

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ

МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ имени Н.И.ПИРОГОВА

Медико-биологический факультет

На правах рукописи



Бабкина Ирина Игоревна

**УЧАСТИЕ АГОНИСТОВ PAR-1 В РЕГУЛЯЦИИ
НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ *in vitro***

Специальность – 03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н., доцент Горбачева Любовь Руфэлевна

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность темы и степень её разработанности	5
Цели и задачи исследования	7
Научная новизна исследования	8
Теоретическая и практическая значимость	8
Методология и методы исследования	9
Положения, выносимые на защиту	10
Степень достоверности данных	10
Апробация работы	10
Публикации	11
Личный вклад автора	11
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕАЗ-АГОНИСТОВ ПАР-1	12
1.1.1. ПАР: типы, особенности строения и функции	12
1.1.2. Структурно-функциональная характеристика тромбина	14
1.1.3. Структурно-функциональная характеристика протеина С и активированного протеина С (АПС)	22
1.2. ПАР-1 - ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ ПРИ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ В ОРГАНИЗМЕ	27
1.2.1. Регуляция агонистами ПАР-1 функций клеток мозга при воспалении и нейродегенерации	27
1.2.2. Смещённый агонизм – как механизм реализации ПАР-1-опосредованных эффектов	32
1.3. НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ: ИНДУКТОРЫ, УЧАСТНИКИ И МЕХАНИЗМЫ	39
1.3.1. Тучные клетки – ключевые участники воспаления и их роль в нейровоспалении	39
1.3.2. Взаимосвязь ключевых участников нейровоспаления: тучные клетки, глия и нейроны	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1. ОСНОВНЫЕ ПРЕПАРАТЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В РАБОТЕ	51
2.2. МЕТОДЫ	52
2.2.1. Выделение тучных клеток из брюшной полости крыс	52

2.2.2. Определение гистамина, секретируемого перитонеальными тучными клетками	52
2.2.3. Измерение секреции гистамина клетками линии RBL-2H3	53
2.2.4. Измерение секреции β -гексозаминидазы (БГА) клетками линии RBL-2H3	54
2.2.5. Биохимический метод оценки гибели клеток (МТТ-тест) и реагент WST-1	54
2.2.6. Оценка уровня некроза клеток по высвобождению лактатдегидрогеназы (LDH)	55
2.2.7. Иммуноцитохимическое окрашивание	55
2.2.8. Вестерн-блоттинг	56
2.2.9. Измерение внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)	57
2.2.10. Количественная оценка высвобождения $\text{TNF}\alpha$ и IL-6	57
2.2.11. Получение культуры гиппокампальных нейронов	58
2.2.12. Кокультивирование гиппокампальных нейронов и перитонеальных тучных клеток	59
2.2.13. Морфологическая оценка гибели нейронов	59
2.2.14. Клеточная культура RBL-2H3	59
2.2.15. Получение первичной культуры астроцитов крыс	60
2.3. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1. ВЛИЯНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА КЛЕТКИ-УЧАСТНИКИ ВОСПАЛЕНИЯ	62
3.1.1. Особенности провоспалительной активации тучных клеток	62
3.1.1.1. Влияние провоспалительных факторов на секреторную активность тучных клеток	62
3.1.1.2. Влияние провоспалительных факторов на выживаемость тучных клеток	64
3.1.1.3. Влияние провоспалительных факторов на кальциевый гомеостаз тучных клеток	65
3.1.1.4. Влияние провоспалительных факторов на изменение актинового цитоскелета тучных клеток	66
3.1.2. Особенности провоспалительной активации астроцитов	67
3.1.2.1. Влияние провоспалительных факторов на пролиферацию астроцитов	67
3.1.2.2. Влияние провоспалительных факторов на кальциевый гомеостаз астроцитов	70
3.1.3. Особенности провоспалительной активации нейронов	70
3.1.3.1. Влияние провоспалительных факторов на выживаемость нейронов	70

3.1.3.2. Влияние разных концентраций гистамина на кальциевый гемостаз в нейронах	74
3.1.3.3. Вклад NMDA в развитие глутаматной эксайтотоксичности.....	76
3.2. ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ ПАР-1 НА КЛЕТКИ-УЧАСТНИКИ ВОСПАЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ	78
3.2.1. Особенности влияния агонистов ПАР-1 на тучные клетки	78
3.2.1.1. Экспрессия ПАР-1, ЭРПС на клетках линии RBL-2H3	78
3.2.1.2. Влияние агонистов ПАР-1 на секрецию тучных клеток.....	79
3.2.1.3. Влияние агонистов ПАР-1 на выживаемость тучных клеток	84
3.2.1.4. Влияние агонистов ПАР-1 на кальциевый гомеостаз тучных клеток	87
3.2.1.5. Влияние агонистов ПАР-1 на изменение актинового цитоскелета тучных клеток.....	90
3.2.2. Особенности влияния агонистов ПАР-1 на астроциты	93
3.2.2.1. Экспрессия ПАР-1, ЭРПС на астроцитах.....	93
3.2.2.2. Влияние агонистов ПАР-1 на пролиферацию и выживаемость астроцитов в условии их активации провоспалительными факторами	93
3.2.2.3. Влияние агонистов ПАР-1 на секреторную активность астроцитов в условии их активации провоспалительными факторами	96
3.2.2.4. Влияние агонистов ПАР-1 на кальциевый гомеостаз астроцитов в условии их активации провоспалительными факторами	98
3.2.3. Особенности влияния агонистов ПАР-1 на нейроны	99
3.2.3.1. Экспрессия ПАР-1, ЭРПС на нейронах.....	99
3.2.3.2. Влияние агонистов ПАР-1 на выживаемость нейронов в условии их активации провоспалительными факторами	100
3.2.3.3. Влияние агонистов ПАР-1 на кальциевый гомеостаз нейронов в условии их активации провоспалительными факторами	105
3.3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК ПРИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИИ.....	107
3.3.1. Взаимодействие тучных клеток и нейронов в модели нейровоспаления.....	107
3.3.2. Взаимодействие тучных клеток и астроцитов в модели нейровоспаления.....	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	116
ВЫВОДЫ	120
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	124
БЛАГОДАРНОСТИ.....	155

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень её разработанности

Воспаление, являясь частью врожденного иммунитета, направлено на восстановление гомеостатических функций организма при повреждениях и инвазии патогенами. При этом, принимая хронический характер, воспаление выступает фактором, потенцирующим повреждающее воздействие.

Один из видов воспаления – нейровоспаление – является необходимым защитным физиологическим ответом ЦНС на травму или инфекционное заболевание [Ning et al., 2018]. Длительное нейровоспаление, выходящее за рамки физиологического контроля, вызывает запуск провоспалительных сигнальных каскадов, развитие окислительного стресса и энергетического дефицита, что приводит к гибели нейронов [Dong et al., 2014; DiSabato et al., 2016]. При этом развитие многих неврологических заболеваний, таких как нейродегенеративные, травматические, ишемические, метаболические, инфекционные, токсические и неопластические, сопряжено с запуском нейровоспаления в центральной нервной системе (ЦНС) [Solleiro-Villavicencio, Rivas-Arancibia, 2018]. Нейровоспаление является характерным признаком нейродегенеративных нарушений ЦНС при таких заболеваниях, как болезнь Паркинсона, Альцгеймера, рассеянный склероз и другие.

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), предупреждение и эффективное лечение нейродегенеративных заболеваний являются актуальной задачей современной медицины. Следовательно, нейровоспаление, как неотъемлемая часть нейродегенеративного процесса, может являться универсальной мишенью для терапии целого ряда заболеваний ЦНС. Однако, в настоящее время не вполне ясна роль разных типов клеток мозга в развитии этого сложного многофакторного процесса, что указывает на несомненную актуальность исследований механизмов нейровоспаления.

В развитие и разрешение процессов воспаления активно вовлекаются протеазы системы свертывания крови. В связи с этим, одной из фундаментальных проблем современной физиологии является понимание механизмов влияния протеаз гемостаза на ход воспалительных и репаративных процессов в тканях. В настоящее время появляется всё больше доказательств о вовлечении факторов свёртывания крови в развитие заболеваний ЦНС. Система свертывания крови и её протеазы одни из первых в организме осуществляют запуск сложной ответной реакции на повреждающее воздействие.

Например, увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) при критических состояниях приводит к появлению в нервной ткани таких сериновых протеаз, как активированный протеин С (АПС) и тромбин, у которых помимо протеолитической активности, проявляются свойства сигнальных молекул – клеточных регуляторов процессов воспаления, репарации тканей, нейрорепарации и нейродегенерации [Strukova et al., 2001; Esmon, 2005; Hollenberg, Houle, 2005; Strukova, 2006; Zlokovic, Griffin, 2011; McKelvey et al., 2014].

Согласно накопленным данным о сопряжении коагуляции и воспаления в головном мозге, ключевым моментом данного процесса выступает активация рецепторов, активируемых протеазами (ПАР), особенно выделяется роль рецептора, активируемого протеазами 1 типа (ПАР-1). Все 4 типа ПАР, известных на данный момент, были обнаружены в ЦНС. При этом экспрессия ПАР-1 преобладает в гиппокампе, миндалине и коре [Strigrow et al., 2002]. Высоко специфичным агонистом ПАР-1 является тромбин – полифункциональный фермент семейства сериновых протеаз, который участвует в регуляции гемостатического баланса, сосудистого тонуса, воспаления, репарации тканей, тромбообразования, атерогенеза, канцерогенеза и других физиологических и патофизиологических реакций организма [Fenton II, 1995; Coughlin, 1999; Strukova et al., 2001; Esmon, 2004].

В настоящее время тромбин рассматривают как регуляторный полифункциональный фактор физиологических и патофизиологических процессов. Важным аспектом действия тромбина является активация протеина С (ПС) в АПС, сериновую протеазу с противовоспалительным потенциалом.

АПС – мультифункциональная протеаза, участвующая в регуляции не только свертывания крови, но также воспаления и апоптоза, проявляя противовоспалительные и цитопротекторные свойства [Riewald et al., 2002]. В последнее время активно развивается представление о противовоспалительном и антиапоптотическом действии АПС на эндотелиальные клетки, моноциты, нейроны, астроциты и другие клетки, а также о его протекторном действии при системном воспалении и сепсисе [Jackson et al., 2009; Gorbacheva et al., 2010; Griffin et al., 2012]. Показано взаимодействие АПС с двумя мембранными рецепторами на эндотелии – эндотелиальным рецептором протеина С (ЭРПС) и ПАР-1 [Griffin et al., 2015].

Тромбин и АПС – основные протеазы гемостаза, выступают эндогенными специфическими агонистами ПАР. Также агонистами ПАР могут быть синтетические пептиды с аминокислотной последовательностью, аналогичной «привязанному лиганду», который образуется при расщеплении внеклеточного N-конца рецептора протеазой, что и

приводит к его активации [Струкова, 2004; Coughlin, 2005; Hollenberg, Houle, 2005; Steinhoff et al., 2005].

В лаборатории Мознера [Mosnier et al., 2012] на эндотелиальных клетках обнаружено, что разнонаправленное действие тромбина и АПС через один и тот же тип рецепторов – PAR-1 – может быть обусловлено смещённым агонизмом «biased agonism». При смещённом агонизме вместо канонического расщепления тромбином экзодомена PAR-1 по Arg41 идентифицировано АПС-специфическое неканоническое расщепление по Arg46 и освобождение неканонического пептида, «привязанного» лиганда с аминокислотной последовательностью, отличающейся от канонической (классической), освобождаемой тромбином. В результате внутриклеточная сигнализация, запускаемая АПС и тромбином через PAR-1, имеет разнонаправленный характер.

Таким образом, ключевые протеазы гемостаза и PAR могут вовлекаться в процессы нейродегенерации как участники нейровоспаления при ишемическом повреждении мозга и при ряде нейропатологий. В связи с этим, исследование механизмов участия агонистов PAR в регуляции функций тучных клеток, астроцитов и нейронов при развитии нейровоспаления представляется весьма актуальным и перспективным как для фундаментальной физиологии, так и для практической медицины. Поиск агонистов PAR – регуляторов воспаления – может быть одним из перспективных направлений для терапевтических стратегий ингибирования процессов воспаления и нейродегенерации.

Цели и задачи исследования

Цель данной работы – исследовать особенности влияния разных типов агонистов PAR-1 на развитие нейровоспаления *in vitro*.

В соответствии с поставленной целью сформулированы следующие **задачи**:

1. Изучить особенности влияния канонических и неканонических агонистов PAR-1 на функции основных участников нейровоспаления тучных клеток, астроцитов и нейронов крыс в условиях их стимуляции провоспалительными факторами.

2. Оценить роль канонической и неканонической активации PAR-1 в развитии глутамат-вызванной гибели нейронов. Определить рецепторный механизм действия нового пептида АП9 в данных условиях. Оценить вклад NMDA рецепторов в развитие глутаматной эксайтотоксичности.

3. Изучить влияние АП9 и АПС на выживаемость гиппокампальных нейронов в модели нейровоспаления *in vitro* при сокультивировании с тучными клетками, и установить роль PAR-1 для протекторного действия АП9.

4. Изучить влияние синтетического пептида АП9 на провоспалительную секрецию астроцитов и тучных клеток в модели нейровоспаления *in vitro*.

5. Проанализировать зависимость эффектов канонических и неканонических агонистов ПАР-1 от типа клеток-мишеней, типа повреждающего фактора и особенностей межклеточного взаимодействия при моделировании нейровоспаления *in vitro*.

Научная новизна исследования

В настоящей работе проведено комплексное исследование влияния агонистов ПАР-1 на клетки-участники нейровоспаления. Результаты проведенных исследований указывают на разнонаправленный характер влияния канонической (тромбином) и неканонической (активированным протеином С и пептидом АП9) активации ПАР-1 на функции тучных клеток, астроцитов и нейронов при нейровоспалении *in vitro*.

Впервые обнаружена возможность регуляции клеточных ответов на провоспалительные повреждающие стимулы новым синтетическим пептидом АП9, который выступает неканоническим агонистом ПАР-1. Продемонстрировано защитное действие пептида АП9 на тучные клетки, астроциты и нейроны, что проявляется в стабилизации основных показателей функционирования клеток (кальциевого гомеостаза, актинового цитоскелета, выживаемости, пролиферации и секреторной активности) при их провоспалительной активации. Выявлен рецепторный механизм протекторного действия пептида.

Полученные результаты демонстрируют возможность АПС-зависимой регуляции функций клеток RBL-2H3 через рецепторы ПАР-1 и ЭРПС, экспрессия которых впервые продемонстрирована в представленной работе.

Установленное в ходе исследования различие в ПАР-1-зависимых эффектах АПС и АП9 с одной стороны, и тромбина с другой, на клетки-участники нейровоспаления позволило впервые выявить механизм смещенного агонизма для активации ПАР-1 в условиях нейровоспаления.

Теоретическая и практическая значимость

Работа направлена на исследование участия канонических и неканонических агонистов ПАР-1 в регуляции нейровоспаления *in vitro*.

Воспаление является одной из основных причин повреждения мозга при ишемии. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) сердечно-сосудистые заболевания и инсульты занимают первое место в рейтинге летальных исходов в России. Ведётся активный поиск средств, обладающих противовоспалительными и

цитопротекторными свойствами, способных защищать клетки иммунной и нервной систем организма от гибели, ускорять регенерацию тканей и стабилизировать ГЭБ после повреждения [Griffin et al., 2015]. Более того, сопряжение процессов свертывания крови и нейровоспаления, которое в последние годы привлекает внимание исследователей, несомненно, имеет особое значение как при травматических, так и при ишемических повреждениях ткани мозга.

Полученные в данной работе результаты раскрывают механизмы регуляции клеточных функций протеазами гемостаза через ПАР-1 при нейровоспалении. Это обеспечит понимание особенностей сопряжения процессов свертывания и воспаления в нервной ткани и позволит расширить представление о функциях АПС и тромбина вне системы гемостаза.

Результаты данной работы указывают на возможность ПАР-1 опосредованной регуляции провоспалительной активации клеток мозга при моделировании нейровоспаления. Обнаруженные цитопротекторные и противовоспалительные свойства нового синтетического пептида АП9 и установленный рецепторный механизм его действия открывают новые направления поиска и разработки эффективных препаратов пептидной природы для лечения нейровоспаления.

Полученные в ходе работы результаты об агонистах ПАР-1, как регуляторах воспаления, в дальнейшем могут быть использованы при разработке стратегий терапии, направленной на подавление процессов нейровоспаления и нейродегенерации.

