.

214. Jurga, A. M. Blockade of P2X4 Receptors Inhibits Neuropathic Pain-Related Behavior by Preventing MMP-9 Activation and, Consequently, Pronociceptive Interleukin Release in a Rat Model / A. M. Jurga, A. Piotrowska, W. Makuch, B. Przewlocka, J. Mika // Front Pharmacol. – 2017. – Vol. 8 -. – P. 48.

215. Inoue, K. The role of nucleotides in the neuron--glia communication responsible for the brain functions / K. Inoue, S. Koizumi, M. Tsuda // J Neurochem. – 2007. – Vol. 102 -  $N_{2}$  5. – P. 1447-1458.

216. De Rivero Vaccari, J. P. P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury / J. P. de Rivero Vaccari, D. Bastien, G. Yurcisin, I. Pineau, W. D. Dietrich, Y. De Koninck, R. W. Keane, S. Lacroix // J Neurosci. – 2012. – Vol. 32 -  $N_{2}$  9. – P. 3058-3066.

217. Gong, Q. J. ATP induces long-term potentiation of C-fiber-evoked field potentials in spinal dorsal horn: the roles of P2X4 receptors and p38 MAPK in microglia / Q. J. Gong, Y. Y. Li, W. J. Xin, Y. Zang, W. J. Ren, X. H. Wei, Y. Y. Li, T. Zhang, X. G. Liu // Glia. – 2009. – Vol. 57 -  $N_{2}$  6. – P. 583-591.

218. Zhang, Z. Mechanical allodynia and spinal up-regulation of P2X4 receptor in experimental autoimmune neuritis rats / Z. Zhang, Z. Y. Zhang, U. Fauser, H. J. Schluesener // Neuroscience. -2008. - Vol. 152 - No 2. - P. 495-501.

219. Sperlágh, B. Purinergic modulation of microglial cell activation / B. Sperlágh, P.
Illes // Purinergic Signal. – 2007. – Vol. 3 - № 1-2. – P. 117-127.

220. Tsuda, M. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury / M. Tsuda, Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi, A. Mizokoshi, S. Kohsaka, M. W. Salter, K. Inoue // Nature. – 2003. – Vol. 424 - № 6950. – P. 778-783.

221. Wang, H. Inhibition of inflammatory mediator release from microglia can treat ischemic/hypoxic brain injury / H. Wang, W. Guo, H. Liu, R. Zeng, M. Lu, Z. Chen, Q. Xiao // Neural Regen Res. – 2013. – Vol. 8 - № 13. – P. 1157-1168.

222. Ase, A. R. Modulation of heteromeric P2X1/5 receptors by phosphoinositides in astrocytes depends on the P2X1 subunit / A. R. Ase, L. P. Bernier, D. Blais, Y. Pankratov, P. Séguéla // J Neurochem. – 2010. – Vol. 113 -  $N_{2}$  6. – P. 1676-1684.

223. Palygin, O. Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca2+ signalling in cortical astrocytes / O. Palygin, U. Lalo, A. Verkhratsky, Y. Pankratov // Cell Calcium. – 2010. – Vol. 48 -  $N_{2}$  4. – P. 225-231.

224. Hausmann, R. Key sites for P2X receptor function and multimerization: overview of mutagenesis studies on a structural basis / R. Hausmann, A. Kless, G. Schmalzing // Curr Med Chem. – 2015. – Vol. 22 -  $N_{2}$  7. – P. 799-818.

225. Franke, H. P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats / H. Franke, A. Günther, J. Grosche, R. Schmidt, S. Rossner, R. Reinhardt, H. Faber-Zuschratter, D. Schneider, P. Illes // J Neuropathol Exp Neurol. – 2004. – Vol. 63 -  $N_{\rm P}$  7. – P. 686-699.

226. Lee, D. S. Protein disulfide isomerase-mediated S-nitrosylation facilitates surface expression of P2X7 receptor following status epilepticus / D. S. Lee, J. E. Kim // J Neuroinflammation. – 2021. – Vol. 18 -  $N_{2}$  1. – P. 14.

227. Morgan, J. Characterization of the Expression of the ATP-Gated P2X7 Receptor Following Status Epilepticus and during Epilepsy Using a P2X7-EGFP Reporter Mouse / J. Morgan, M. Alves, G. Conte, A. Menéndez-Méndez, L. de Diego-Garcia, G. de Leo, E. Beamer, J. Smith, A. Nicke, T. Engel // Neurosci Bull. – 2020. – Vol. 36 - № 11. – P. 1242-1258.

228. Fonteles, A. A. ATP Signaling Controlling Dyskinesia Through P2X7 Receptors / A. A. Fonteles, J. C. S. Neves, A. P. F. Menezes, J. F. Pereira, A. T. A. Silva, R. A. Cunha, G. M. Andrade // Front Mol Neurosci. – 2020. – Vol. 13 -. – P. 111.

229. Domercq, M. Targeting P2X4 and P2X7 receptors in multiple sclerosis / M. Domercq, C. Matute // Curr Opin Pharmacol. – 2019. – Vol. 47 -. – P. 119-125.

230. Crabbé, M. Increased P2X7 Receptor Binding Is Associated With Neuroinflammation in Acute but Not Chronic Rodent Models for Parkinson's Disease / M. Crabbé, A. Van der Perren, I. Bollaerts, S. Kounelis, V. Baekelandt, G. Bormans, C. Casteels, L. Moons, K. Van Laere // Front Neurosci. – 2019. – Vol. 13 -. – P. 799.

231. Illes, P. Neuronal P2X7 Receptors Revisited: Do They Really Exist? / P. Illes, T.
M. Khan, P. Rubini // J Neurosci. – 2017. – Vol. 37 - № 30. – P. 7049-7062.

232. Huang, C. Inhibition of P2X7 Receptor Ameliorates Nuclear Factor-Kappa B Mediated Neuroinflammation Induced by Status Epilepticus in Rat Hippocampus / C. Huang, X. S. Chi, R. Li, X. Hu, H. X. Xu, J. M. Li, D. Zhou // J Mol Neurosci. – 2017. – Vol. 63 - № 2. – P. 173-184.