Методология и методы исследования

В представленной работе моделирование воспаления осуществляли путём активации клеток широким спектром провоспалительных факторов: ЛПС, TNF α , АТФ, глутамат, гистамин и др. Для оценки роли активации ПАР-1 клетки прединкубировали с агонистами ПАР-1 (тромбином, АПС, АП9). Результат провоспалительной активации клеток оценивали путём использования тестов на выживаемость (биохимический и морфологический методы), уровень секреции (биохимический метод), уровень цитозольного кальция (флуоресцентная микроскопия) и состояние актинового цитоскелета (флуоресцентная микроскопия). Оценку влияния активированных провоспалительными факторами ТК на первичную культуру нейронов осуществляли путем их совместного сокультивирования. Исследование взаимного влияния астроцитов и ТК в условии провоспалительной активации осуществляли с использованием системы Transwell, где культивирование клеток производили на разных поверхностях при беспрепятственной циркуляции клеточной среды в этих ёмкостях.

Положения, выносимые на защиту

1. Активация ПАР-1 приводит к изменению функций клеток, вовлеченных в нейровоспаление. Направленность эффектов зависит от типа агониста ПАР-1 (канонический или неканонический).

2. Новый 9-ти членный синтетический пептид-агонист ПАР-1 (АП9), подобно активированному протеину С, оказывает противовоспалительное и нейропротекторное действие на активированные провоспалительными факторами тучные клетки, астроциты и нейроны крыс *in vitro*.

3. ПАР-1 активация модулирует гибель нейронов при глутаматной эксайтотоксичности в культуре. Неканоническая активация рецептора снижает, а каноническая потенцирует гибель нейронов при токсичности, вызванной глутаматом.

4. Неканонические агонисты ПАР-1 защищают клетки при индукции нейровоспаления *in vitro* как при сокультивировании нейронов гиппокампа с активированными тучными клетками, так и при совместном культивировании астроцитов и тучных клеток.

Степень достоверности данных

Представленные в работе данные получены с использованием современных общепринятых экспериментальных методик и соответствуют поставленным задачам. Результаты, представленные в диссертационной работе, статистически достоверны и воспроизводимы. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальной тематической литературы.

Апробация работы

Результаты данной работы представлены на X Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», (Пушино, Россия, 2019); 10th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair (Радебойль, Германия, 2018); Объединенном международном конгрессе «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis совместно с 9-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии», (Санкт-Петербург, Россия, 2018); 12th International Scientific Conference on Bioorganic Chemistry devoted to the Memory of Professor Ovchinnikov/VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды», (Москва, Россия, 2017); XXVIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), (Берлин, Германия, 2017); XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, (Москва, Россия, 2016);

XXVth Congress ISTH (Торонто, Канада, 2015); Нейронаука для медицины и психологии: XI Международный междисциплинарный конгресс, (Судак, Крым, 2015); XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2015», (Москва, Россия 2015); XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014», (Москва, Россия, 2014).

Публикации

По результатам работы опубликовано 23 печатные работы, в том числе 3 статьи и 7 тезисов в периодических изданиях, индексируемых базами Web of Science и Scopus и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 – физиология, и 13 тезисов в сборниках докладов международных и всероссийских конференций.

Личный вклад автора

Личный вклад автора присутствует на каждом этапе выполнения диссертационной работы: планирование экспериментов, выбор адекватных методических подходов, проведение экспериментов, статистическая обработка и обобщение результатов, написание статей и тезисов, представление результатов работы на российских и международных конференциях.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕАЗ-АГОНИСТОВ ПАР-1

1.1.1. ПАР: типы, особенности строения и функции

Действие тромбина и АПС на клетки опосредовано их взаимодействием с особым классом рецепторов – рецепторами, активируемыми протеазами (ПАР).

Все представители ПАР – интегральные мембранные рецепторы, сопряженные с G-белками. Характерная особенность ПАР заключается в том, что они служат высокоспецифичными субстратами регуляторных протеаз, которые расщепляют одну пептидную связь во внеклеточном домене. Новый N-концевой участок рецептора, называемый «привязанным лигандом», взаимодействует со второй внеклеточной петлей рецептора и активирует его (Рисунок 1). К настоящему моменту известны четыре члена семейства ПАР: ПАР-1, -3 и -4, рецепторы тромбина, и ПАР-2 – рецептор фактора Ха, фактора VIIa, трипсина и триптазы тучных клеток и др. [Strukova, 2001].

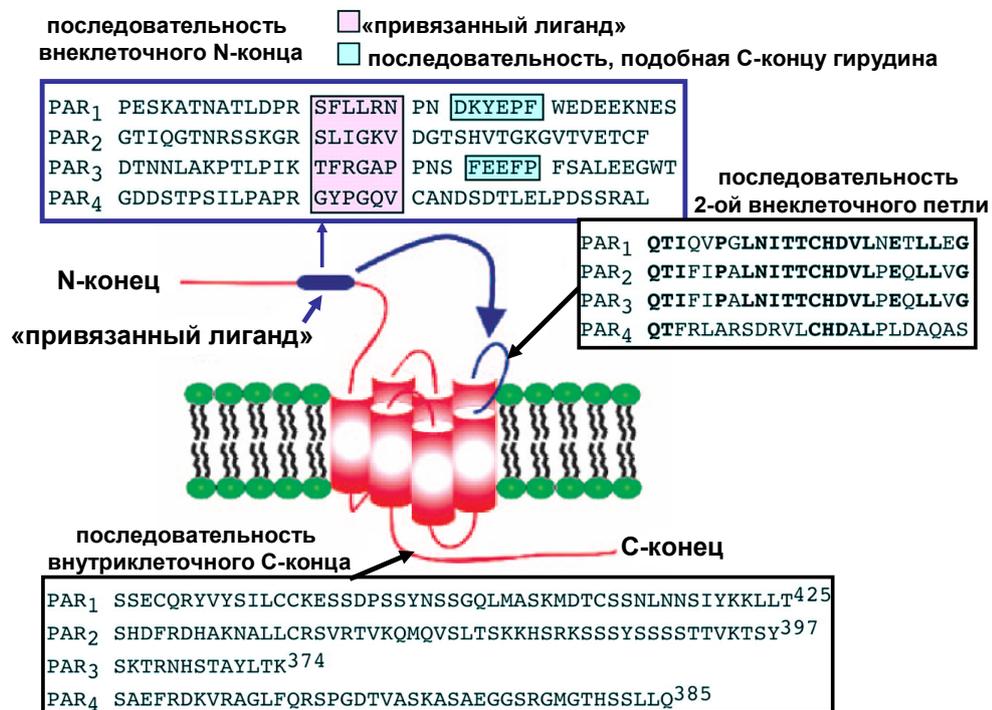


Рисунок 1. Структура и классическая схема активации ПАР [Steinhoff et al., 2005; с изменениями].

Экспрессия рецепторов ПАР возрастает в участках повреждения сосуда, воспаления, в микроокружении опухоли. В норме высокий уровень экспрессии ПАР наблюдается в основных защитных тканях организма – эпителии и эндотелии сосудов. Активация ПАР инициирует ряд механизмов передачи сигнала, конечным результатом которого может быть активация факторов транскрипции, регулирующих экспрессию тканевого фактора, адгезивных белков, цитокинов и других лигандов [Дугина и др., 2002; Steinhoff et al., 2005].

Экспрессия ПАР-1 и ПАР-2 показана во всех тканях крысы, ПАР-3 – в матке, селезёнке, почках, печени, легких, мозге и сердце, ПАР-4 – в матке, селезёнке и лёгких [Striggow et al., 2002; Olanas et al., 2007].

Достаточно подробно изучена локализация ПАР в разных отделах мозга. ПАР-1 широко распространен в гиппокампе, особенно в пирамидальных клеточных слоях области СА2 и СА3, а также в коре, таламусе, гипоталамусе, стриатуме и миндалине. Обильная экспрессия ПАР-2 и ПАР-3 показана во всех слоях коры, гиппокампе, медиальном габенулярном ядре, центральной миндалине, вентральном таламусе, гипоталамусе и стриатуме [Striggow et al., 2002]. Аналогично, паттерн экспрессии ПАР-4 в мозге крысы является доминирующим в гиппокампе, всех слоях коры, таламусе, гипоталамусе и миндалине [Striggow et al., 2002]. Экспрессия четырех типов ПАР далее обнаруживается в разнообразных нервных клетках, включая нейроны, астроциты, олигодендроциты и микроглию.

ПАР-1 обладает наибольшим сродством к тромбину, но он также активируется плазмином, активированным белком С, гранзимом А, MMP-1 [Adams et al., 2011] и калликреинами [Vandell et al., 2008; Burda et al., 2013; Yoon et al., 2013]. Однако, необходимо отметить, что аффинность ПАР-1 к тромбину существенно выше, чем у других протеаз [Ludeman et al., 2005; Rezaie, 2010; Chapman, 2013]. ПАР-1-зависимая сигнализация – важный транслятор внеклеточного протеолитического расщепления в клеточные реакции, которые сопровождают такие процессы, как повреждение тканей, ремоделирование и регенерацию. Активация ПАР-1 запускается при нарушении стенки сосудов [Smith-Swintosky et al., 1995; Smirnova et al., 1998; Chen et al., 2010; Liu et al., 2010], нейротоксичности [Smith-Swintosky et al., 1995; Smirnova et al., 1998; Citron et al., 2000; Festoff et al., 2000; Striggow et al., 2000; Olson et al., 2004; Acharjee et al., 2011; Chen et al., 2012; Yoon et al., 2013], активации микроглии [Nishino et al., 1993; Taoka et al., 2000; Xue, Del Bigio, 2001; Suo et al., 2002], астроглиозе [Nishino et al., 1993; Wang et al., 2002; Sorensen et al., 2003; Olson et al., 2004;

Nicole et al., 2005; Vandell et al., 2008], при миелинизации [Yoon et al., 2015] и демиелинизации [Burda et al., 2013].

ПАР-1 является основным эффектором передачи сигналов тромбина в большинстве типов клеток, включая эндотелиальные клетки. Однако ПАР-2, ПАР-3 и ПАР-4 часто коэкспрессируются с ПАР-1 в эндотелиальных клетках и могут влиять на активированную тромбином передачу сигналов ПАР-1 [Grimsey, Trejo, 2016].

Конечным результатом активации ПАР-1 тромбином может быть активация факторов транскрипции, ответственных за регуляцию экспрессии тканевого фактора, адгезивных белков, факторов роста, цитокинов и др. Таким образом, взаимодействуя с ПАР-1, тромбин регулирует воспаление, с одной стороны, активируя эндотелиальные клетки, адгезию, повышая проницаемость эндотелия, а с другой стороны, участвуя в защите эндотелия от разрушения протеазным комплексом системы комплемента, а также блокируя адгезию моноцитов на эндотелии, агрегацию тромбоцитов через освобождение NO [Libby et al., 1997].

ПАР-2 – единственный подтип рецепторов ПАР, который не активируется тромбином непосредственно, т.к. в нём отсутствует ключевой Pro-остаток в позиции P2 слева от расщепляемой связи Arg-Ser (GTNRSSKGR/SLIGKV). ПАР-2 активируется другими, менее специфичными протеазами свёртывания фактора Ха и VIIa в комплексе с тканевым фактором [Camerer et al., 2000].

ПАР могут активироваться синтетическими пептидами, соответствующими по структуре привязанным лигандам рецепторов (SFLLRN для ПАР-1 человека и SFLLRN для ПАР-1 крысы). Такие пептиды-агонисты используются как инструмент для доказательства участия рецепторов в реализации действия протеаз на клетки [Mosnier et al., 2012; Griffin et al., 2015].

Для ПАР-3 показано, что он не активируется тромбином, но связывает фермент и функционирует как его кофактор, необходимый для расщепления и активации тромбином ПАР-4.

1.1.2. Структурно-функциональная характеристика тромбина

Тромбин – полифункциональный фермент семейства сериновых протеаз, который участвует в регуляции гемостатического баланса, сосудистого тонуса, воспаления, репарации тканей, тромбообразования, атерогенеза, канцерогенеза и других физиологических и патофизиологических реакциях организма [Cirino et al., 2000; Strukova et al., 2001].

Тромбин – гликопротеид с молекулярной массой 37 кДа. Молекула тромбина состоит из легкой А-цепи (49 а.о.) и тяжелой каталитической В-цепи (259 а.о.), соединённых дисульфидными связями. А-цепь влияет на конформацию и каталитическую активность В-цепи, содержащую активный центр фермента, триаду которого образуют Ser₂₀₅, His₄₃ и Asp₉₉ [Strukova et al., 2001; Колодзейская и др., 2008]. Кроме того, в В-цепи обнаружены протяжённые субстрат-связывающие сайты (домены узнавания) – так называемые «анион-связывающие экзосайты» (АВЕ), которые отвечают за высокую селективность тромбина в отборе субстратов и расщепляемых связей (Рисунок 2) [Stubbs, Bode, 1993; Strukova et al., 2001; Huntington, 2005; Bock et. al., 2007].

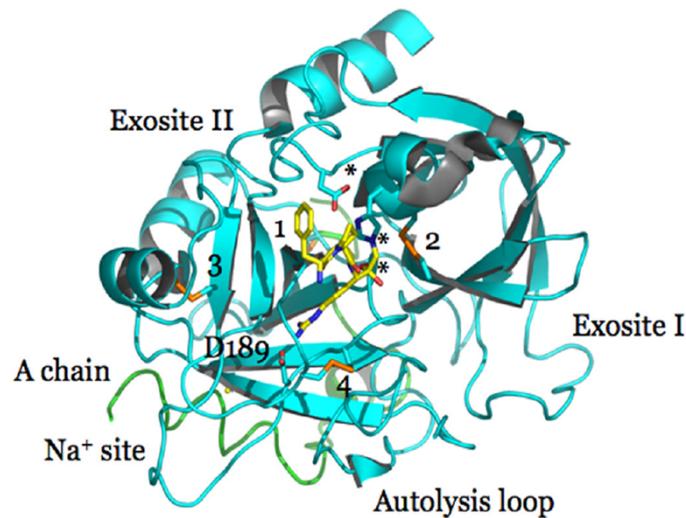


Рисунок 2. Структура тромбина в комплексе с ингибитором [Di Cera et al., 2007].

Функциональная активность тромбина может регулироваться путём связывания с ионом натрия. С помощью рентгеноструктурного анализа и сайт-направленного мутагенеза выявлены конформационные изменения, происходящие в молекуле тромбина при связывании иона Na⁺, которые приводят к повышению скорости расщепления фибриногена и других прокоагулянтных специфических субстратов и рецепторов. Быстрая форма связанного с Na⁺ тромбина взаимодействует с фибриногеном с высоким сродством и гидролизует его с более высокой скоростью, чем медленная. Медленная форма тромбина (свободного от Na⁺) более специфично активирует профермент протеин С в антикоагулянт – АПС. Аллостерические изменения конформации молекулы тромбина могут определять его прокоагулянтные или антикоагулянтные функции.

Тромбин образуется на поверхности активированных клеток, где при повреждении и воспалении экспонируется тканевой фактор (ТФ). Фактор VIIa в комплексе с тканевым фактором (ТФ/VIIa) запускает активацию свертывания крови. В 1ой фазе – инициации

свертывания – комплекс TF/VIIa активирует фактор X в фактор Xa, который стимулирует появление наномолярных концентраций тромбина. Тромбин (нМ) связывает тромбомодулин (ТМ) эндотелия, запускает активацию антикоагулянтной системы протеина С, активирует рецепторы PAR-1 тромбоцитов и эндотелия, факторы V и VIII свертывания крови в активные формы (Va и VIIIa – кофакторы факторов Xa и IXa). Во 2ой фазе – распространения свертывания – TF/VIIa активирует фактор IX на мембране активированных тромбоцитов, микрочастиц, эндотелия. Комплекс фактора IXa с кофактором VIIIa, Ca²⁺ и фосфолипидами (тенназа) активирует фактор X в форму Xa. Комплекс фактора Xa с кофактором Va, Ca²⁺ и фосфолипидами (протромбиназа) превращает протромбин в тромбин (>нМ). Тромбин (>нМ) активирует рецептор PAR-4 тромбоцитов, фактор XI в XIa, который превращает фактор IX в IXa. Тромбин запускает процесс образования фибрина из фибриногена. Тромбин активирует фактор XIII в XIIIa, стабилизирующий полимеры фибрина ковалентными связями. Тромбин в комплексе с ТМ активирует TAFI (ингибитор фибринолиза, активируемый тромбином) в карбоксипептидазу В – TAFIa (Рисунок 3) [Струкова, 2013].

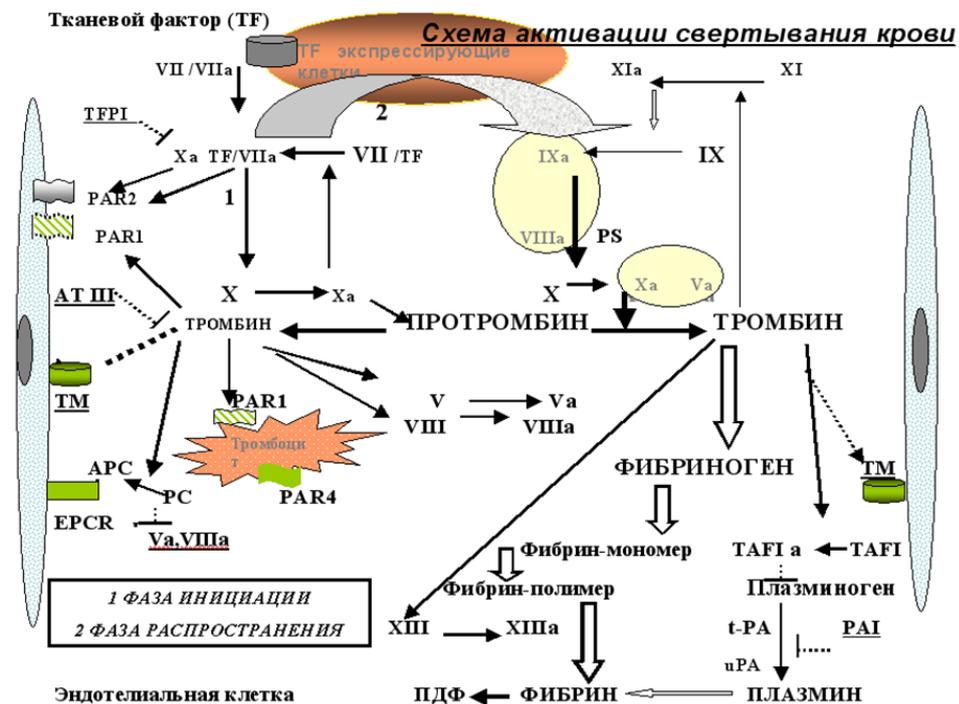


Рисунок 3. Образование тромбина и активированного протеина С в фазе инициации свертывания крови [Струкова, 2013].

Таким образом, тромбин может регулировать собственное образование, активируя систему протеина С. Полифункциональность тромбина объясняется его структурой: помимо «классического» активного сайта в нем содержится еще несколько экзосайтов

дополнительного узнавания субстратов и рецепторов, например сайты связывания гепарина, узнавания фибриногена и других специфических субстратов, в частности ПАР [Strukova et al., 1989, 2001; Stubbs, Bode, 1993]. Известно, что появление низких концентраций тромбина в области поврежденного участка сосудистого русла запускает такие адаптивные реакции, как блокада клеточной адгезии в месте повреждения и ингибирование секреции тучными клетками провоспалительных медиаторов [Vergnolle, 2000; Strukova et al., 2001; Steinhoff et al., 2005]. Вместе с тем тромбин обладает способностью активировать множество клеток, а именно моноциты, Т-лимфоциты, тучные клетки и клетки эндотелия (Рисунок 4) [Coughlin, 1999; Kulka, Befus, 2003]. Известно, что тучные клетки могут активироваться как иммунным, так и не иммунным путем [Galli et al., 2005]; и если первый уже достаточно хорошо изучен, то механизмы не иммунной активации тучных клеток тромбином еще мало исследованы.

Субстратом тромбина, как упоминалось выше, являются ПАР. С-концевой домен ПАР-1 рецептора тромбина может взаимодействовать с разными G-белками семейства регуляторных, связывающих гуаниннуклеотиды G-белков – гетеротримеров, состоящих из α -субъединицы (содержащей участок связывания нуклеотида) и $\beta\gamma$ -субъединицы (гетеродимера, закупоривающего комплекс на мембране), так что активация ПАР-1 запускает множественные ответные реакции [Струкова, 2004].

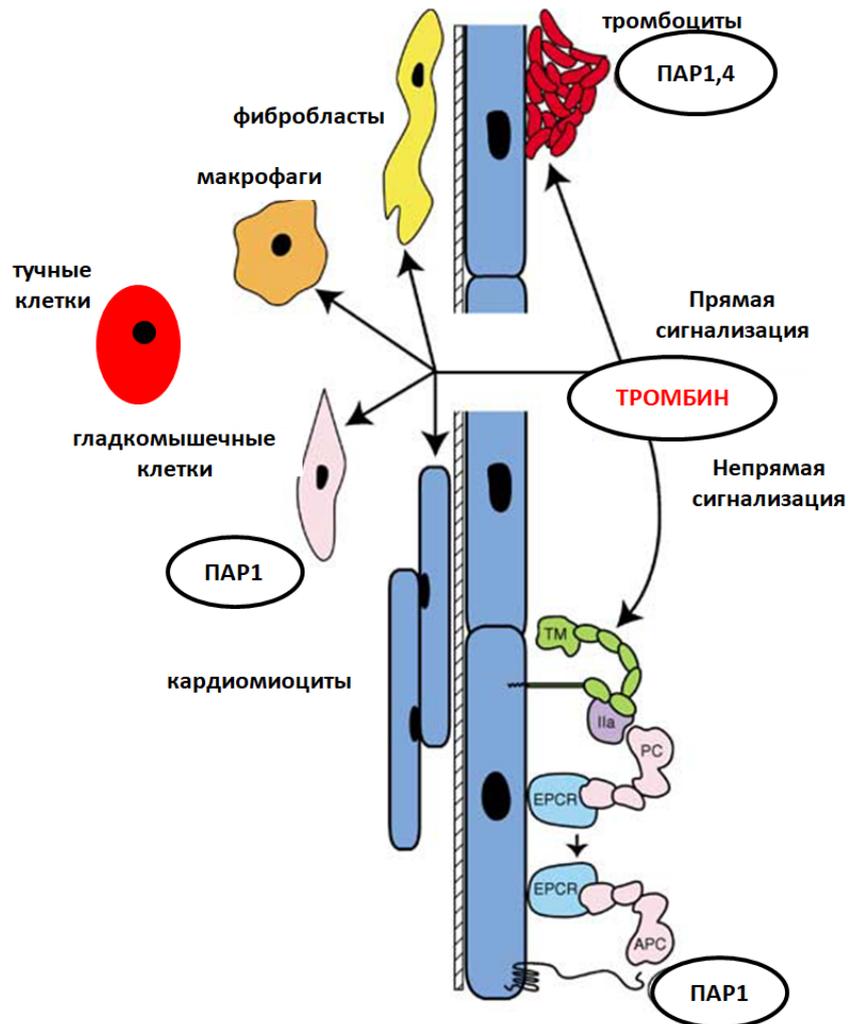


Рисунок 4. Влияние тромбина на клетки. EPCR = эндотелиальный рецептор протеина С, PC = протеин С, ТМ = тромбомодулин, Па = тромбин [Ruf et al., 2003; в модификации].

В большинстве клеток тромбин активирует PAR-1 связанный с $G_{\alpha q/11}$ белком, который через активацию фосфолипазы C_{β} запускает фосфоинозитольный путь (Рисунок 5) и образование инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3) и диацилглицерола (DAG), которые запускают соответственно процессы высвобождения из внутриклеточных депо классического вторичного посредника – Ca^{2+} и активацию протеинкиназы С (PKC). В тромбоцитах эффектами действия данных соединений является запуск реакций, ведущих к реорганизации актинового цитоскелета, экспонированию интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ на поверхности клеток, что играет важную роль при дальнейшем связывании фибриногена. Еще одним результатом действия тромбина на тромбоциты является фосфорилирование многих белков по остаткам Туг не рецепторными тирозин-киназами, например Src. Активация Ras и MAP киназ приводит к усилению экспрессии генов, вовлеченных в процесс воспаления. Регуляторные сайты многих факторов, активируемых тромбином, содержат кВ-участки

для взаимодействия с NF- κ B. К ним относятся гены E-селектина, PAI-1, INF- γ и β , IL-1 β , IL-6, IL-8, ICAM-1, VCAM-1, NOS и др.

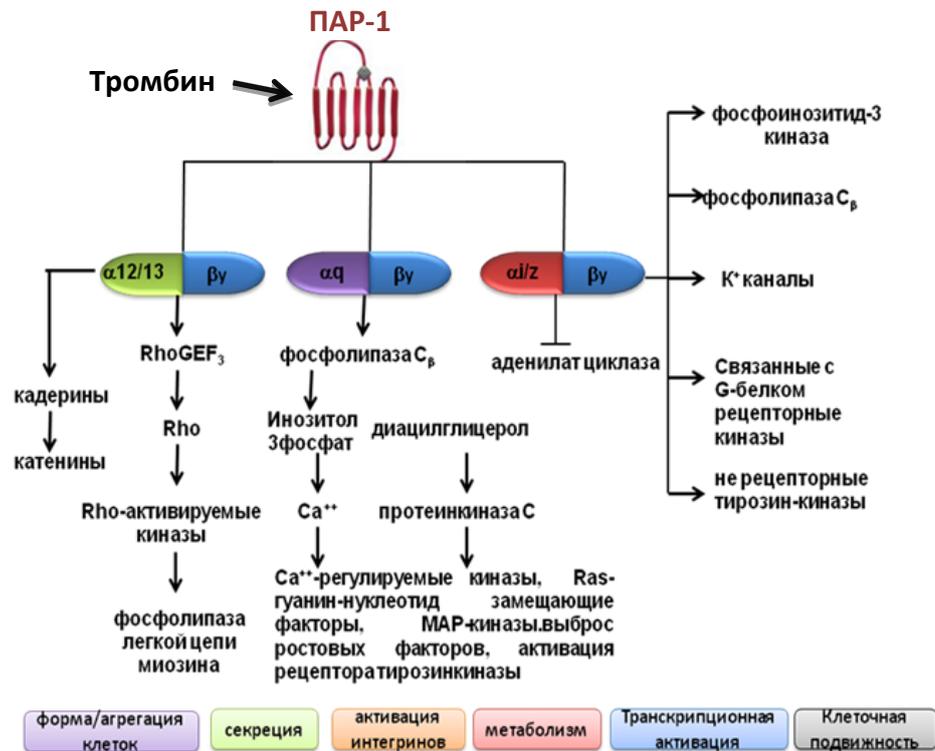


Рисунок 5. Внутриклеточная сигнализация, индуцируемая при активации тромбином ПАР-1 тромбоцитов, и ответы клеток [Angiolillo et al., 2010; в модификации].

Тромбин повреждает эндотелиальный барьер через оба эти механизма, ПАР-1 связывается с несколькими гетеротримерными подтипами G-белков, включая G_{q/11} и G_{12/13}, что приводит к быстрой активации сигнальных эффекторов, которые способствуют проницаемости эндотелиального барьера (Рисунок 6). Активация ПАР-1 тромбином запускает IP₃-путь и активацию РКС. Кроме того, активация ПАР-1 тромбином индуцирует передачу сигналов RhoA посредством связывания G_{12/13} с факторами обмена Rho-гуаниновых нуклеотидов (GEF) [Komarova et al., 2007]. Оба эти каскада регулируют фосфорилирование легкой цепи миозина (MLC). Фосфорилирование MLC увеличивает взаимодействие MLC с F-актином, что приводит к сокращению эндотелиальных клеток. Фосфорилирование MLC регулируется посредством связывания ПАР-1 с белками G_{q/11} и G_{12/13}. Активация G_{q/11} приводит к фосфолипазному C- β -зависимому увеличению внутриклеточного Ca²⁺ и кальций/кальмодулин-зависимой активации MLC-киназы [Komarova et al., 2007]. Активация G_{12/13} стимулирует p115 Rho GEF-опосредованную RhoA-индуцированную активацию Rho-киназы, которая фосфорилирует и ингибирует MLC-фосфатазу и тем самым защищает MLC от дефосфорилирования и увеличивает

сокращение эндотелиальных клеток. $G_{q/11}$ -зависимая активация PKC также может способствовать активации RhoA посредством фосфорилирования ингибитора диссоциации гуаниновых нуклеотидов RhoGDP [Mehta et al., 2001]. RhoA может дополнительно стимулировать Rho-киназозависимое фосфорилирование актин-деполимеризующихся белков, что приводит к образованию актиновых стрессовых волокон [Vogel, Malik, 2012].

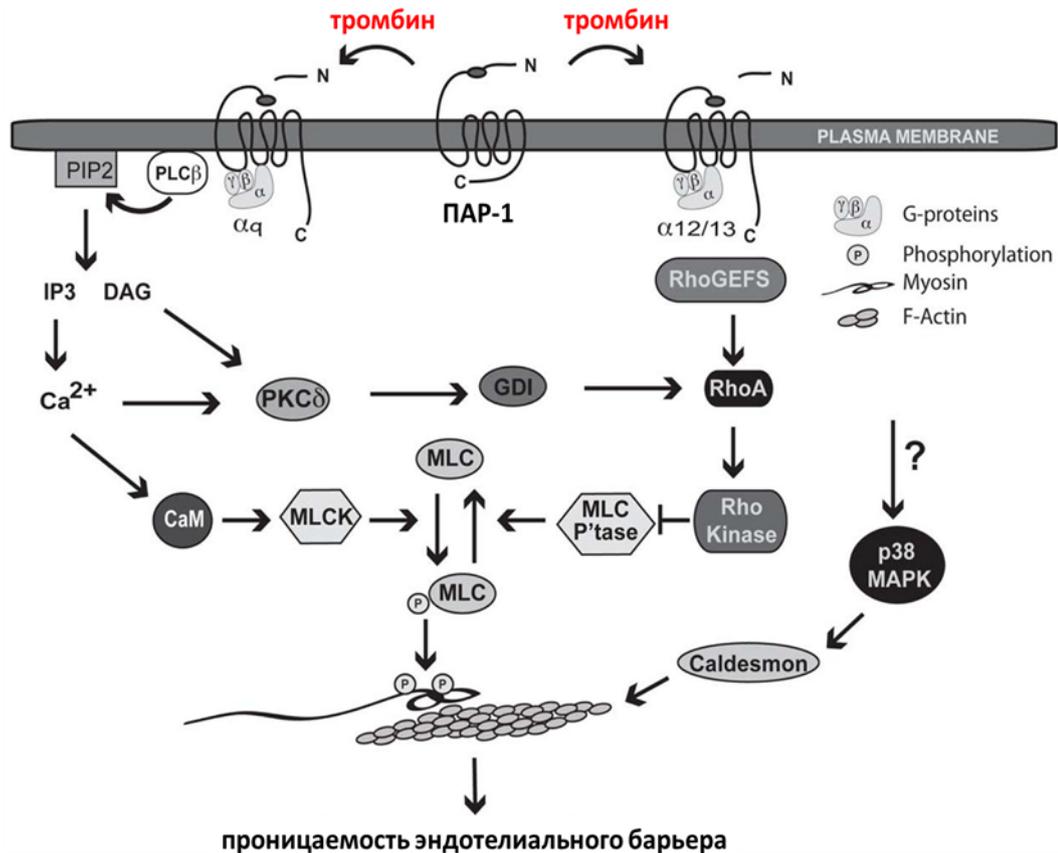


Рисунок 6. Тромбин/ПАФ-1 индуцированная регуляция проницаемости эндотелиального барьера. Фосфолипаза С β (PLC-β), фосфатидинозитол-4,5-дифосфат (PIP2) инозитол-1,4,5 трифосфат (IP3) и диацилглицерол (DAG), кальций/кальмодулин (CaM), легкая цепь миозина (MLCK), протеинкиназа С δ (PKC-δ), ингибитор диссоциации гуаниновых нуклеотидов (GDI), Rho гуаниннуклеотид обменные факторы (GEFs) [Grimsey, Trejo, 2016; в модификации].

Опосредованная тромбином активация клеток мозга, например астроцитов, может быть опосредована как через G_q белок с последующей активацией фосфолипазы С [Wang et al., 2002], так и с привлечением MAPK каскада, как показано на рисунке 7.