233. Amadio, S. Modulation of P2X7 Receptor during Inflammation in Multiple Sclerosis / S. Amadio, C. Parisi, E. Piras, P. Fabbrizio, S. Apolloni, C. Montilli, S. Luchetti, S. Ruggieri, C. Gasperini, F. Laghi-Pasini, L. Battistini, C. Volonté // Front Immunol. – 2017. – Vol. 8 -. – P. 1529.

234. Oliveira, J. F. Rodent cortical astroglia express in situ functional P2X7 receptors sensing pathologically high ATP concentrations / J. F. Oliveira, T. Riedel, A. Leichsenring, C. Heine, H. Franke, U. Krügel, W. Nörenberg, P. Illes // Cereb Cortex. – 2011. – Vol. 21 -  $N_{2}$  4. – P. 806-820.

235. Duan, S. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes / S. Duan, C. M. Anderson, E. C. Keung, Y. Chen, Y. Chen, R. A. Swanson // J Neurosci. – 2003. – Vol. 23 - № 4. – P. 1320-1328.

236. Suadicani, S. O. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca2+ signaling / S. O. Suadicani, C. F. Brosnan, E. Scemes // J Neurosci. – 2006. – Vol. 26 -  $N_{2}$  5. – P. 1378-1385.

237. Savio, L. E. B. The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon?
/ L. E. B. Savio, P. de Andrade Mello, C. G. da Silva, R. Coutinho-Silva // Front
Pharmacol. – 2018. – Vol. 9 -. – P. 52.

238. Di Virgilio, F. The Elusive P2X7 Macropore / F. Di Virgilio, G. Schmalzing, F. Markwardt // Trends Cell Biol. – 2018. – Vol. 28 - № 5. – P. 392-404.

239. Cisneros-Mejorado, A. J. P2X7 Receptors as a Therapeutic Target in Cerebrovascular Diseases / A. J. Cisneros-Mejorado, A. Pérez-Samartín, M. Domercq, R. O. Arellano, M. Gottlieb, F. Koch-Nolte, C. Matute // Front Mol Neurosci. – 2020. – Vol. 13 -. – P. 92.

240. Surprenant, A. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7) / A. Surprenant, F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North, G. Buell // Science. – 1996. – Vol. 272 - № 5262. – P. 735-738.

241. Rassendren, F. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA / F. Rassendren, G. N. Buell, C. Virginio, G. Collo, R. A. North, A. Surprenant // J Biol Chem. – 1997. – Vol. 272 - № 9. – P. 5482-5486.

242. North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors / R. A. North // Physiol Rev. – 2002. – Vol. 82 - № 4. – P. 1013-1067.

243. Donnelly-Roberts, D. L. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors / D. L. Donnelly-Roberts, M. T. Namovic, P. Han, M. F. Jarvis // Br J Pharmacol. – 2009. – Vol. 157 - № 7. – P. 1203-1214.

244. Jiang, L. H. Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors /
L. H. Jiang, A. B. Mackenzie, R. A. North, A. Surprenant // Mol Pharmacol. – 2000. –
Vol. 58 - № 1. – P. 82-88.

245. Di Virgilio, F. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation / F. Di Virgilio, D. Dal Ben, A. C. Sarti, A. L. Giuliani, S. Falzoni // Immunity. – 2017. – Vol. 47 - № 1. – P. 15-31.

246. Zhao, Y. F. Astrocytic and Oligodendrocytic P2X7 Receptors Determine Neuronal Functions in the CNS / Y. F. Zhao, Y. Tang, P. Illes // Front Mol Neurosci. – 2021. – Vol. 14 -. – P. 641570.

247. Swanson, K. V. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics / K. V. Swanson, M. Deng, J. P. Ting // Nat Rev Immunol. – 2019. – Vol. 19 -  $N_{2}$  8. – P. 477-489.

248. Facci, L. Toll-like receptors 2, -3 and -4 prime microglia but not astrocytes across central nervous system regions for ATP-dependent interleukin-1beta release / L. Facci, M. Barbierato, C. Marinelli, C. Argentini, S. D. Skaper, P. Giusti // Sci Rep. – 2014. – Vol. 4 -. – P. 6824.

249. Gustin, A. NLRP3 Inflammasome Is Expressed and Functional in Mouse Brain Microglia but Not in Astrocytes / A. Gustin, M. Kirchmeyer, E. Koncina, P. Felten, S. Losciuto, T. Heurtaux, A. Tardivel, P. Heuschling, C. Dostert // PLoS One. – 2015. – Vol. 10 -  $N_{0}$  6. – P. e0130624.

250. Bianco, F. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia / F. Bianco, E. Pravettoni, A. Colombo, U. Schenk, T. Moller, M. Matteoli, C. Verderio // J Immunol. – 2005. – Vol. 174 - № 11. – P. 7268-7277.

251. Choi, S. S. Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines /
S. S. Choi, H. J. Lee, I. Lim, J. Satoh, S. U. Kim // PLoS One. – 2014. – Vol. 9 - № 4. –
P. e92325.

252. Van Wagoner, N. J. Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor / N. J. Van Wagoner, J. W. Oh, P. Repovic, E. N. Benveniste // J Neurosci. – 1999. – Vol. 19 - № 13. – P. 5236-5244.

253. Lu, W. The P2X7 receptor links mechanical strain to cytokine IL-6 upregulation and release in neurons and astrocytes / W. Lu, F. Albalawi, J. M. Beckel, J. C. Lim, A. M. Laties, C. H. Mitchell // J Neurochem. – 2017. – Vol. 141 - № 3. – P. 436-448.

254. Xia, M. FOXO3a involvement in the release of TNF-alpha stimulated by ATP in spinal cord astrocytes / M. Xia, Y. Zhu // J Mol Neurosci. – 2013. – Vol. 51 - № 3. – P. 792-804.

255. Munoz, F. M. Reactive oxygen species play a role in P2X7 receptor-mediated
IL-6 production in spinal astrocytes / F. M. Munoz, P. A. Patel, X. Gao, Y. Mei, J. Xia,
S. Gilels, H. Hu // Purinergic Signal. – 2020. – Vol. 16 - № 1. – P. 97-107.

256. Panenka, W. P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase / W. Panenka, H. Jijon, L. M. Herx, J. N. Armstrong, D. Feighan, T. Wei, V. W. Yong, R. M. Ransohoff, B. A. MacVicar // J Neurosci. – 2001. – Vol. 21 - № 18. – P. 7135-7142.