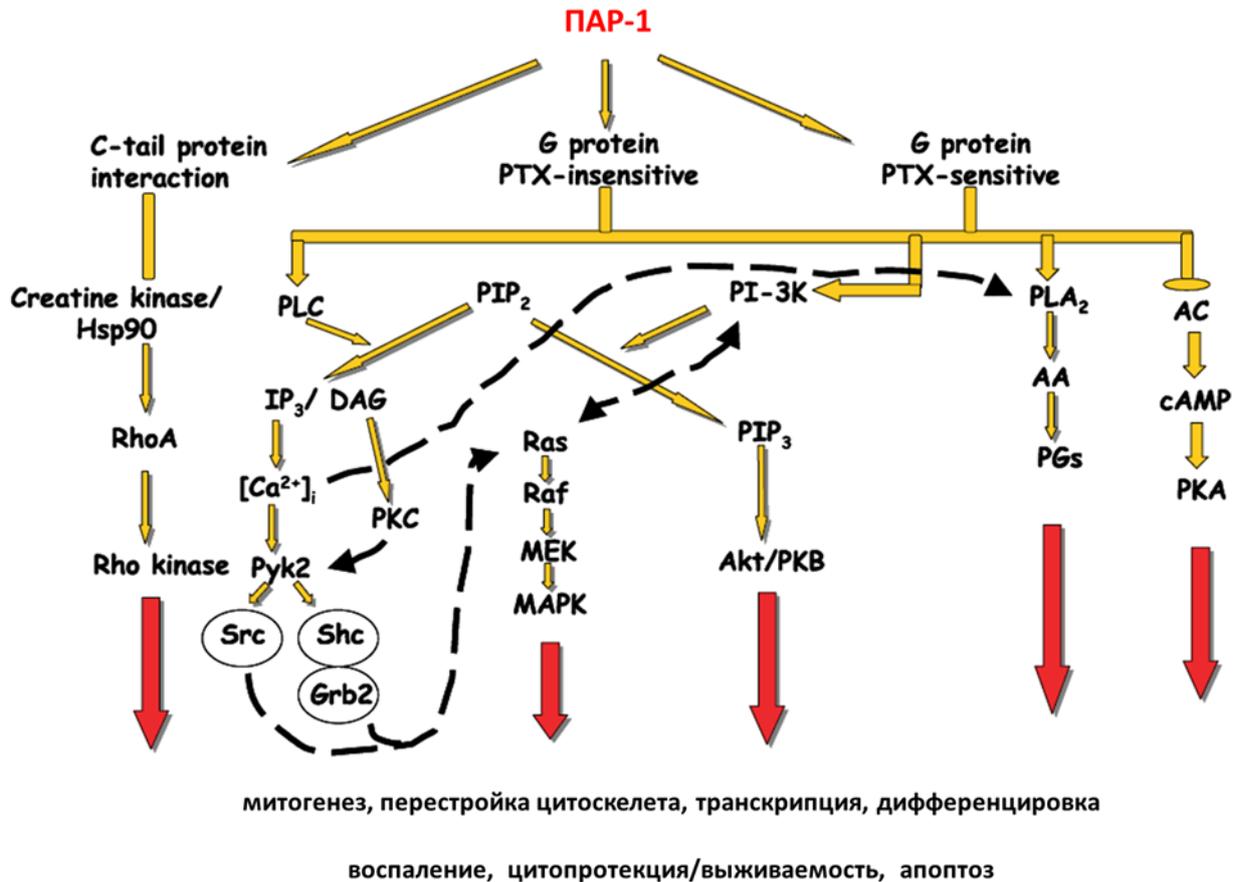


Рисунок 7. Сигнальные пути, регулируемые активацией ПААР-1.

PTX = токсин коклюша; Hsp90 = белок теплового шока 90; PI-3K = фосфатидилинозитол-3-киназа; PIP₂ = фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; PIP₃ = фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата; PKB = протеинкиназа В/Akt; Src = тирозинкиназа; Shc = адаптерный белок в малом GTPase-пути; Grb2 = белок, связанный с рецептором фактора роста; Ras и Raf = малые GTPases; MAPK = митоген-активируемая протеинкиназа; PLC = фосфолипаза C; IP₃ = инозитол-1,4,5-трифосфат; DAG = диацилглицерин; Pyk2 = богатая пролином тирозинкиназа-2; PKC = протеинкиназа C; PLA₂ = фосфолипаза A₂; AA = арахидоновая кислота; PGs = простагландины; AC = аденилатциклаза; цАМФ = циклический аденозинмонофосфат; PKA = протеинкиназа А [Rohatgi et al., 2004; в модификации].

Ещё одной особенностью тромбина является дозозависимый характер запускаемых каскадов: от провоспалительных до цитопротекторных.

Давно показано повреждающее действие высоких концентраций тромбина, но вместе с тем накопленные за последние годы данные показали, что тромбин в очень низких и умеренных концентрациях является нейропротектором для мозга. Активация ПААР-1, вызванная тромбином (10 пМ – 10 нМ) защищает нейроны и астроциты

гиппокампа крыс от гибели клеток *in vitro*, в ответ на кислородно-глюкозную депривацию, глутамат, гипогликемию, окислительный стресс или агрегацию β -амилоида [Vaughan et al., 1995; Pike et al., 1996; Striggow et al., 2000; Горбачева и др., 2006]. Интересно, что опосредованная тромбином гибель и выживаемость клеток имеют общие исходные рецепторные белки [Ho et al., 1994; Luo et al., 2009].

Таким образом, тромбин является полифункциональным ферментом, демонстрирующим как защитное, так и повреждающее действие в зависимости от концентрации протеазы (Рисунок 8).

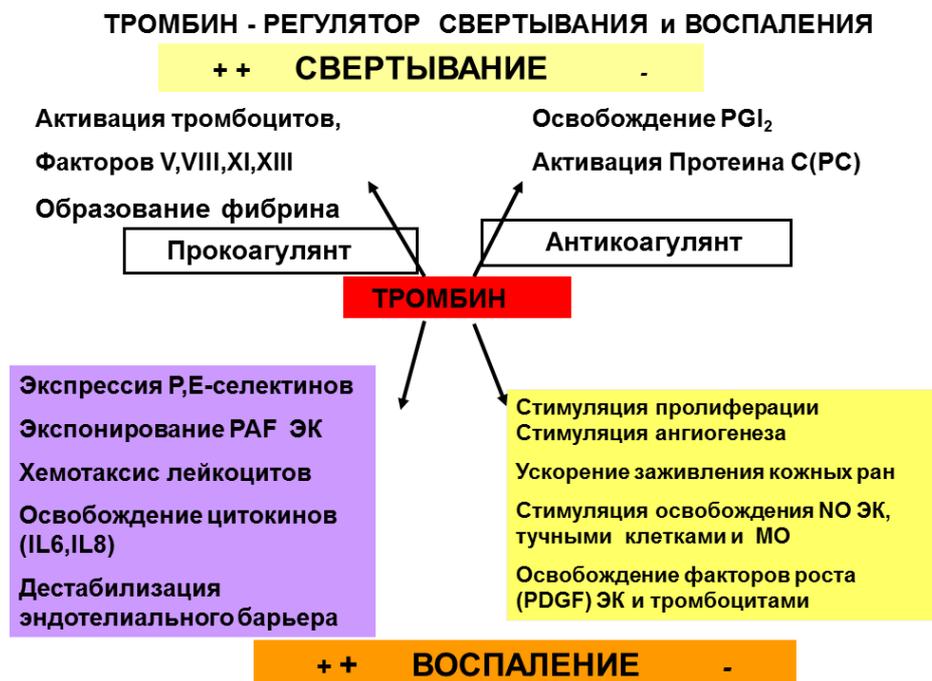


Рисунок 8. Полифункциональность тромбина [Струкова, 2013].

1.1.3. Структурно-функциональная характеристика протеина С и активированного протеина С (АПС)

Протеин С (ПС) – витамин К-зависимый гликопротеин; один из факторов протромбинового комплекса, профермент активированного протеина С (АПС), природного антикоагулянта, гидролизующего факторы Va и VIIa, прерывающего процесс тромбиногенеза. Структура имеет высокую степень гомологии с прокоагулянтными факторами VII, IX и X.

Синтезируется ПС в печени как одноцепочечный предшественник, состоящий из 461 аминокислотного остатка, синтез его обнаружен также в эндотелии сосудов и кератиноцитах кожи человека [Xue et al., 2004].

Профермент состоит из нескольких доменов: аминоконцевого (NH₂) отрицательно заряженного; двух доменов, подобных эпидермальному фактору роста (EGF); связывающего дипептида (Lys₁₅₆-Arg₁₅₇); пептида активации и трипсиноподобного протеазного (SP) домена на карбоксильном (COOH) конце молекулы. В результате посттрансляционной модификации молекулы происходят следующие изменения структуры профермента:

- 1) выщепление связывающего дипептида Lys₁₅₆-Arg₁₅₇ и превращение одноцепочечной формы в двухцепочечную молекулу, состоящую из тяжелой и легкой цепей, соединенных дисульфидной связью;
- 2) дополнительное γ -карбоксилирование девяти остатков глутаминовой кислоты NH₂ конца легкой цепи ПС и образование Gla-домена;
- 3) гидроксигликозилирование остатка Asp в EGF1 домене;
- 4) гликозилирование.

Легкая цепь ПС содержит домен, характеризующийся наличием 9 остатков глутаминовой кислоты, которые пост-трансляционно модифицируются в остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты, образуя так называемый «Gla домен». Этот регион обеспечивает взаимодействие с отрицательно заряженными фосфолипидами в присутствии ионов кальция, т.е. ориентацию домена на поверхности мембраны [Dahlbäck, 1995]. В норме уровень ПС в плазме очень низкий (3-5 мкг/мл), период полужизни 23 мин. Также легкая цепь ПС содержит два домена, подобных эпидермальному фактору роста (EGF1 и EGF2 домены) (Рисунок 9).

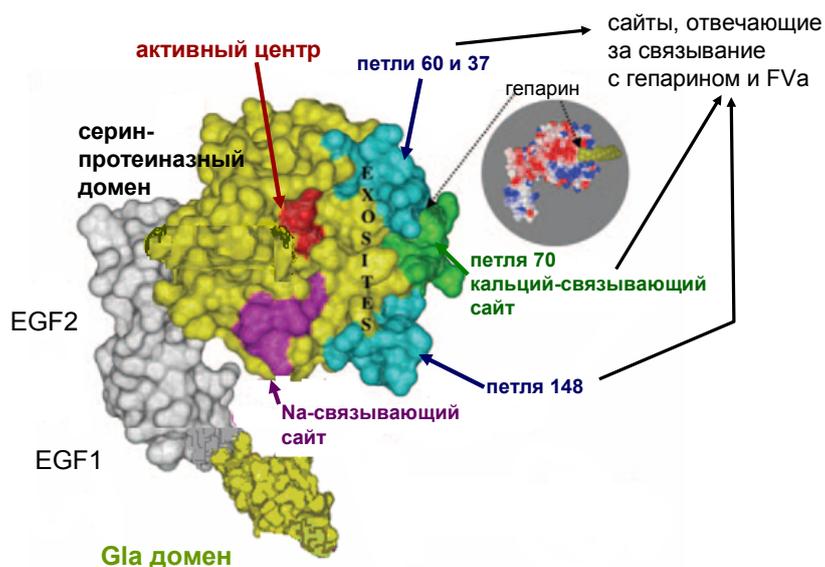


Рисунок 9. Структура активированного протеина С [Dahlbäck, Villoutreix, 2005; с изменениями].

Тяжелая цепь протеина С содержит короткий отрицательно заряженный пептид активации Lys₁₅₈-Arg₁₆₉ и протеазный домен (SP).

Протеин С циркулирует в крови в форме профермента. Превращение профермента ПС в сериновую протеазу – АПС, происходит вследствие расщепления тромбином одной пептидной связи Arg₁₆₉-Leu₁₇₀ в тяжелой цепи протеина С человека и освобождения отрицательно заряженного 12ти-членного пептида активации (AP) (Lys₁₅₈-Arg₁₆₉) [Dahlbäck, Villoutreix, 2005; Esmon, 2005; Griffin et al., 2012].

На поверхности эндотелия сосудов тромбин, образующийся на стадии инициации свертывания крови в низкой (нМ) концентрации, связывается со своим высокоаффинным рецептором тромбомодулином (ТМ). Тромбин в комплексе с ТМ активирует расщепление ПС, связанного со своим специфическим рецептором – ЭРПС (эндотелиальным рецептором протеина С), в сериновую протеазу – АПС.

Тромбин через анионсвязывающий сайт 1 (АВЕ1) связывается с ТМ, что в 100 раз увеличивает его способность активировать протеин С до АПС. При этом тромбин в комплексе с ТМ теряет свои прокоагулянтные свойства (Рисунок 10).

ЭРПС – трансмембранный белковый рецептор 1-го типа, сходный по структуре с семейством молекул основного комплекса гистосовместимости класса I (CD1), большинство из которых участвуют в воспалительных ответах организма [Oganessian et al., 2002; Esmon, 2005].

В рецепторе ЭРПС обнаружены две α-спирали и образованный 8 витками карман связывания фосфолипидов, что является необходимым условием для связывания Gla-домена протеина С. ЭРПС экспрессируется в эндотелиальных клетках, моноцитах, нейтрофилах, эозинофилах, гематопозитических стволовых клетках [Balazs et al., 2006], кератиноцитах, нервных клетках [Gorbacheva et al., 2009] и некоторых линиях раковых клеток [Scheffer et al., 2002]. АПС, связанный с поверхностью эндотелия через рецептор ЭРПС, расщепляет и активирует ПАР-1.

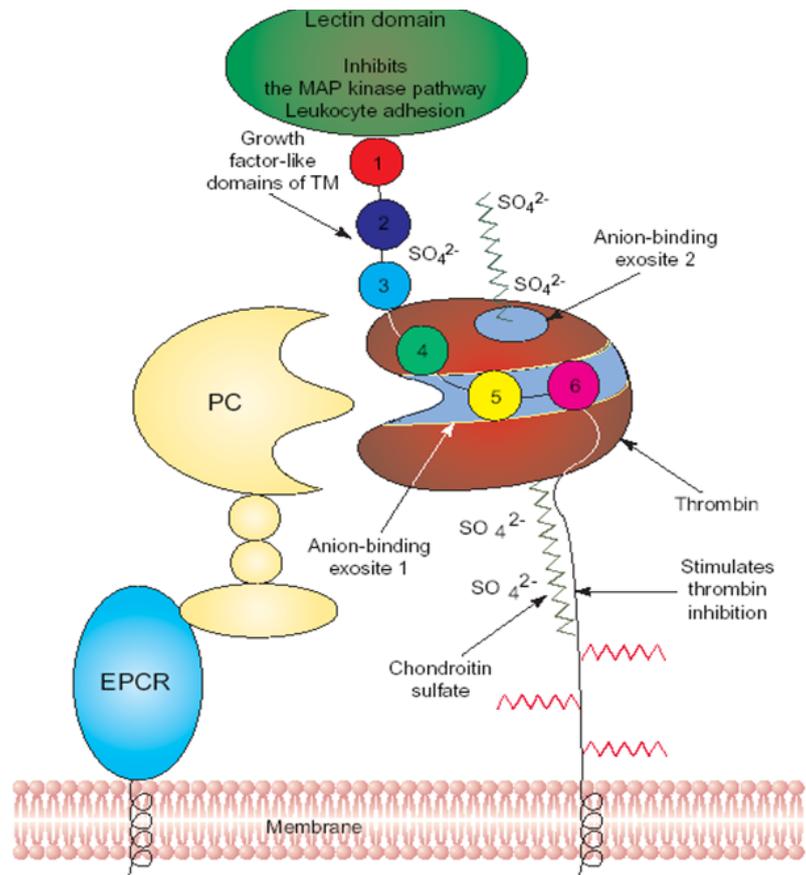


Рисунок 10. Схема взаимодействия ТМ с тромбином и протеином С, связанным с ЭПРС. EPCR = эндотелиальный рецептор протеина С, РС = протеин С [Esmon, 2005].

Система РС включает как специфические белки, так и рецепторы (Рисунок 11). На данный момент показаны три основные реакции системы РС: активация РС до АПС, антикоагулянтная и цитопротекторная активность АПС. АПС проявляет свою антикоагулянтную активность, протеолитически инактивируя факторы Va и VIIIa. Этот процесс ускоряется с помощью взаимодействия с протеином S (PS) на отрицательно заряженных фосфолипидах мембран. Цитопротекторный путь: АПС, связанный с ЭРПС, расщепляет PAR-1 чтобы инициировать клеточную сигнализацию и включать противовоспалительное и антиапоптотическое действие, изменение экспрессии генов и др. [Griffin et al., 2006, 2015; Mosnier et al., 2007; Bouwens et al., 2013].

Протекторные функции АПС требуют Gla-домен-зависимого взаимодействия протеазы с ЭРПС на поверхности сосудистых эндотелиальных клеток [Fukudome, Esmon, 1994; Oganessian et al., 2002; Mosnier et al., 2007]. При этом показано, что блокирование ЭРПС отменяет цитопотекторное действие АПС, например, в условиях глутаматной эксайтотоксичности [Gorbacheva et al., 2009]. Кроме того, подобно тромбину, эффекты АПС могут зависеть от концентрации: показано, что в диапазоне концентраций 1 – 50 нМ АПС оказывает цитопротекторное действие, повышая выживаемость нейронов

в условиях эксайтотоксичности, в то время как высокие концентрации АПС (> 50 нМ) вызывали гибель нейронов, аналогично токсическому действию глутамата [Gorbacheva et al., 2008].

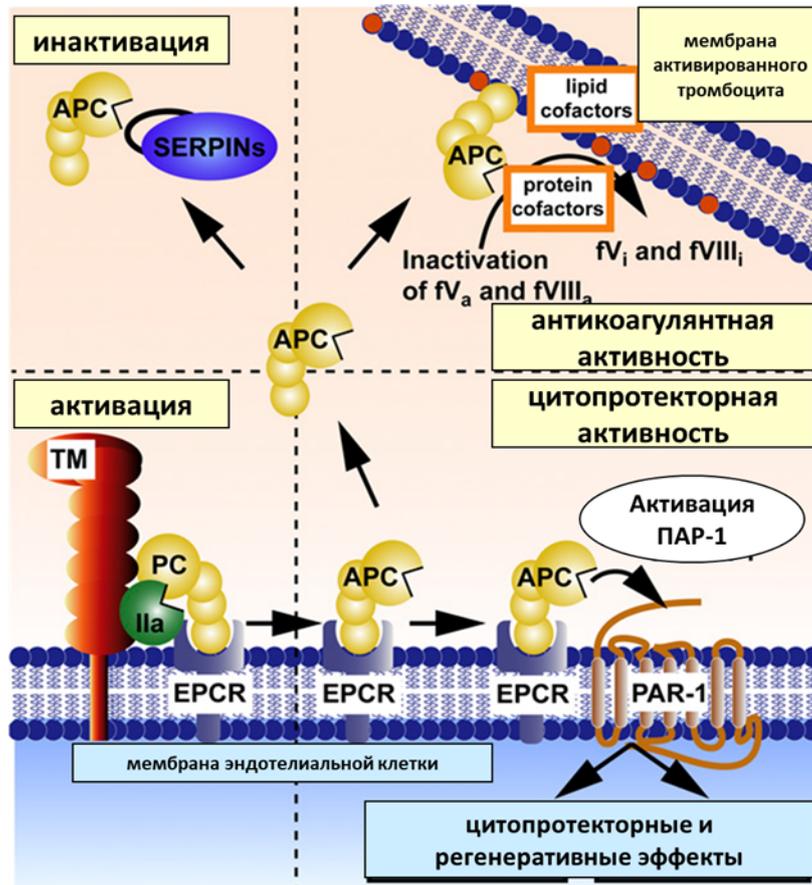


Рисунок 11. Активация протеина С и функции активированного протеина С. APC = активированный протеин С, EPCR = эндотелиальный рецептор протеина С, ТМ = тромбомодулин, Па = тромбин, Va и VIIIa-факторы системы свертывания крови, инактивируемые АПС, SERPINs- ингибиторы сериновых протеаз в плазме [Griffin et al., 2015; в модификации].

Аминокислотные остатки в С-конце Gla-домена АПС участвуют в специфических взаимодействиях с PS на поверхности мембраны [Preston et al., 2006].

АПС, охарактеризованная во многих лабораториях, сериновая протеаза с антикоагулянтной и клеточно-регуляторной активностями [Zlokovic, Griffin, 2011]. Его клеточная сигнализация была продемонстрирована в сердце, легких, почках, печени и ЦНС [Griffin et al., 2012]. В ЦНС АПС регулирует функции клеток эндотелия, нейронов и микроглии, что приводит к васкулопротективным, нейропротекторным и противовоспалительным эффектам после острого или хронического повреждения ЦНС (Рисунок 12) [Zlokovic, 2011; Zlokovic, Griffin, 2011].

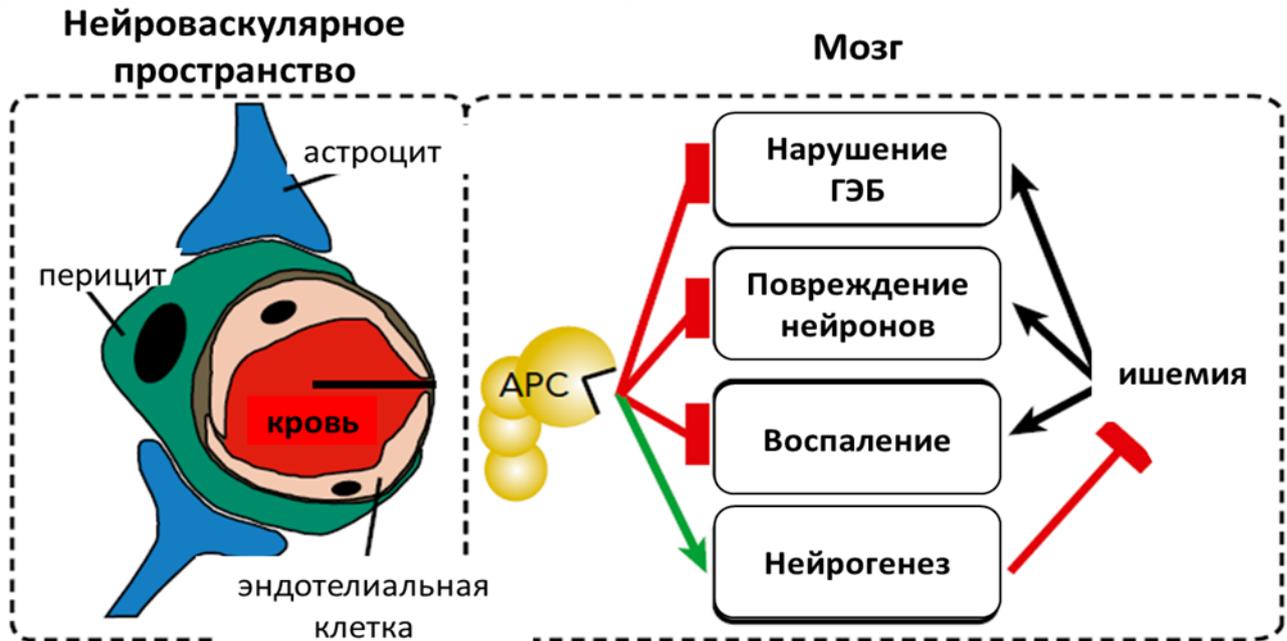


Рисунок 12. Нейропротекторные эффекты АПС в нейроваскулярном пространстве. АПС = активированный протеин С [Griffin et al., 2018; в модификации].

Для уменьшения антикоагулянтной активности АПС без изменения его клеточно-сигнальной активности с помощью сайт-направленного мутагенеза были созданы аналоги АПС [Gale et al., 2002; Mosnier et al., 2004, 2007]. 3К3А-АПС и 5А-АПС, в которых риск серьезного кровотечения, вызванного антикоагулянтной активностью АПС, снижается при сохранении цитопротекторной активности.

1.2. ПАР-1 - ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ ПРИ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ В ОРГАНИЗМЕ

1.2.1. Регуляция агонистами ПАР-1 функций клеток мозга при воспалении и нейродегенерации

Данные, накопленные в экспериментальных исследованиях о сопряжении свертывания и воспаления в нервной ткани, указывают на ПАР и, в частности, на ПАР-1, как ключевые участники данного процесса [Chapman, 2013].

ПАР-1 экспрессируется на различных типах клеток в нервной системе, включая нейроны, микроглию и астроциты. При этом данный тип рецепторов может опосредовать провоспалительные и патологические процессы. Тромбин и ПАР-1 участвуют в развитии таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера [Mhatre et al., 2004; Grammas, Martinez, 2014] и Паркинсона [Ishida et al., 2006].

Подтип ПАР-1 был первоначально идентифицирован как рецептор тромбина [Vu et al., 1991], но теперь известно, что ПАР могут активироваться и другими протеазами, например, АПС, ММР, гранзим В [Adams et al., 2011]. Функции ПАР-1 нервных клеток разнообразны. Они активируются протеазами, секретруемыми нейронами [Scarlsbrick et al., 2001], и протеазами, проникающими в ткань мозга через поврежденный ГЭБ [Ramachandran et al., 2012]. ПАР-1 нейронов опосредуют процессы нейротоксичности и длительного потенцирования [Cunningham, 1997; Acharjee et al., 2011; Almonte et al., 2013].

Исследования на грызунах показали, что ПАР-1 экспрессируется во всех отделах мозга в нейронах и астроцитах. Активация ПАР-1 в разных моделях повреждения мозга *in vitro* и *in vivo* регулирует нейродегенерацию и нейропротекцию у животных [Junge et al., 2004].

Изменение экспрессии ПАР в мозге наблюдается при патологических состояниях, при нейродегенеративных расстройствах, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, инсульт и деменция, связанная с вирусом иммунодефицита человека. Активация ПАР агонистами опосредует как гибель, так и выживание клеток мозга. Протеазы-агонисты ПАР, например, тромбин, тканевой активатор плазминогена и плазмин, регулируют последствия ишемического инсульта, синаптической пластичности, болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера [Madani et al., 1999; Striggow et al., 2000; Suo et al., 2003; Cannon et al., 2005, 2006; Choi et al., 2005].

Тромбин и другие протеазы, участвующие в коагуляции, могут в значительной степени стимулировать нейровоспаление через ПАР. Воздействие на мозг повышенных уровней факторов свертывания крови чаще встречается во время васкулита и может вызывать воспалительные заболевания, например, рассеянный склероз [Chapman, 2013].

Иммуногистохимия указывает на повышенный уровень ПАР-1 как вблизи, так и внутри подкорковых поражений у пациентов с рассеянным склерозом по сравнению с неповрежденными областями мозга [Lee et al., 2017].

Изменение уровня факторов свертывания крови в мозге как животных, так и человека связано с воспалительными заболеваниями ЦНС, которые могут способствовать развитию нейродегенеративных заболеваний [Chapman, 2013].

Реактивность системы свертывания на травматическое воздействие наглядно продемонстрирована в работе, где в поврежденном седалищном нерве уровень тромбина был повышен уже через 1 ч после травмы [Gera et al., 2016].

Кроме этого, генерация тромбина во время сосудистого повреждения и воспаления вызывает кратковременное увеличение проницаемости эндотелиального барьера [Komarova, Malik, 2010; Vogel, Malik, 2012].

При этом, нарушение гематоэнцефалического барьера, которое часто связано с ишемическим, геморрагическим и травматическим повреждением головного мозга, позволяет тромбину проникать в паренхиму головного мозга. Эндотелиальные клетки в поврежденном мозге также способны выделять тромбин [Grammas et al., 2004]. Таким образом, при определенных патофизиологических состояниях, таких как травма, кровоизлияние, ишемия и болезнь Альцгеймера, уровни тромбина в мозге повышаются [Suzuki et al., 1999; Riek-Burchardt et al., 2002; Xi et al., 2002; Arai et al., 2006; Hua et al., 2007]. Следовательно, возможна активация ПАР-1,-3 и -4 тромбином в мозге.

Существует ряд доказательств о наличии патогенетического пути тромбин/ПАР-1/разрушение ГЭБ во всех ситуациях, когда внутрисосудистая активация протромбина в α -тромбин превышает его нейтрализацию с помощью антитромбина (АТ) или тромбомодулина эндотелиальных клеток и ЭРПС [Grammas, 2011; Ott et al., 2018]. Этот путь характерен для болезни Альцгеймера, Паркинсона, бокового амиотрофического склероза и нейродегенерации, особенно в ситуациях с предшествующим повреждением.

Прямая активация ПАР-1 синтетическими пептидами-агонистами увеличивает проницаемость сосудов у мышей [Korhonen et al., 2009; Grimsey et al., 2015]. Разрушение эндотелиального барьера, вызванное медиаторами воспаления, такими как тромбин, происходит через ослабление адгезивных соединений (АJs), опосредованное дестабилизацией компонентов АJs и активацией сократительной способности актина и миозина.

Наличие инфекции в тканях сопряжено с повышенным уровнем экспрессии ПАР-1 в клетках. *In vivo* показано, что вирусная инфекция иммунодефицита у кошачьих была связана с повышенной экспрессией ПАР-1 на нейронах и индукцией интерлейкина-1 β в макрофагах, что способствовало повреждению нейронов дорсального корешкового ганглия при лентивирусных инфекциях, приводя к развитию дистальной сенсорной полинейропатии [Acharjee et al., 2011].

Также было показано, что ассоциированная с ВИЧ нейродегенерация (HAND) требует экспрессии тромбина и ПАР-1 в астроцитах [Rohatgi et al., 2004].

Во время ВИЧ-энцефалопатии (immunodeficiency virus (HIV) encephalitis) экспрессия ПАР-1 повышается как на уровне мРНК, так и на уровне белка в астроцитах человека *in vivo* [Boven et al., 2003].

Нейроны центральной нервной системы при воспалении экспрессируют повышенный уровень ПАР-1 и подвергаются нейротоксическому воздействию как гранзима В, так и IL-1 β , что обеспечивает высокий риск их повреждения [Lee et al., 2017]. При этом на нейрональной культуре человека показано, что нейротоксичность гранзима В опосредована активацией ПАР-1 и системой вторичных мессенджеров фосфолипазой C β и IP3. IL-1 β усиливал опосредованную гранзимом В нейротоксичность за счет увеличения экспрессии ПАР-1 в нейронах [Lee et al., 2017].

Существуют данные об участии ПАР-1 в воспалении, обусловленном бактериальной инфекцией. Было показано, что ворапаксар (конкурентный антагонист ПАР-1) значительно снижал активацию коагуляции, фибринолиза, воспалительного ответа и активации эндотелия во время экспериментальной эндотоксемии, вызванной ЛПС, у человека [Schoergerhofer et al., 2018].

Большое количество работ посвящено изучению участия ПАР-1 в нейродегенеративных заболеваниях. Недавно было обнаружено, что количество астроцитов, экспрессирующих ПАР-1, увеличивается в *nigra pars compacta* у больных Паркинсоном [Ishida et al., 2006]. Дефицит ПАР-1 значительно ослабляет индуцированную 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МРТР) потерю дофамина, переносчика дофамина и тирозин-гидроксилазы в стриатуме и, таким образом, уменьшает повреждение стриатума. Высокие уровни тромбина присутствуют в бляшках головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера [Akiyama et al., 1992].

Кроме того, активация ПАР-1, индуцированная тромбином, также значительно увеличивает экспрессию мРНК IL-6, IL-1 β и фактора некроза опухоли (TNF α) [Boven et al., 2003; Fan et al., 2005] и повышает содержание оксида азота, продуцируемого индуцибельной синтазой оксида азота (iNOS) в клетках астроцитомы [Meli et al., 2001; Boven et al., 2003].

В модели повреждения спинного мозга (SCI) на нокаутных по ПАР-1 мышах было отмечено улучшение двигательных показателей, уменьшение воспаления и астроглиоза, в том числе экспрессии глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), виментина и сигнализации STAT3. SCI-ассоциированное повышение высвобождения провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и IL-6, также были снижены у мышей нокаутных по ПАР-1 [Radulovic et al., 2016].

Активация ПАР-1 астроцитов увеличивала уровень провоспалительного цитокина IL-6 и активность его сигнального партнера STAT3. В свою очередь, IL-6 стимулировал увеличение ПАР-1 и его агонистов, тем самым устанавливая механизм положительной обратной связи, который может стимулировать передачу сигналов IL-6/STAT3 до

уровней, достаточных для выявления молниеносного астроглиоза, включая увеличение астроглиальных промежуточных филаментных белков GFAP и виментина [Radulovic et al., 2016]. Исследования *in vivo* показывают, что каспаза-3, главный индуктор апоптоза, и p53 участвуют в индуцированном тромбином апоптозе дофаминергических нейронов черной субстанции у крыс [Choi et al., 2003].

На мышах показано, что подавление ПАР-1 путем генетических манипуляций приводит к увеличению посттравматической выживаемости нейронов ЦНС. При этом доказано, что тромбин играет ключевую роль в выживании нейронов после травмы, и что его посттравматическая токсичность может быть снижена путем соответствующего повышения уровня продукции антитромбина III Т-клетками [Friedmann et al., 2001].

Кроме тромбина ПАР-1 может быть активирован другой сериновой протеазой гемостаза – активированным протеином С.

В ЦНС АПС и его аналоги с пониженной антикоагулянтной активностью, но сохраняющие клеточную сигнальную активность, такие как 3К3А-АПС, оказывают нейропротекторное, васкулозащитное и противовоспалительное действие.