257. Wei, W. Expression and function of the P2X(7) receptor in rat C6 glioma cells / W. Wei, J. K. Ryu, H. B. Choi, J. G. McLarnon // Cancer Lett. – 2008. – Vol. 260 - № 1-2. – P. 79-87.

258. Liu, J. S. Modulation of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha signaling by P2 purinergic receptors in human fetal astrocytes / J. S. Liu, G. R. John, A. Sikora, S. C. Lee, C. F. Brosnan // J Neurosci. – 2000. – Vol. 20 - № 14. – P. 5292-5299.

259. Kucher, B. M. Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes / B. M. Kucher, J. T. Neary // J Neurochem. – 2005. – Vol. 92 - № 3. – P. 525-535.

260. Adzic, M. Extracellular ATP induces graded reactive response of astrocytes and strengthens their antioxidative defense in vitro / M. Adzic, I. Stevanovic, N. Josipovic, D. Laketa, I. Lavrnja, I. M. Bjelobaba, I. Bozic, M. Jovanovic, M. Milosevic, N. Nedeljkovic // J Neurosci Res. – 2017. – Vol. 95 - № 4. – P. 1053-1066.

261. Abbracchio, M. P. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy / M. P. Abbracchio, G. Burnstock, J. M. Boeynaems, E. A. Barnard, J. L. Boyer, C. Kennedy, G. E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K. A. Jacobson, G. A. Weisman // Pharmacol Rev. – 2006. – Vol. 58 -  $N_{2}$  3. – P. 281-341.

262. Léon, C. Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y1 purinoceptor / C. Léon, C. Vial, J. P. Cazenave, C. Gachet // Gene. – 1996. – Vol. 171 - № 2. – P. 295-297.

263. Tokuyama, Y. Cloning of rat and mouse P2Y purinoceptors / Y. Tokuyama, M. Hara, E. M. Jones, Z. Fan, G. I. Bell // Biochem Biophys Res Commun. – 1995. – Vol. 211 - № 1. – P. 211-218.

264. Von Kügelgen, I. Molecular pharmacology of P2Y receptor subtypes / I. von Kügelgen // Biochem Pharmacol. – 2021. – Vol. 187 -. – P. 114361.

265. Moore, D. Regional and cellular distribution of the P2Y(1) purinergic receptor in the human brain: striking neuronal localisation / D. Moore, J. Chambers, H. Waldvogel, R. Faull, P. Emson // J Comp Neurol. – 2000. – Vol. 421 -  $N_{2}$  3. – P. 374-384.

266. Muller, M. S. ATP evokes Ca(2+) signals in cultured foetal human cortical astrocytes entirely through G protein-coupled P2Y receptors / M. S. Muller, C. W. Taylor // J Neurochem. – 2017. – Vol. 142 -  $N_{2}$  6. – P. 876-885.

267. Boucsein, C. Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro / C. Boucsein, R.

Zacharias, K. Färber, S. Pavlovic, U. K. Hanisch, H. Kettenmann // Eur J Neurosci. – 2003. – Vol. 17 - № 11. – P. 2267-2276.

268. Guzman, S. J. P2Y1 receptors inhibit long-term depression in the prefrontal cortex / S. J. Guzman, H. Schmidt, H. Franke, U. Krügel, J. Eilers, P. Illes, Z. Gerevich // Neuropharmacology. – 2010. – Vol. 59 - № 6. – P. 406-415.

269. Delekate, A. Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model / A. Delekate, M. Füchtemeier, T. Schumacher, C. Ulbrich, M. Foddis, G. C. Petzold // Nat Commun. – 2014. – Vol. 5 -. – P. 5422.

270. Choo, A. M. Antagonism of purinergic signalling improves recovery from traumatic brain injury / A. M. Choo, W. J. Miller, Y. C. Chen, P. Nibley, T. P. Patel, C. Goletiani, B. Morrison, 3rd, M. K. Kutzing, B. L. Firestein, J. Y. Sul, P. G. Haydon, D. F. Meaney // Brain. – 2013. – Vol. 136 - № Pt 1. – P. 65-80.

271. Förster, D. Supportive or detrimental roles of P2Y receptors in brain pathology?--The two faces of P2Y receptors in stroke and neurodegeneration detected in neural cell and in animal model studies / D. Förster, G. Reiser // Purinergic Signal. – 2015. – Vol. 11 -  $N_{2}$  4. – P. 441-454.

272. Reichenbach, N. P2Y1 receptor blockade normalizes network dysfunction and cognition in an Alzheimer's disease model / N. Reichenbach, A. Delekate, B. Breithausen, K. Keppler, S. Poll, T. Schulte, J. Peter, M. Plescher, J. N. Hansen, N. Blank, A. Keller, M. Fuhrmann, C. Henneberger, A. Halle, G. C. Petzold // J Exp Med.  $-2018. - Vol. 215 - N_{\odot} 6. - P. 1649-1663.$ 

273. Wellmann, M. Astroglial Ca(2+)-Dependent Hyperexcitability Requires P2Y(1) Purinergic Receptors and Pannexin-1 Channel Activation in a Chronic Model of Epilepsy / M. Wellmann, C. Álvarez-Ferradas, C. J. Maturana, J. C. Sáez, C. Bonansco // Front Cell Neurosci. – 2018. – Vol. 12 -. – P. 446.

274. Martorell, A. P2Y1 receptor inhibition rescues impaired synaptic plasticity and astroglial Ca(2+)-dependent activity in the epileptic hippocampus / A. Martorell, M. Wellmann, F. Guiffa, M. Fuenzalida, C. Bonansco // Neurobiol Dis. – 2020. – Vol. 146 -. – P. 105132.

275. Carmo, M. R. ATP P2Y1 receptors control cognitive deficits and neurotoxicity but not glial modifications induced by brain ischemia in mice / M. R. Carmo, A. P. Simões, A. A. Fonteles, C. M. Souza, R. A. Cunha, G. M. Andrade // Eur J Neurosci. – 2014. – Vol. 39 - № 4. – P. 614-622.

276. Shinozaki, Y. Cytoprotection against oxidative stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors / Y. Shinozaki, S. Koizumi, S. Ishida, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue // Glia. – 2005. – Vol. 49 -  $N_{2}$  2. – P. 288-300.

277. Talley Watts, L. Purinergic 2Y1 receptor stimulation decreases cerebral edema and reactive gliosis in a traumatic brain injury model / L. Talley Watts, S. Sprague, W. Zheng, R. J. Garling, D. Jimenez, M. Digicaylioglu, J. Lechleiter // J Neurotrauma. – 2013. – Vol. 30 - № 1. – P. 55-66.

278. Zheng, W. P2Y1R-initiated, IP3R-dependent stimulation of astrocyte mitochondrial metabolism reduces and partially reverses ischemic neuronal damage in mouse / W. Zheng, L. Talley Watts, D. M. Holstein, J. Wewer, J. D. Lechleiter // J Cereb Blood Flow Metab. – 2013. – Vol. 33 -  $N_{2}$  4. – P. 600-611.

279. Förster, D. Nucleotides protect rat brain astrocytes against hydrogen peroxide toxicity and induce antioxidant defense via P2Y receptors / D. Förster, G. Reiser // Neurochem Int. – 2016. – Vol. 94 -. – P. 57-66.

280. Fukumoto, Y. Neuroprotective effects of microglial P2Y(1) receptors against ischemic neuronal injury / Y. Fukumoto, K. F. Tanaka, B. Parajuli, K. Shibata, H. Yoshioka, K. Kanemaru, C. Gachet, K. Ikenaka, S. Koizumi, H. Kinouchi // J Cereb Blood Flow Metab. – 2019. – Vol. 39 - № 11. – P. 2144-2156.

281. Zheng, W. Purinergic receptor stimulation reduces cytotoxic edema and brain infarcts in mouse induced by photothrombosis by energizing glial mitochondria / W. Zheng, L. T. Watts, D. M. Holstein, S. I. Prajapati, C. Keller, E. H. Grass, C. A. Walter, J. D. Lechleiter // PLoS One. – 2010. – Vol. 5 - № 12. – P. e14401.

282. Fujita, T. P2Y1 receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures / T. Fujita, H. Tozaki-Saitoh, K. Inoue // Glia. – 2009. – Vol. 57 -  $N_{2}$  3. – P. 244-257.

283. Chen, W. C. ATP-induced arachidonic acid release in cultured astrocytes is mediated by Gi protein coupled P2Y1 and P2Y2 receptors / W. C. Chen, C. C. Chen // Glia. – 1998. – Vol. 22 -  $N_{2}$  4. – P. 360-370.

284. Xia, M. Signaling pathways of ATP-induced PGE2 release in spinal cord astrocytes are EGFR transactivation-dependent / M. Xia, Y. Zhu // Glia. – 2011. – Vol. 59 -  $N_{2}$  4. – P. 664-674.

285. Noguchi, Y. Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y(1) receptor-mediated pathways in astrocytes / Y. Noguchi, Y. Shinozaki, K. Fujishita, K. Shibata, Y. Imura, Y. Morizawa, C. Gachet, S. Koizumi // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 -  $N_{2}$  2. – P. e57898.

286. Zhu, Y. Developmental expression of metabotropic P2Y(1) and P2Y(2) receptors in freshly isolated astrocytes from rat hippocampus / Y. Zhu, H. K. Kimelberg // J Neurochem. -2001. - Vol. 77 - N 2. - P. 530-541.

287. Carrasquero, L. M. Mechanisms of protein kinase D activation in response to P2Y(2) and P2X7 receptors in primary astrocytes / L. M. Carrasquero, E. G. Delicado, L. Sánchez-Ruiloba, T. Iglesias, M. T. Miras-Portugal // Glia. – 2010. – Vol. 58 - № 8. – P. 984-995.

288. Gallagher, C. J. Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors / C. J. Gallagher, M. W. Salter // J Neurosci. – 2003. – Vol. 23 - № 17. – P. 6728-6739.

289. Burgos, M. P2Y2 nucleotide receptors inhibit trauma-induced death of astrocytic cells / M. Burgos, J. T. Neary, F. A. González // J Neurochem. – 2007. – Vol. 103 - № 5. – P. 1785-1800.

290. John, G. R. IL-1beta differentially regulates calcium wave propagation between primary human fetal astrocytes via pathways involving P2 receptors and gap junction channels / G. R. John, E. Scemes, S. O. Suadicani, J. S. Liu, P. C. Charles, S. C. Lee, D. C. Spray, C. F. Brosnan // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1999. – Vol. 96 - № 20. – P. 11613-11618.

291. Rodríguez-Zayas, A. E. P2Y2 receptor expression is altered in rats after spinal cord injury / A. E. Rodríguez-Zayas, A. I. Torrado, J. D. Miranda // Int J Dev Neurosci.
2010. – Vol. 28 - № 6. – P. 413-421.

292. D'Alimonte, I. Activation of P2X(7) receptors stimulates the expression of P2Y(2) receptor mRNA in astrocytes cultured from rat brain / I. D'Alimonte, R. Ciccarelli, P. Di Iorio, E. Nargi, S. Buccella, P. Giuliani, M. P. Rathbone, S. Jiang, F. Caciagli, P. Ballerini // Int J Immunopathol Pharmacol. – 2007. – Vol. 20 -  $N_{2}$  2. – P. 301-316.

293. Stella, N. Interleukin-1 enhances the ATP-evoked release of arachidonic acid from mouse astrocytes / N. Stella, A. Estelles, J. Siciliano, M. Tence, S. Desagher, D. Piomelli, J. Glowinski, J. Premont // J Neurosci. – 1997. – Vol. 17 - № 9. – P. 2939-2946.

294. Yamakuni, H. ATP induces leukemia inhibitory factor mRNA in cultured rat astrocytes / H. Yamakuni, N. Kawaguchi, Y. Ohtani, J. Nakamura, T. Katayama, T. Nakagawa, M. Minami, M. Satoh // J Neuroimmunol. – 2002. – Vol. 129 - № 1-2. – P. 43-50.

295. Kennedy, C. ATP, an agonist at the rat P2Y(4) receptor, is an antagonist at the human P2Y(4) receptor / C. Kennedy, A. D. Qi, C. L. Herold, T. K. Harden, R. A. Nicholas // Mol Pharmacol. – 2000. – Vol. 57 -  $N_{2}$  5. – P. 926-931.