3К3А-АПС стимулировал нейрональную и ингибировал астроглиальную дифференцировку. Эти эффекты на нервных стволовых клетках/клетках-предшественниках человека (NPCs), по-видимому, опосредованы специфическими сфингозин-1-фосфатными рецепторами (S1PRs), ПАР-1 и ПАР-3. АПС и его фармакологические аналоги, воздействуя на сигналы ПАР и S1PR в резидентных нейрональных клетках-предшественниках, могут активировать Akt и выступать в роли мощных модуляторов как развития, так и репарации в ЦНС человека [Guo et al., 2013]. Многочисленные исследования показали, что положительные эффекты АПС требуют ПАР-1 в большинстве типов клеток [Gorbacheva et al., 2009; Zlokovic, Griffin, 2011], тогда как его эффекты в мышечных нейронах требуют сотрудничества ПАР-1 и ПАР-3 [Guo et al., 2004; Liu et al., 2004; Guo et al., 2009; Zhong et al., 2009].

На моделях инсульта *in vivo* [Guo et al., 2009; Wang et al., 2009, 2012], травматического повреждения головного мозга [Walker et al., 2010], бокового амиотрофического склероза [Zhong et al., 2009] и бактериального сепсиса [Kerschen et al., 2007] аналоги АПС (3К3А-АПС и 5А-АПС) оказывали положительные эффекты, которые были эквивалентны, а иногда и больше, чем в случае рекомбинантного АПС дикого типа.

АПС через ПАР-1 подавляет ядерную транслокацию ядерного фактора каппа В (NF-κB), что приводит к блокаде NF-κB-зависимой активации матричной

металлопротеиназы-9 (ММР9), снижению постишемической деградации мембранных белков ГЭБ и связанного с ним внутримозгового кровотечения [Cheng et al., 2006]. Подавляя NF-κB-зависимую экспрессию провоспалительных цитокинов, например, TNFα, интерлейкина 1β, интерлейкина-6, и молекул адгезии [Joyce, Grinnell, 2002], АПС проявляет противовоспалительную активность *in vivo*, которая блокирует ишемическую инфильтрацию нейтрофилов в мозг [Shibata et al., 2001].

Другое недавнее исследование показало, что защитный эффект ПАР-1 требует трансактивации сигнального пути ПАР-2 [Kaneider et al., 2007]. Два других исследования продемонстрировали, что АПС-опосредованная передача сигналов через пути рецептора аполипопротеина Е2 (АроЕР2) и ангиопозтина (Ang)/Tie2 также вносит вклад в цитопротекторные и противовоспалительные свойства АПС [Yang et al., 2009; Minhas et al., 2010].

Стоит отметить, что ПАР-1-зависимая регуляция клеточных ответов на повреждающее воздействие может быть опосредована не только тромбином и АПС.

Обработка эндотелиальных клеток фактором VIIa подавляла TNFα- и ЛПС-индуцированную экспрессию молекул клеточной адгезии, адгезию моноцитов, секрецию воспалительных цитокинов и инфильтрацию иммунных клеток в легкие у мышей. Фактор VIIa-индуцированная супрессия TNFα- и ЛПС-индуцированной экспрессии молекул клеточной адгезии и IL-6 опосредована ЭРПС и ПАР-1. При этом показано, что фактор VIIa-индуцированный противовоспалительный эффект в эндотелиальных клетках опосредован сигнализацией через β-аррестин 1 [Kondreddy et al., 2018].

Как показано выше, эффекты, реализуемые через один и тот же тип рецепторов – ПАР-1 отличаются в зависимости от типа активатора. Объяснение подобного явления будет рассмотрено далее.

1.2.2. Смещённый агонизм – как механизм реализации ПАР-1-опосредованных эффектов

Тромбин, активируя рецептор ПАР-1, оказывает провоспалительное действие, что, в частности, приводит к нарушению эндотелиального барьера; в то время как АПС, взаимодействуя с ПАР-1, оказывает цитопротекторный и противовоспалительный эффекты [Mosnier et al., 2012].

Механизм разнонаправленных эффектов протеаз, действующих через один рецептор, получил название «biased agonism» смещённый агонизм. В случае тромбина и АПС различия в оказываемых эффектах, во-первых, связаны с тем, что расщепление ПАР-1

тромбином и АПС происходит в разных участках экзодомена ПАР-1. Тромбин расщепляет рецептор по Arg₄₁, а АПС – по Arg₄₆. Расщепление разных сайтов (аргинин 41/46) приводит к формированию привязанных лигандов с отличающимися аминокислотными последовательностями, что опосредует выбор запускаемого сигнала. Во-вторых, эффект зависит от субпопуляции ПАР-1, вовлеченной в формирование ответа: в случае тромбина – ПАР-1 расположен в мембране, не содержащей кавеолин-1; а цитопротекторное действие АПС реализуется через ПАР-1, расположенный в кавеолах, содержащих кавеолин-1 и ЭРПС. И, в-третьих: сигнализация, индуцируемая тромбином, осуществляется через G-белок и сопровождается активацией RhoA киназы. АПС запускает β-аррестин-2-зависимую сигнализацию, приводя к активации Rac-1 киназы (Рисунок 13).

АПС вместе с корецептором ЭРПС, активируя ПАР-1, оказывает цитопротекторный эффект. АПС индуцирует экспрессию антиапоптотических генов, и способствует стабилизации барьерной функции эндотелия, снижает секрецию цитокинов. В противоположность этому активация тромбином ПАР-1 приводит к провоспалительным эффектам, таким как нарушение целостности эндотелиального барьера.

Для активации и передачи сигнала в клетку необходимы не только G-белки, как представляли ранее, но и адапторные молекулы β-аррестины, которые играют ключевую роль в десенситизации рецептора, облегчении эндоцитоза и проведении сигналов, независимых от вовлечения G-белков [Shenoy, Lefkowitz, 2011]. В случае ПАР тип внутриклеточного сигнального каскада, запускаемый при активации рецептора, определяется сайтом протеолитического расщепления внеклеточного фрагмента рецептора. Большинство протеаз, активирующих ПАР, имеют свои специфические сайты расщепления во внеклеточном N-конце рецептора, а синтетические пептиды-агонисты, повторяющие структуру образовавшегося в этом случае привязанного лиганда, вызывают запуск каскада, характерного для соответствующей протеазы.

ПАР-1-зависимые эффекты тромбина и АПС реализуются за счет разных сигнальных путей. Провоспалительное действие тромбина реализуется через G_{12/13}. Цитопротекторный эффект АПС осуществляется через вовлечение β-аррестинов, независимо от G-белков [Schulte, Shenoy, 2011; Wisler et al., 2014]. Если тромбин расщепляет внеклеточный домен ПАР-1 с образованием привязанного лиганда, то АПС связывается с ЭРПС, что ведет к специфическому, отличному от действия тромбина, расщеплению внеклеточного фрагмента ПАР-1.

В эндотелиальных клетках ПАР-1-зависимые провоспалительные свойства тромбина опосредованы активацией пути ядерного фактора NF-κB [Joyce, Grinnell, 2002;

Finigan et al., 2005; Bae, Rezaie, 2009]. В то же время комплекс АПС-ЭРПС может ингибировать опосредованную провоспалительными цитокинами или тромбином активацию NF- κ B и подавлять экспрессию провоспалительных цитокинов путем активации PAR-1 в эндотелиальных клетках [Joyce, Grinnell, 2002; Finigan et al., 2005; Bae, Rezaie, 2009].

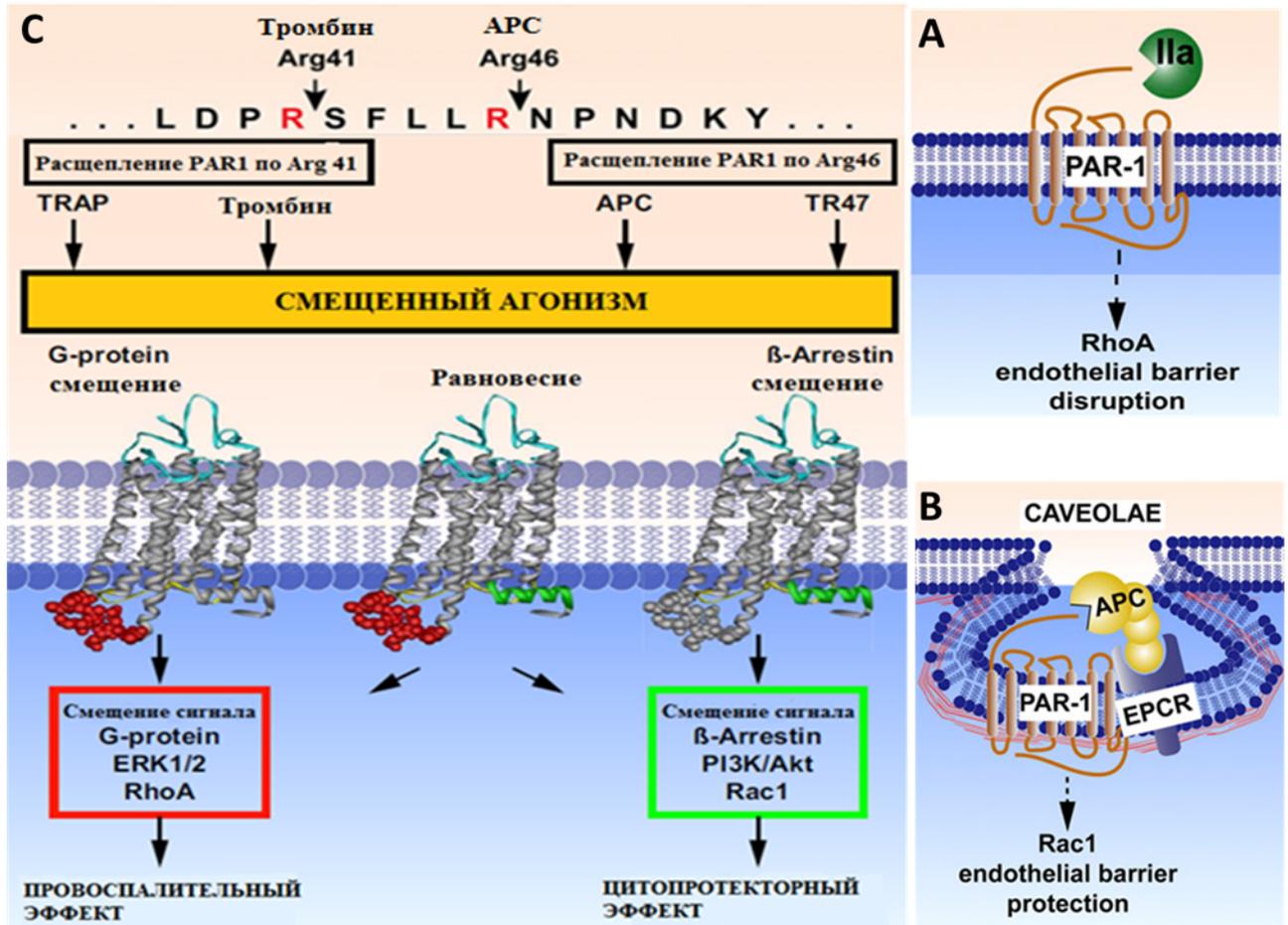


Рисунок 13. Механизм «смещенного агонизма» при каноническом (классическом) расщеплении PAR-1 тромбином по сайту Arg₄₁ и неканоническом расщеплении PAR-1 АПС по сайту Arg₄₆. Па = тромбин, АПС = активированный протеин С, EPCR = эндотелиальный рецептор протеина С [Griffin et al., 2015; Mosnier et al., 2012; в модификации].

Кроме того, АПС ингибирует каспаз-9-зависимые и Fas-опосредуемые каспаз-8-зависимые пути апоптоза в эндотелиальных клетках головного мозга как *in vitro*, так и *in vivo* [Cheng et al., 2003, 2006; Liu et al., 2004]. АПС активирует антиапоптотические гены Bcl-2 [Joyce, Grinnell, 2002; Cheng et al., 2003] и подавляет

проапоптотический путь, снижая экспрессию p53 и Вах (Рисунок 14) [Cheng et al., 2003; Liu et al., 2004].

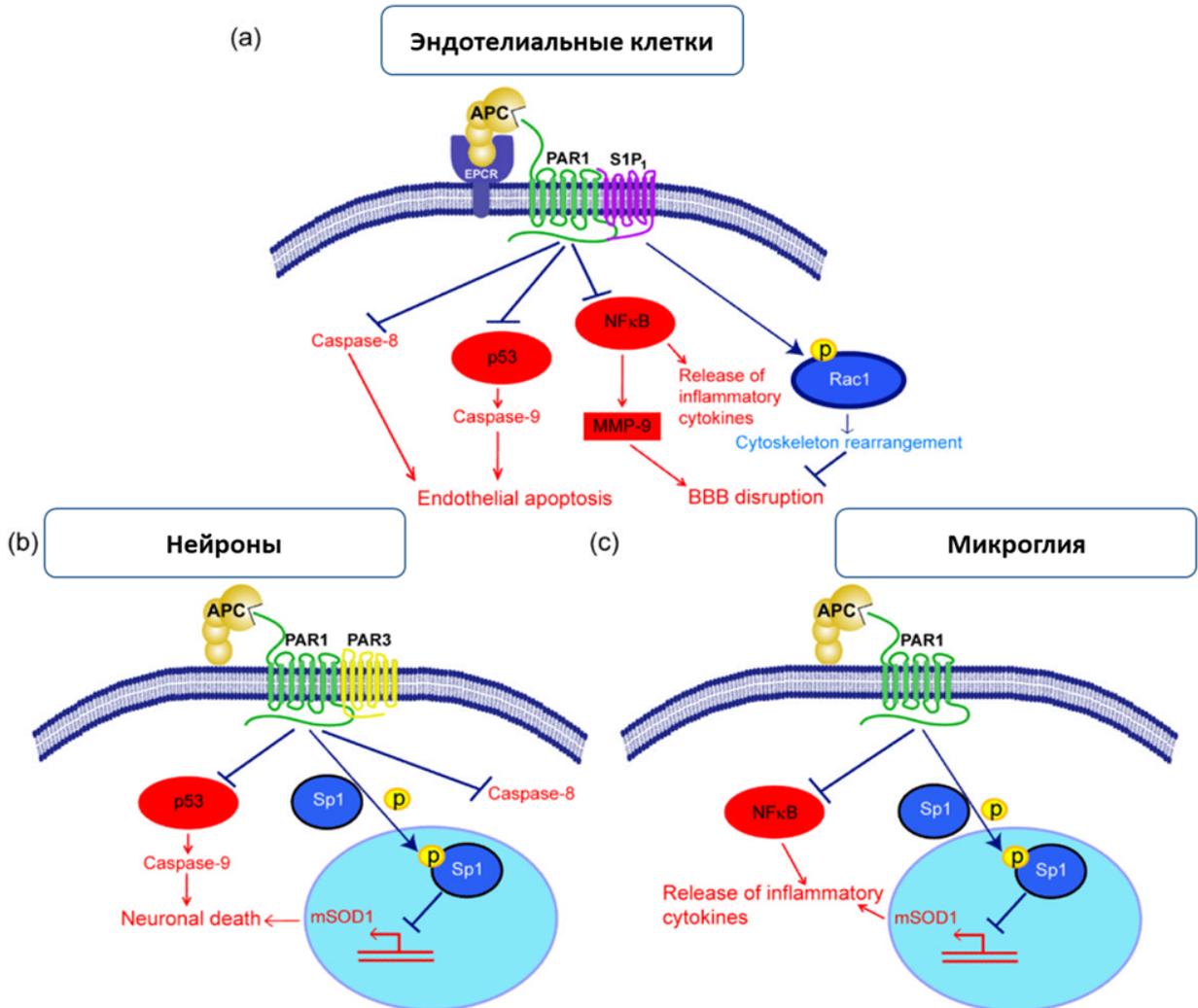


Рисунок 14. Протекторное действие АПС в клетках нейро-васкулярной единицы.

S1P1 = сфингозин-1-фосфатный рецептор 1, APC = активированный протеин С, PAR1 = рецептор активируемый протеазами 1 типа, PAR3 = рецептор активируемый протеазами 3 типа, BBB = гематоэнцефалический барьер [Zlokovic, Griffin, 2011; в модификации].

Исследования показали, что связывание ЭРПС с лигандом, подобно АПС, обеспечивает тромбин-вызванную активацию ПАР-1 с последующим ингибированием RhoA и активацией Rac1-путей в эндотелиальных клетках, стимулированных TNF α [Bae, Rezaie, 2009]. Кроме того, тромбин ингибировал путь NF- κ B по ПАР-1-зависимому механизму, если клетки предварительно обрабатывали протеином С [Bae, Rezaie, 2009]. Данное явление часто называют «EPCR occupancy» (Рисунок 15) [Rezaie, 2010].