296. Amadio, S. Mapping P2X and P2Y receptor proteins in striatum and substantia nigra: An immunohistological study / S. Amadio, C. Montilli, B. Picconi, P. Calabresi, C. Volonté // Purinergic Signal. – 2007. – Vol. 3 - № 4. – P. 389-398.

297. Tran, M. D. P2 receptor stimulation induces amyloid precursor protein production and secretion in rat cortical astrocytes / M. D. Tran // Neurosci Lett. – 2011. – Vol. 492 - № 3. – P. 155-159.

298. Kim, S. G. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in astrocytes is prevented by the activation of P2Y6, but not P2Y4 nucleotide receptors / S. G. Kim, K. A. Soltysiak, Z. G. Gao, T. S. Chang, E. Chung, K. A. Jacobson // Biochem Pharmacol.  $-2003. - Vol. 65 - N_{2} 6. - P. 923-931.$ 

299. Kim, S. G. P2Y6 nucleotide receptor activates PKC to protect 1321N1 astrocytoma cells against tumor necrosis factor-induced apoptosis / S. G. Kim, Z. G. Gao, K. A. Soltysiak, T. S. Chang, C. Brodie, K. A. Jacobson // Cell Mol Neurobiol. – 2003. – Vol. 23 -  $N_{2}$  3. – P. 401-418.

300. Kim, B. Uridine 5'-diphosphate induces chemokine expression in microglia and astrocytes through activation of the P2Y6 receptor / B. Kim, H. K. Jeong, J. H. Kim, S. Y. Lee, I. Jou, E. H. Joe // J Immunol. – 2011. – Vol. 186 - № 6. – P. 3701-3709.

301. Warny, M. P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide / M. Warny, S. Aboudola, S. C. Robson, J. Sévigny, D. Communi, S. P. Soltoff, C. P. Kelly // J Biol Chem. – 2001. – Vol. 276 - № 28. – P. 26051-26056.

302. Cox, M. A. The pyrimidinergic P2Y6 receptor mediates a novel release of proinflammatory cytokines and chemokines in monocytic cells stimulated with UDP / M. A. Cox, B. Gomes, K. Palmer, K. Du, M. Wiekowski, B. Wilburn, M. Petro, C. C. Chou, C. Desquitado, M. Schwarz, C. Lunn, D. Lundell, S. K. Narula, P. J. Zavodny, C. H. Jenh // Biochem Biophys Res Commun. – 2005. – Vol. 330 - № 2. – P. 467-473.

303. Communi, D. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase / D. Communi, C. Govaerts, M. Parmentier, J. M. Boeynaems // J Biol Chem. – 1997. – Vol. 272 - № 51. – P. 31969-31973.

304. Barragán-Iglesias, P. Role of spinal P2Y6 and P2Y11 receptors in neuropathic pain in rats: possible involvement of glial cells / P. Barragán-Iglesias, J. B. Pineda-Farias, C. Cervantes-Durán, M. Bravo-Hernández, H. I. Rocha-González, J. Murbartián, V. Granados-Soto // Mol Pain. – 2014. – Vol. 10 -. – P. 29.

305. Amadio, S. P2Y(12) receptor on the verge of a neuroinflammatory breakdown / S. Amadio, C. Parisi, C. Montilli, A. S. Carrubba, S. Apolloni, C. Volonté // Mediators Inflamm. – 2014. – Vol. 2014 -. – P. 975849.

306. Domercq, M. Purinergic receptors in multiple sclerosis pathogenesis / M. Domercq, A. Zabala, C. Matute // Brain Res Bull. – 2019. – Vol. 151 -. – P. 38-45.

307. Quintas, C. Opposite modulation of astroglial proliferation by adenosine 5'-O-(2-thio)-diphosphate and 2-methylthioadenosine-5'-diphosphate: mechanisms involved / C. Quintas, S. Fraga, J. Gonçalves, G. Queiroz // Neuroscience. – 2011. – Vol. 182 -. – P. 32-42.

308. Mamedova, L. K. Regulation of death and survival in astrocytes by ADP activating P2Y1 and P2Y12 receptors / L. K. Mamedova, Z. G. Gao, K. A. Jacobson // Biochem Pharmacol. – 2006. – Vol. 72 -  $N_{2}$  8. – P. 1031-1041.

309. Communi, D. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i) / D. Communi, N. S. Gonzalez, M. Detheux, S. Brézillon, V. Lannoy, M. Parmentier, J. M. Boeynaems // J Biol Chem. – 2001. – Vol. 276 - № 44. – P. 41479-41485.

310. Carrasquero, L. M. P2X7 and P2Y13 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes / L. M. Carrasquero, E. G. Delicado, D. Bustillo, Y. Gutiérrez-Martín, A. R. Artalejo, M. T. Miras-Portugal // J Neurochem. – 2009. – Vol. 110 -  $N_{2}$  3. – P. 879-889.

311. Liu, G. Evolutionary History of the Toll-Like Receptor Gene Family across
Vertebrates / G. Liu, H. Zhang, C. Zhao, H. Zhang // Genome Biol Evol. – 2020. – Vol.
12 - № 1. – P. 3615-3634.

312. Botos, I. The structural biology of Toll-like receptors / I. Botos, D. M. Segal, D.
R. Davies // Structure. - 2011. - Vol. 19 - № 4. - P. 447-459.

313. Behzadi, P. Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology / P.
Behzadi, H. A. García-Perdomo, T. M. Karpiński // J Immunol Res. – 2021. – Vol. 2021
-. – P. 9914854.

314. Nie, L. Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals / L. Nie, S. Y. Cai, J. Z. Shao, J. Chen // Front Immunol. – 2018. – Vol. 9 -. – P. 1523.

315. Aluri, J. Toll-Like Receptor Signaling in the Establishment and Function of the Immune System / J. Aluri, M. A. Cooper, L. G. Schuettpelz // Cells. – 2021. – Vol. 10 -  $N_{2}$  6.

316. Akira, S. Toll-like receptor signalling / S. Akira, K. Takeda // Nat Rev Immunol.
2004. – Vol. 4 - № 7. – P. 499-511.

317. Soares, J. B. The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases / J. B. Soares, P. Pimentel-Nunes, R. Roncon-Albuquerque, A. Leite-Moreira // Hepatol Int. – 2010. – Vol. 4 -  $N_{2}$  4. – P. 659-672.

318. Yang, C. C. Lipopolysaccharide-Induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression Associated with Cell Migration in Rat Brain Astrocytes / C. C. Yang, C. C. Lin, L. D. Hsiao, J. M. Kuo, H. C. Tseng, C. M. Yang // Int J Mol Sci. – 2019. – Vol. 21 - N 1.

319. Rodgers, K. R. Innate Immune Functions of Astrocytes are Dependent Upon Tumor Necrosis Factor-Alpha / K. R. Rodgers, Y. Lin, T. J. Langan, Y. Iwakura, R. C. Chou // Sci Rep. – 2020. – Vol. 10 - № 1. – P. 7047.

320. Lana, D. Alterations in the Interplay between Neurons, Astrocytes and Microglia in the Rat Dentate Gyrus in Experimental Models of Neurodegeneration / D. Lana, F. Ugolini, D. Nosi, G. L. Wenk, M. G. Giovannini // Front Aging Neurosci. – 2017. – Vol. 9 -. – P. 296.

321. Chistyakov, D. V. Sex-Mediated Differences in LPS Induced Alterations of TNF $\alpha$ , IL-10 Expression, and Prostaglandin Synthesis in Primary Astrocytes / D. V. Chistyakov, N. V. Azbukina, A. A. Astakhova, S. V. Goriainov, V. V. Chistyakov, M. G. Sergeeva // Int J Mol Sci. – 2018. – Vol. 19 - No 9.

322. Chistyakov, D. V. Cellular Model of Endotoxin Tolerance in Astrocytes: Role of Interleukin 10 and Oxylipins / D. V. Chistyakov, A. A. Astakhova, N. V. Azbukina, S. V. Goriainov, V. V. Chistyakov, M. G. Sergeeva // Cells. – 2019. – Vol. 8 - № 12.

323. Moriyama, M. Zinc Potentiates Lipopolysaccharide-induced Nitric Oxide Production in Cultured Primary Rat Astrocytes / M. Moriyama, S. Fujitsuka, K. Kawabe, K. Takano, Y. Nakamura // Neurochem Res. – 2018. – Vol. 43 - № 2. – P. 363-374.

324. Ko, H. M. Tyrosine kinase Fyn regulates iNOS expression in LPS-stimulated astrocytes via modulation of ERK phosphorylation / H. M. Ko, S. H. Lee, M. Bang, K. C. Kim, S. J. Jeon, Y. M. Park, S. H. Han, H. Y. Kim, J. Lee, C. Y. Shin // Biochem Biophys Res Commun. – 2018. – Vol. 495 - № 1. – P. 1214-1220.

325. Vizuete, A. F. K. Arundic acid (ONO-2526) inhibits stimulated-S100B secretion in inflammatory conditions / A. F. K. Vizuete, J. de Lima Cordeiro, J. D. Neves, M. Seady, L. K. Grun, F. M. Barbé-Tuana, M. C. Leite, C. A. Netto, C. A. Gonçalves // Neurosci Lett. – 2021. – Vol. 751 -. – P. 135776.

326. Sangaran, P. G. LPS Preconditioning Attenuates Apoptosis Mechanism by Inhibiting NF-κB and Caspase-3 Activity: TLR4 Pre-activation in the Signaling Pathway of LPS-Induced Neuroprotection / P. G. Sangaran, Z. A. Ibrahim, Z. Chik, Z. Mohamed, A. Ahmadiani // Mol Neurobiol. – 2021. – Vol. 58 - № 5. – P. 2407-2422.

327. 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. – Vol. 30 - № 5-6. – Р. 387-397.

328. Niego, B. Thrombin-induced activation of astrocytes in mixed rat hippocampal cultures is inhibited by soluble thrombomodulin / B. Niego, A. L. Samson, K. U. Petersen, R. L. Medcalf // Brain Res. – 2011. – Vol. 1381 -. – P. 38-51.

329. Tasca, C. I. In vitro oxygen-glucose deprivation to study ischemic cell death / C.
I. Tasca, T. Dal-Cim, H. Cimarosti // Methods Mol Biol. – 2015. – Vol. 1254 -. – P.
197-210.

330. Ignarro, L. J. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine / L. J. Ignarro, J. M. Fukuto, J. M. Griscavage, N. E. Rogers, R. E. Byrns // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1993. – Vol. 90 -  $N_{2}$  17. – P. 8103-8107.

331. Bryan, N. S. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples / N. S. Bryan, M. B. Grisham // Free Radic Biol Med. – 2007. – Vol. 43 - № 5. – P. 645-657.

332. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR / M. W. Pfaffl // Nucleic Acids Res. – 2001. – Vol. 29 - № 9. – P. e45.

333. Wilson, C. L. Astrogliosis in a dish: substrate stiffness induces astrogliosis in primary rat astrocytes / C. L. Wilson, S. L. Hayward, S. Kidambi // RSC Adv. – 2016. – Vol. 6 -  $N_{2}$  41. – P. 34447-34457.

334. Cotrina, M. L. Cytoskeletal assembly and ATP release regulate astrocytic calcium signaling / M. L. Cotrina, J. H. Lin, M. Nedergaard // J Neurosci. – 1998. – Vol. 18 - № 21. – P. 8794-8804.

335. Pellegrin, S. Actin stress fibres / S. Pellegrin, H. Mellor // J Cell Sci. – 2007. – Vol. 120 - № Pt 20. – P. 3491-3499.

336. Shirakawa, H. Transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) mediates thrombin-induced astrocyte activation and upregulates its own expression in cortical astrocytes / H. Shirakawa, S. Sakimoto, K. Nakao, A. Sugishita, M. Konno, S. Iida, A. Kusano, E. Hashimoto, T. Nakagawa, S. Kaneko // J Neurosci. – 2010. – Vol. 30 - № 39. – P. 13116-13129.

337. Sorensen, S. D. Common signaling pathways link activation of murine PAR-1, LPA, and S1P receptors to proliferation of astrocytes / S. D. Sorensen, O. Nicole, R. D. Peavy, L. M. Montoya, C. J. Lee, T. J. Murphy, S. F. Traynelis, J. R. Hepler // Mol Pharmacol. – 2003. – Vol. 64 -  $N_{2}$  5. – P. 1199-1209.