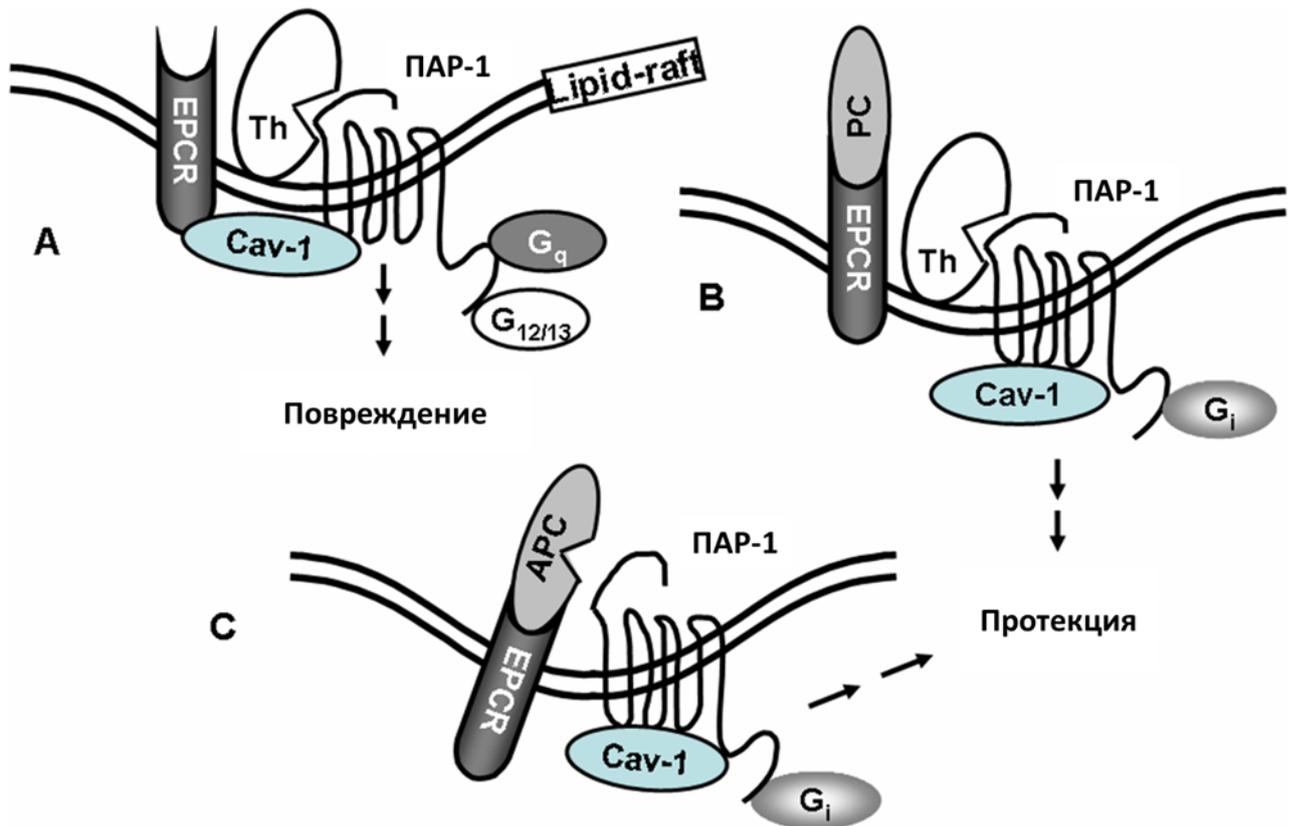


Рисунок 15. Активации ПАР-1 активированным протеином С и тромбином, когда ЭРПС либо свободен (А), либо связан со своим лигандом (В, С).

EPCR = эндотелиальный рецептор протеина С, APC = активированный протеин С, PC = протеин С, Th = тромбин, Cav-1 = кавеолин-1 [Rezaie, 2010; в модификации].

Кроме того, показано, что занятый лигандом ЭРПС рекрутирует ПАР-1 в цитопротекторный сигналинг путем связывания ПАР-1 с G_i-белком в эндотелиальных клетках независимо от типа протеазы, расщепляющей рецептор [Bae et al., 2007; Bae, Rezaie, 2008, 2009]. При этом как ПАР-1, так и ЭРПС ассоциируются с кавеолином-1 в богатых холестерином липидных рафтах, и что связь ЭРПС либо с АПС, либо с протеином С приводит к его диссоциации от кавеолина-1, процесс, который, по-видимому, меняет специфичность передачи сигналов ПАР-1 от повреждающего к защитному ответу в культивируемых эндотелиальных клетках (Рисунок 15) [Rezaie, 2010].

Также после активации тромбином происходит интернализация и деградация ПАР-1, в отличие от АПС-вызванной активации рецептора [Hoxie et al., 1993; Hammes et al., 1999; Marchese et al., 2008; Schuerbach et al., 2008]. Это указывает на то, что АПС-вызванная

активация ПАР-1 может иметь пролонгированный характер, вызывая непрерывную передачу сигналов в отсутствие интернализации ПАР-1 [Griffin et al., 2018].

Различные эффекты тромбина и АПС объясняются как разными механизмами активации рецептора, так и привлечением разных вторичных посредников: тромбин сигнализирует через малые GTPase RhoA и ERK1/2, а АПС через RAC1, β -аррестин и P13K/Akt (Рисунки 13 и 16) [Griffin et al., 2015].

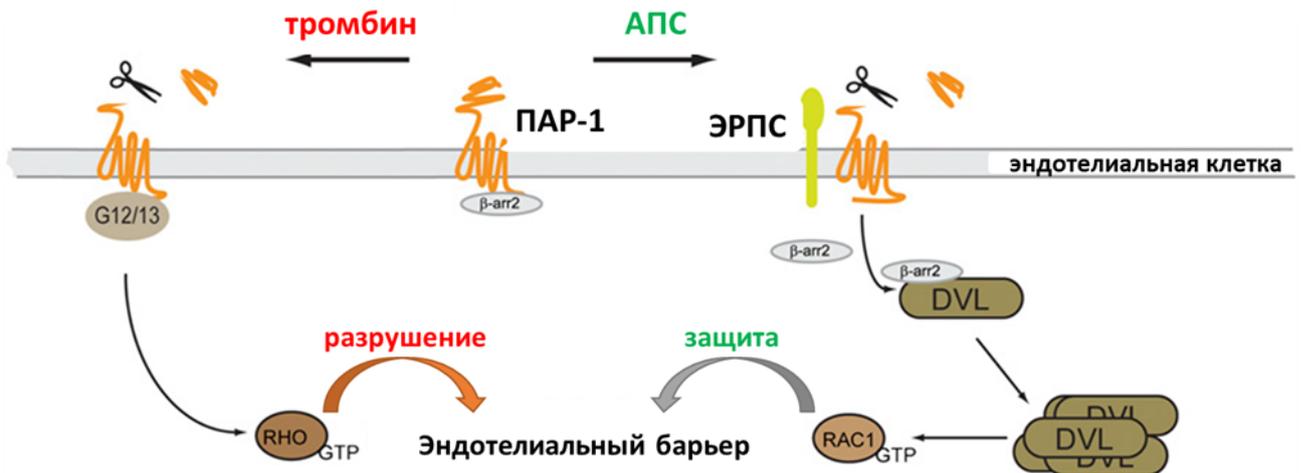


Рисунок 16. Зависимое от G-белка действие тромбина и β -аррестин-зависимый эффект АПС [Schulte, Shenoy, 2011; в модификации].

Показано, что ПАР-1, локализованные в кавеолах, связаны с β -аррестинами. Воздействие АПС ведет к диссоциации рецептора и адапторной молекулы. β -аррестин в свою очередь необходим для активации малой ГТФазы Rac1, что является ключевым механизмом в реализации цитопротекторного эффекта. Обнаружено, что связующим звеном между Rac1 и β -аррестинами является фосфопротеин DVL2, ассоциированный с неклассическими семидоменными трансмембранными рецепторами типа FZD («кудрявые» рецепторы) [Soh, Trejo, 2011].

В клетках эндотелия АПС запускает динамическую ассоциацию β -аррестина-2 с DVL2, в результате чего DVL2 полимеризуется. Это является необходимым условием активации Rac1 и реализации цитопротекторного действия. Однако, пока не понятно, как именно взаимодействие между β -аррестином и DVL2 запускает внутриклеточный каскад реакций. Так как действие АПС на ПАР-1 ведет к экспрессии таких протекторных генов, как, например, MCP1, эффекты, опосредованные β -аррестином-2, могут быть важны для оказания противовоспалительного и цитопротекторного действия.

Имеются сведения, что защитный эффект ПАР-1 требует трансактивации сигнального пути ПАР-2 [Kaneider et al., 2007].

Таким образом, активация ПАР-1 АПС и тромбином может по-разному связывать ПАР-1 с различными трансактиваторами в разных клетках. В подтверждение этой гипотезы было показано, что взаимосвязь ПАР-1 с сфингозин-1-фосфатным рецептором 1 (S1P1) вызывает защитный ответ [Feistritzer, Riewald, 2005], однако связь между ПАР-1 и S1P3 вызывают провоспалительные реакции [Niessen et al., 2008].

Так перекрестная активация АПС ПАР-1 и S1P1 активирует Rac1, что приводит к Rac1-зависимой стабилизации цитоскелета эндотелия [Feistritzer, Riewald, 2005].

И напротив, активация ПАР-1 высокими дозами тромбина приводит к разрушающим эндотелиальный барьер эффектам через S1P3-зависимый механизм (Рисунок 17) [van der Poll, Levi, 2012].

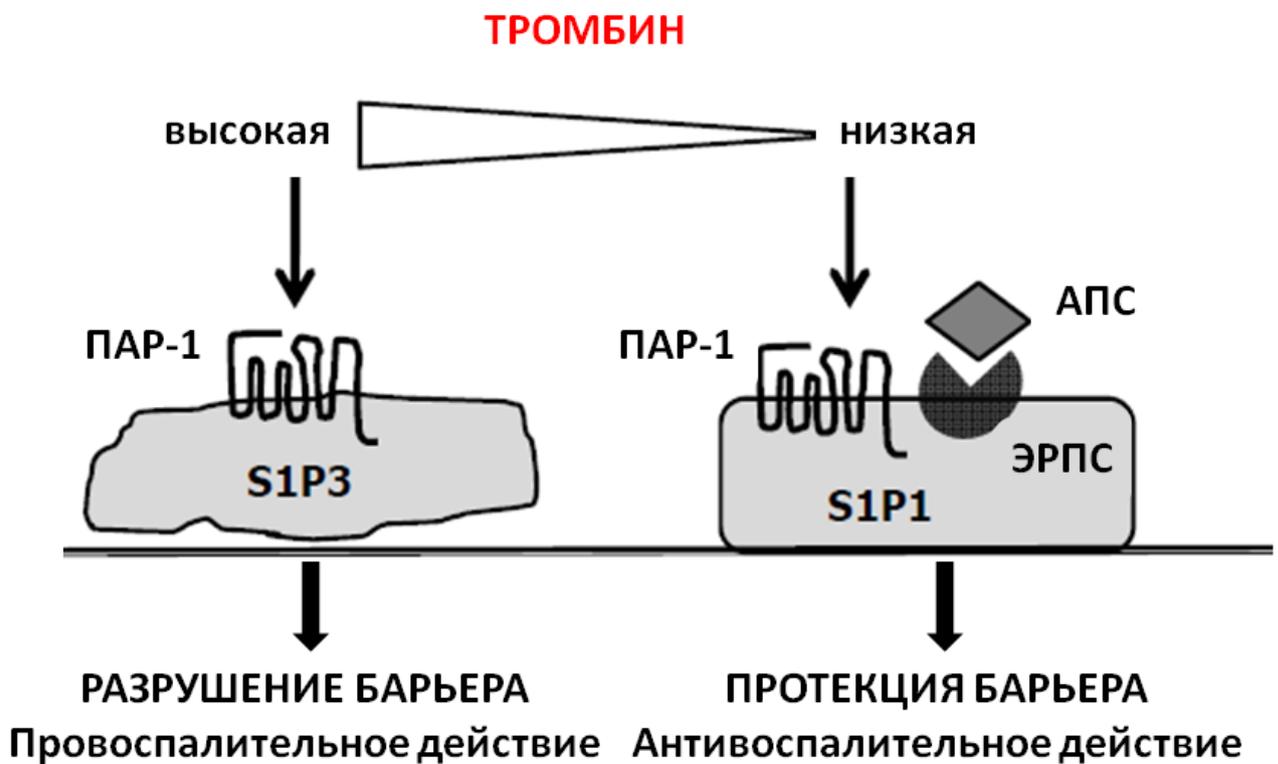


Рисунок 17. Активация ПАР-1 на эндотелиальных клетках тромбином в разных концентрациях, либо АПС [van der Poll, Levi, 2012; в модификации].

Таким образом, для ПАР-1 показано наличие множества конформаций с последующей ассоциацией либо с G-белками (G-protein bias), либо с β -аррестином (β -arrestin bias), либо с обоими (neutral bias), а также с различными конформерами GPCR, что индуцирует разные способы передачи сигналов. Смещенный агонизм диктуется типом лиганда, но смещенная сигнализация является свойством рецептора, и аллостерические модуляторы могут способствовать селективной стабилизации определенных конформаций ПАР-1, тем самым способствуя «сдвигу» ПАР-1, чтобы преимущественно индуцировать

β -аррестин-зависимые сигнальные каскады независимо от агониста [Rajagopal et al., 2010; Kahsai et al., 2016]. Это может дать объяснение нейропротекторному действию тромбина при очень низких концентрациях, в частности, когда протеин С связан с ЭРПС. Это явление иногда называют «EPCR occupancy» [Rezaie, 2011; Garcia et al., 2015; Roy et al., 2016].

1.3. НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ: ИНДУКТОРЫ, УЧАСТНИКИ И МЕХАНИЗМЫ

1.3.1. Тучные клетки – ключевые участники воспаления и их роль в нейровоспалении

Тучные клетки впервые охарактеризованы в 1878 году Нобелевским лауреатом-иммунологом Полом Эрлихом, который описал гистохимические свойства и различные морфологические фенотипы этих клеток [Beaven, 2009]. Мастоциты происходят из костного мозга, возникающего у человека из плюрипотентных клеток-предшественников CD34 + / CD117 + [Gilfillan et al., 2011]. В отличие от других клеток кроветворного происхождения, ТК мигрируют в виде предшественников, а их окончательное созревание происходит уже в тканях, снабженных сосудами [Hallgren, Gurish, 2007]. Зрелые тучные клетки в норме локализованы вблизи эпителия сосудов, нервных волокон, в желудочно-кишечном тракте. В зависимости от локализации тучные клетки могут быть соединительнотканными (содержащими химазу и триптазу) или мукозальными тучными клетками (слизистых оболочек), содержащими триптазу [Дугина и др., 2002]. Клетки иммунной системы слизистых оболочек относятся к системам адаптивного или врожденного иммунитета, а тучные клетки слизистых – первая линия защиты системы врожденного иммунитета. Они способны распознавать грибы, бактерии и вирусы за счёт присутствия на них патоген-ассоциированных молекулярных шаблонов (PAMPs), которые распознаются специальным классом рецепторов РРСС, включающим TLRs (Toll-like receptor). Помимо IgE-зависимой активации, тучные клетки также секретируют медиаторы и цитокины, факторы роста и хемокины в ответ и на другие стимулы, тем самым регулируя множество важнейших биологических процессов. Недавние исследования показали, что рецепторы для многочисленных лигандов, включая аденозин, С3а, иммунные комплексы, хемокины, цитокины, РАРР и др., способны усиливать FcεR1-опосредованную активацию ТК или непосредственно стимулировать высвобождение медиаторов в FcεR-зависимой манере [Ткаczyk et al., 2006].

Таким образом, можно выделить два разных типа активации ТК: 1) прямая активация патогенами, которая использует преимущественно экспрессию TLR;

2) косвенная активация патогенами через взаимодействие антигена с его специфическим антителом IgE, связанным с клеточной мембраной через высокоаффинный рецептор FcεRI. Косвенная активация позволяет ТК усиливать иммунный ответ во время инфекции [Traina, 2017].

Зрелые тучные клетки достаточно гетерогенны, их фенотип, развитие, дифференцировка и функциональная активность определяются микроокружением. Активация тучных клеток приводит к секреции ими широкого спектра либераторов.