338. Citro, S. Phospholipase Cepsilon is a nexus for Rho and Rap-mediated G protein-coupled receptor-induced astrocyte proliferation / S. Citro, S. Malik, E. A. Oestreich, J. Radeff-Huang, G. G. Kelley, A. V. Smrcka, J. H. Brown // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – Vol. 104 -  $N_{2}$  39. – P. 15543-15548.

339. Brozzi, F. S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH / F. Brozzi, C. Arcuri, I. Giambanco, R. Donato // J Biol Chem. – 2009. – Vol. 284 - № 13. – P. 8797-8811.

340. Sharma, J. N. Role of nitric oxide in inflammatory diseases / J. N. Sharma, A. Al-Omran, S. S. Parvathy // Inflammopharmacology. – 2007. – Vol. 15 - № 6. – P. 252-259.

341. Buskila, Y. Rapid and reactive nitric oxide production by astrocytes in mouse neocortical slices / Y. Buskila, S. Farkash, M. Hershfinkel, Y. Amitai // Glia. – 2005. – Vol. 52 -  $N_{2}$  3. – P. 169-176.

342. Salas, E. Purinergic P2X7 receptors mediate cell death in mouse cerebellar astrocytes in culture / E. Salas, L. M. Carrasquero, L. A. Olivos-Ore, D. Bustillo, A. R.

Artalejo, M. T. Miras-Portugal, E. G. Delicado // J Pharmacol Exp Ther. – 2013. – Vol. 347 - № 3. – P. 802-815.

343. Förstermann, U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Förstermann, W. C. Sessa // Eur Heart J. – 2012. – Vol. 33 - № 7. – P. 829-837, 837a-837d.

344. Togashi, H. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression / H. Togashi, M. Sasaki, E. Frohman, E. Taira, R. R. Ratan, T. M. Dawson, V. L. Dawson // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1997. – Vol. 94 -  $N_{\rm P}$  6. – P. 2676-2680.

345. Saha, R. N. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes / R.
N. Saha, K. Pahan // Neurochem Int. – 2006. – Vol. 49 - № 2. – P. 154-163.

346. Ohnishi, T. Translocation of neuronal nitric oxide synthase to the plasma membrane by ATP is mediated by P2X and P2Y receptors / T. Ohnishi, S. Matsumura, S. Ito // Mol Pain. -2009. - Vol. 5 - - P. 40.

347. Iwase, K. Induction of endothelial nitric-oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment / K. Iwase, K. Miyanaka, A. Shimizu, A. Nagasaki, T. Gotoh, M. Mori, M. Takiguchi // J Biol Chem. – 2000. – Vol. 275 - № 16. – P. 11929-11933.

348. Muñoz, M. F. Control of the neurovascular coupling by nitric oxide-dependent regulation of astrocytic Ca2+ signaling / M. F. Muñoz, M. Puebla, X. F. Figueroa // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2015. – Vol. 9 -  $N_{2}$  59.

349. Wang, P. Lipopolysaccharide worsens the prognosis of experimental cerebral ischemia via interferon gamma-induced protein 10 recruit in the acute stage / P. Wang, J. Zhang, F. Guo, S. Wang, Y. Zhang, D. Li, H. Xu, H. Yang // BMC Neurosci. – 2019. – Vol. 20 - № 1. – P. 64.

350. Dusaban, S. S. Phospholipase C epsilon links G protein-coupled receptor activation to inflammatory astrocytic responses / S. S. Dusaban, N. H. Purcell, E. Rockenstein, E. Masliah, M. K. Cho, A. V. Smrcka, J. H. Brown // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – Vol. 110 - № 9. – P. 3609-3614.

351. Khodapasand, E. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? / E. Khodapasand, N. Jafarzadeh, F. Farrokhi, B. Kamalidehghan, M. Houshmand // Iran Biomed J. – 2015. – Vol. 19 - № 2. – P. 69-75.

352. Fletcher, J. I. Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot restrain Bax / J. I. Fletcher, S. Meusburger, C. J. Hawkins, D. T. Riglar, E. F. Lee, W. D. Fairlie, D. C. Huang, J. M. Adams // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2008. – Vol. 105 - № 47. – P. 18081-18087.

353. Franco, M. C. Nitration of Hsp90 induces cell death / M. C. Franco, Y. Ye, C.
A. Refakis, J. L. Feldman, A. L. Stokes, M. Basso, R. M. Melero Fernández de Mera,
N. A. Sparrow, N. Y. Calingasan, M. Kiaei, T. W. Rhoads, T. C. Ma, M. Grumet, S.
Barnes, M. F. Beal, J. S. Beckman, R. Mehl, A. G. Estévez // Proc Natl Acad Sci U S A.
- 2013. – Vol. 110 - № 12. – P. E1102-1111.

354. Lisi, L. The novel HSP90 inhibitor, PU-H71, suppresses glial cell activation but weakly affects clinical signs of EAE / L. Lisi, S. McGuire, A. Sharp, G. Chiosis, P. Navarra, D. L. Feinstein, C. Dello Russo // J Neuroimmunol. – 2013. – Vol. 255 -  $N_{2}$  1-2. – P. 1-7.

355. Gabay, C. Interleukin-6 and chronic inflammation / C. Gabay // Arthritis Res Ther. – 2006. – Vol. 8 Suppl 2 - № Suppl 2. – P. S3.

356. Bradley, J. R. TNF-mediated inflammatory disease / J. R. Bradley // J Pathol. – 2008. – Vol. 214 - № 2. – P. 149-160.

357. Zelová, H. TNF-α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances / H. Zelová, J. Hošek // Inflamm Res. – 2013. – Vol. 62 - № 7. – P. 641-651.

358. Liu, T. NF-κB signaling in inflammation / T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S. C. Sun // Signal Transduct Target Ther. – 2017. – Vol. 2 -. – P. 17023-.

359. Tarassishin, L. LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: role of CD14 / L. Tarassishin, H. S. Suh, S. C. Lee // Glia. – 2014. – Vol. 62 –  $N_{2}$  6. – P. 999-1013.

360. Giridharan, S. Mechanisms of NF- $\kappa$ B p65 and strategies for therapeutic manipulation / S. Giridharan, M. Srinivasan // J Inflamm Res. – 2018. – Vol. 11 -. – P. 407-419.

361. Sochocka, E. Cell death in primary cultures of mouse neurons and astrocytes during exposure to and 'recovery' from hypoxia, substrate deprivation and simulated ischemia / E. Sochocka, B. H. Juurlink, W. E. Code, V. Hertz, L. Peng, L. Hertz // Brain Res. – 1994. – Vol. 638 - № 1-2. – P. 21-28.

362. Huang, Q. Cell death pathways in astrocytes with a modified model of oxygenglucose deprivation / Q. Huang, R. Zhang, L. Zou, X. Cao, X. Chu // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 - № 4. – P. e61345.

363. Weerasinghe, P. Oncosis: an important non-apoptotic mode of cell death / P. Weerasinghe, L. M. Buja // Exp Mol Pathol. – 2012. – Vol. 93 - № 3. – P. 302-308.

364. Almeida, A. Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture / A. Almeida, M. Delgado-Esteban, J. P. Bolaños, J. M. Medina // J Neurochem. – 2002. – Vol. 81 - № 2. – P. 207-217.

365. Zhao, X. Knockdown of Ski decreased the reactive astrocytes proliferation in vitro induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation / X. Zhao, K. S. Zhou, Z. H. Li, W. Nan, J. Wang, Y. Y. Xia, H. H. Zhang // J Cell Biochem. – 2018. – Vol. 119 - № 6. – P. 4548-4558.

366. Shi, Y. Overexpression of Mitofusin2 decreased the reactive astrocytes proliferation in vitro induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation / Y. Shi, C. Yi, X. Li, J. Wang, F. Zhou, X. Chen // Neurosci Lett. – 2017. – Vol. 639 -. – P. 68-73.

367. García, P. S. Concentration-Dependent Dual Role of Thrombin in Protection of Cultured Rat Cortical Neurons / P. S. García, V. T. Ciavatta, J. A. Fidler, A. Woodbury, J. H. Levy, W. R. Tyor // Neurochem Res. – 2015. – Vol. 40 - № 11. – P. 2220-2229.

368. Lopez, J. J. Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets / J. J. Lopez, G. M. Salido, E. Gómez-Arteta, J. A. Rosado, J. A. Pariente // J Thromb Haemost. – 2007. – Vol. 5 - № 6. – P. 1283-1291.

369. Lopez, J. J. Thrombin induces activation and translocation of Bid, Bax and Bak to the mitochondria in human platelets / J. J. Lopez, G. M. Salido, J. A. Pariente, J. A. Rosado // J Thromb Haemost. – 2008. – Vol. 6 - № 10. – P. 1780-1788.

370. Meli, R. Thrombin and PAR-1 activating peptide increase iNOS expression in cytokine-stimulated C6 glioma cells / R. Meli, G. M. Raso, C. Cicala, E. Esposito, F. Fiorino, G. Cirino // J Neurochem. – 2001. – Vol. 79 - № 3. – P. 556-563.

371. Wang, Y. Protease-activated receptor-1 protects rat astrocytes from apoptotic cell death via JNK-mediated release of the chemokine GRO/CINC-1 / Y. Wang, W. Luo, R. Stricker, G. Reiser // J Neurochem. – 2006. – Vol. 98 -  $N_{2}$  4. – P. 1046-1060.

372. Wajant, H. TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages / H. Wajant, D. Siegmund // Front Cell Dev Biol. – 2019. – Vol. 7 -. – P. 91.

373. Young, C. N. A novel mechanism of autophagic cell death in dystrophic muscle regulated by P2RX7 receptor large-pore formation and HSP90 / C. N. Young, A. Sinadinos, A. Lefebvre, P. Chan, S. Arkle, D. Vaudry, D. C. Gorecki // Autophagy. – 2015. – Vol. 11 -  $N_{2}$  1. – P. 113-130.

374. Kong, Q. P2X(7) nucleotide receptors mediate caspase-8/9/3-dependent apoptosis in rat primary cortical neurons / Q. Kong, M. Wang, Z. Liao, J. M. Camden, S. Yu, A. Simonyi, G. Y. Sun, F. A. Gonzalez, L. Erb, C. I. Seye, G. A. Weisman // Purinergic Signal. – 2005. – Vol. 1 - № 4. – P. 337-347.

375. Gulbransen, B. D. Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis / B. D. Gulbransen, M. Bashashati, S. A. Hirota, X. Gui, J. A. Roberts, J. A. MacDonald, D. A. Muruve, D. M. McKay, P. L. Beck, G. M. Mawe, R. J. Thompson, K. A. Sharkey // Nat Med. – 2012. – Vol. 18 - № 4. – P. 600-604.

376. Kato, M. Stimulation of human fetal astrocyte proliferation by bacterial lipopolysaccharides and lipid A / M. Kato, K. Ohno, K. Takeshita, F. Herz // Acta Neuropathol. – 1991. – Vol. 82 -  $N_{2}$  5. – P. 384-388.

377. Fontana, A. Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells / A. Fontana, F. Kristensen, R. Dubs, D. Gemsa, E. Weber // J Immunol. – 1982. – Vol. 129 - № 6. – P. 2413-2419.

378. Zhang, D. Prostaglandin E2 released from activated microglia enhances astrocyte proliferation in vitro / D. Zhang, X. Hu, L. Qian, B. Wilson, C. Lee, P. Flood, R. Langenbach, J. S. Hong // Toxicol Appl Pharmacol. – 2009. – Vol. 238 - № 1. – P. 64-70.

379. Chistyakov, D. V. Inhibitor of Hyaluronic Acid Synthesis 4Methylumbelliferone as an Anti-Inflammatory Modulator of LPS-Mediated Astrocyte
Responses / D. V. Chistyakov, A. I. Nikolskaya, S. V. Goriainov, A. A. Astakhova, M.
G. Sergeeva // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21 - № 21.

380. Köller, H. Lipopolysaccharides and leukotriene B4 induce independently regulated electrophysiological and immunological responses in cultured astrocytes / H. Köller, W. Däubener, K. Pilz, M. Siebler // J Neuroimmunol. – 1994. – Vol. 55 - № 2. – P. 179-185.

381. Tu, Z. MiR-140/BDNF axis regulates normal human astrocyte proliferation and LPS-induced IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion / Z. Tu, Y. Li, Y. Dai, L. Li, G. Lv, I. Chen, B. Wang // Biomed Pharmacother. – 2017. – Vol. 91 -. – P. 899-905.