Тучные клетки продуцируют множество медиаторов, включая биогенные амины (гистамин и серотонин), цитокины (IL-1, IL-6, фактор, ингибирующий лейкемию, TNFα, интерферон-γ, трансформирующий фактор роста-β и гранулоцитарно-микрофагальный колониестимулирующий фактор), ферменты (кислотные гидролизы, химаза, фосфолипазы, протеаза тучных клеток I и II крысы и триптаза), липидные метаболиты (простагландины, лейкотриены и фактор, активирующий тромбоциты), АТФ, нейропептиды (вазоактивный интестинальный пептид), факторы роста (фактор роста нервов (NGF)), оксид азота и гепарин [Johnson, Krenger, 1992]. Тучные клетки, как класс, неоднородны по спектру медиаторов и кинетике их высвобождения, и ни одна тучная клетка не производит сразу весь набор этих веществ.

ТК содержат множество гранул с предварительно сформированными медиаторами, секреция которых начинается уже через несколько секунд после активации тучных клеток (например, гистамин, серотонин, триптаза, гепарин, TNFα) [Silver, Curley, 2013]. За этим быстро следует синтез *de novo* липидных медиаторов (например, простагландинов, лейкотриенов, факторов роста). Наконец, ответ поздней фазы включает высвобождение вновь синтезированных цитокинов и хемокинов (например, TNFα, IL-6, IL-13) [Nelissen et al., 2013; Silver, Curley, 2013].

Паттерн многофазного ответа тучных клеток, при котором они высвобождают предварительно сформированный гранулированный материал в течение нескольких минут и вновь синтезированные медиаторы в течение следующих нескольких часов, позволяет им действовать как катализаторы, которые усиливают и пролонгируют многочисленные вазоактивные, нейроактивные и иммуноактивные клеточные и молекулярные реакции [Dong et al., 2014].

Тучные клетки экспрессируют множество рецепторов: включая toll-подобные рецепторы (TLR), цитокиновые рецепторы, тропомиозин-рецепторную киназу A, рецепторы комплемента [Nelissen et al., 2013; Dong et al., 2014; Redegeld et al., 2018], протеаза активируемые рецепторы (ПАР) и др., что позволяет им отвечать на широкий

спектр стимулов и участвовать в самых разных процессах, будь то восстановление тканей, воспаление или ангиогенез.

Тучные клетки экспрессируют ПАР и содержат целый ряд медиаторов воспаления, однако механизмы взаимодействия протеаз системы гемостаза с тучными клетками изучены недостаточно. Наличие на тучных клетках рецепторов ПАР отвечает за их реактивность в отношении тромбина и фактора Ха и определяет вклад тучных клеток в сопряжение процессов воспаления и свертывания [Strukova et al., 2001, 2006]. В нашей лаборатории ранее было установлено, что действие тромбина и пептидов-агонистов ПАР-1 (ПАР-1-АР) на тучные клетки реализуется через рецептор ПАР-1 и выявлена аутокринная регуляция оксидом азота ответа активированных тучных клеток на ПАР-1-АР [Умарова и др., 2000]. На модели острого перитонита у крыс выявлено усиление секреторного ответа тучных клеток на тромбин и ПАР-1-АР, что свидетельствует о дополнительной экспозиции ПАР-1 на тучных клетках в условиях острого воспаления [Dugina et al., 2003]. Показано, что действие АПС на тучные клетки реализуется через ПАР-1, поскольку десенситизация этих рецепторов отменяет вызванное АПС снижение секреции β -гексозаминидазы [Макарова и др, 2006].

Последнее время особый интерес представляет изучение механизмов активации и регуляции ТК мозга. Тучные клетки находятся в головном мозге всех изученных видов млекопитающих [Silver et al., 1996] и расположены в мозговых оболочках и периваскулярных областях со стороны мозга от гематоэнцефалического барьера [Khalil et al., 2007] и паренхимы таламической и гиппокампальной областей [Silver et al., 1996; Taiwo et al., 2005; Hendrix et al., 2006]. Кроме того ТК часто обнаруживаются в непосредственной близости от нервов [Stead et al., 1989]. При стимуляции молекулы-мессенджеры, высвобождаемые из нервов (например, нейропептиды), могут вызывать дегрануляцию ТК, но также медиаторы, происходящие из ТК (например, гистамин, серотонин), могут модулировать нейротрансмиссию [Weinreich et al., 1992], создавая двунаправленную положительную петлю обратной связи, которая может привести к нейрогенному воспалению [Kowalski, Kaliner, 1988].

Существует обширная связь между иммунной и центральной нервной системами (ЦНС). Провоспалительные цитокины играют ключевую роль в этом общении. Появляется осознание того, что глия и микроглия (которые являются резидентными макрофагами мозга), являются важным источником медиаторов воспаления и могут играть фундаментальную роль в нарушениях ЦНС. Микроглия также реагирует на провоспалительные сигналы, высвобождаемые другими ненейронными клетками, главным образом иммунного происхождения, такими как ТК. Тучные клетки находятся в

ЦНС и способны мигрировать через гематоэнцефалический барьер в ситуациях, когда барьер нарушен в результате патологии ЦНС. Тучные клетки являются как сенсорами, так и эффекторами в коммуникации между нервной, сосудистой и иммунной системами. Они первыми реагируют, выступая в роли катализаторов и рекрутеров, чтобы инициировать, усиливать и продлевать другие иммунные и нервные реакции при активации. Возможная роль ТК в нейродегенеративных расстройствах, таких как рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и аутизм, приобретает все больший интерес. Тучные клетки могут играть ключевую роль в лечении системного воспаления или блокады сигнальных путей от периферии к мозгу [Dong et al., 2014].

Одним из примеров является работа Донга, в которой было показано, что интраперитонеальная инъекция 1 мг/кг ЛПС вызывает активацию ТК в гипоталамусе и когнитивную дисфункцию у крыс, и этот процесс может быть подавлен стабилизатором тромбоцитов кромолином. Между тем, инъекция ЛПС индуцировала значительную активацию микроглии через 24 ч в гипоталамусе мышей дикого типа, но оказала незначительное влияние на линию с дефицитом тучных клеток [Dong et al., 2019].

Стабилизация тучных клеток у крыс ингибирует ЛПС-индуцированную активацию микроглии, высвобождение воспалительных факторов и активацию сигнальных путей MAPK, AKT и NF-κB [Dong et al., 2019].

ТК головного мозга немногочисленны и имеют преимущественно триптазо-химазо-положительный фенотип [Bañuelos-Cabrera et al., 2014]. Тем не менее, их количество и распределение могут резко измениться в ответ на ряд раздражителей окружающей среды, таких как травма и стресс [Silver, Curley, 2013].

Увеличение числа ТК в ЦНС было обнаружено при некоторых заболеваниях ЦНС, таких как инсульт и рассеянный склероз [Jin et al., 2009; Kim et al., 2010]. Кроме того, инфильтрированные триптазосодержащие ТК были обнаружены в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера [Maslinska et al., 2007]. Недавно было показано, что тучные клетки могут способствовать разрушению ГЭБ при очаговой ишемии у мышей [McKittrick et al., 2015].

Механизм разрушения ТК ГЭБ и деградации базальной ламины может вовлекать вазоактивные и разрушающие матрикс компоненты ТК, такие как гепарин, гистамин, серотонин, оксид азота, вазоактивный интестинальный пептид, пептид, связанный с геном кальцитонина (CGRP), сосудистый эндотелиальный фактор роста и цитокины, включая TNFα, который, в свою очередь, индуцирует экспрессию молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) и позволяет лейкоцитам проникать в пораженные ткани (Рисунок 18) [Lindsberg et al., 2010; Brown, Hatfield, 2012; Nelissen et al., 2013].

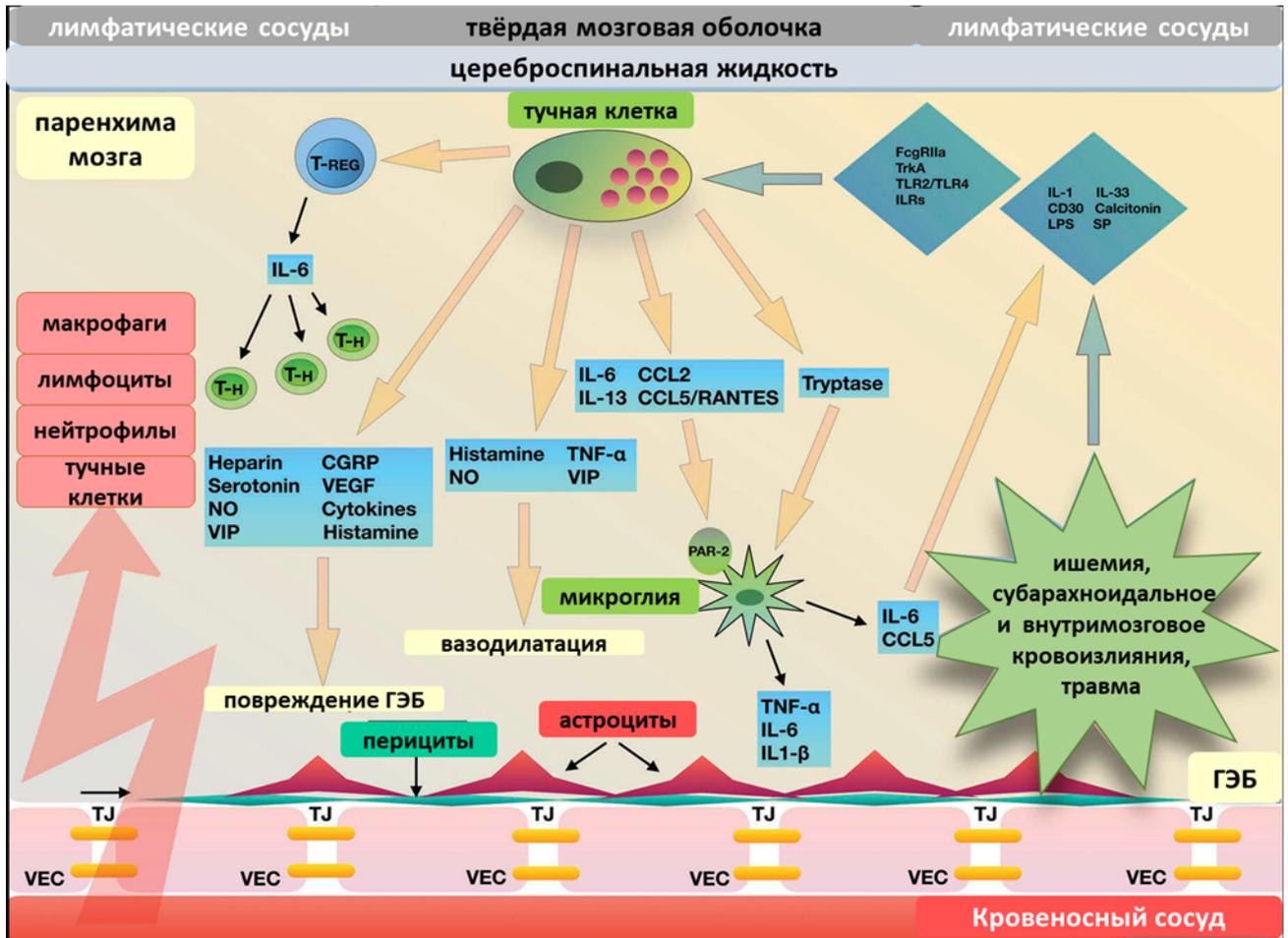


Рисунок 18. Медиаторы, высвобождаемые из активированных тучных клеток после повреждения головного мозга. CCL = хемокиновый лиганд, CGRP = кальцитонин-ген-связанный пептид, FcγRIIa = Fc-гамма-рецептор IIa, LPS = липополисахарид, SP = вещество P, Т-н: Т-лимфоцитов (Т-хелперы), TJ = плотное соединение, TLR = Toll-подобный рецептор, T-REG = регуляторные Т-лимфоциты, TrkA = тропомиозин-рецепторная киназа А, VEC = эндотелиальная клетка сосуда, VEGF = фактор роста эндотелия сосудов, VIP = вазоактивный интестинальный пептид [Ocak et al., 2018; в модификации].

ТК головного мозга участвуют в регуляции острой микрососудистой активации MMP-2 и -9 и последующего разрушения ГЭБ после транзиторной церебральной ишемии [Mattila et al., 2011]. Примечательно, что ТК могут давать приблизительно 90% гистамина таламуса и до 50% общего гистамина мозга у крыс [Goldschmidt et al., 1985]. Существуют данные о возможности регуляции проницаемости ГЭБ гистамином мозга [Dong et al., 2014].

Увеличение числа ТК в мозге связано с их миграцией. Уже во время развития ТК попадают в мозг путем миграции по кровеносным сосудам [Skaper et al., 2014]. Также

зрелые ТК способны мигрировать с периферии в мозг [Silverman et al., 2000; Nautiyal et al., 2011].

Существуют убедительные доказательства того, что ТК могут проникать через ГЭБ и нарушать его целостность при состояниях воспаления и инфекции [Nautiyal et al., 2011].

Помимо негативного влияния, ТК способствуют нормальному формированию высших психических функций, таких как поведенческие реакции, познание и эмоции. Активация ТК FcεRI-опосредованными сигналами, лигандами TLR и фактором роста нервов, приводит к синтезу и высвобождению ангиогенина, который способствует выживанию и нейрогенезу моторных нейронов [Kulka et al., 2009]. Более того, ТК гиппокампа могут продуцировать серотонин, который участвует в гиппокампозависимом поведении и потенцирует нейрогенез у мышей [Nautiyal et al., 2012]. Кроме того, активация ТК мозга приводит к нейроэндокринологическим последствиям, таким как активация оси гипоталамус-гипофиз-надпочечник [Theoharides, 2017].

Таким образом, роль ТК в мозге многогранна и ещё не конца ясна. При этом большое значение для функционирования ЦНС имеет, по-видимому, баланс между положительным и негативным влиянием ТК.

Хотя некоторые воспалительные стимулы вызывают полезные эффекты (например, фагоцитоз дебриса и апоптотических клеток), а воспаление связано с процессами восстановления тканей, неконтролируемое воспаление может приводить к выработке нейротоксических факторов, которые усиливают развитие патологического состояния. Цитокины, высвобождаемые некротическими нейронами, индуцируют дальнейшую активацию ТК, микроглии и астроцитов, что приводит к появлению петель положительной обратной связи, которые могут стать независимыми от исходных индуцирующих молекул, которые необходимы для инициирования воспалительных реакций в мозге [Dong et al., 2014].

Hendriksen et al. [2017] предложили основу для характеристики роли тучных клеток в нейровоспалении: (1) Взаимодействия с микроглией, астроцитами и нейронами [Skaper et al., 2014] (2) Влияние на проницаемость гематоэнцефалического барьера [Hendriksen et al., 2017] (3) Влияние на нейрогенез: пролиферацию, дифференцировку и миграцию [Molina-Hernández, Velasco, 2008; Borsini et al., 2015] (4) Влияние на нейродегенерацию: гибель нейронов, синаптическую дисфункцию, эксайтотоксичность [Kempuraj et al., 2017].

1.3.2. Взаимосвязь ключевых участников нейровоспаления: тучные клетки, глия и нейроны

Нейродегенерация, прогрессирующая дисфункция и потеря нейронов в ЦНС, являются основными причинами когнитивной и моторной дисфункции. В настоящее время появляются новые данные, указывающие на более активную роль нейровоспаления в возникновении и прогрессировании патофизиологии мозга, при этом глия играет ключевую роль в нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона, и может даже способствовать развитию рассеянного склероза, амиотрофического бокового склероза, инсульта и психоневрологического расстройства. Инициирование и распространение нейровоспаления, по-видимому, во многом зависит от взаимодействия между глией, иммунными клетками и нейронами, хотя связь между глией и иммунными клетками требует детального изучения [Dong et al., 2014].

Микроглия и астроциты являются основными участниками патогенного процесса и, как известно, отвечают на провоспалительные медиаторы, высвобождаемые из иммунных клеток, таких как ТК. ТК находятся в мозге и являются важным источником воспалительных молекул. Взаимодействие ТК с глиальными клетками и нейронами приводит к высвобождению медиаторов, таких как цитокины, протеазы и активные формы кислорода. Во время нейровоспаления избыточные уровни этих медиаторов могут влиять на нейрогенез, нейродегенерацию и проницаемость ГЭБ. ТК считаются инициаторами и модуляторами иммунных реакций в мозге [Hendriksen et al., 2017].

Потенциальные механизмы взаимодействий между ТК и микроглией были исследованы *in vitro* в ряде лабораторий [Skaper et al., 2012]. Показано, АТФ вызванная активация рецепторов P2 микроглии стимулирует высвобождение IL-33, который связывается с рецепторами ТК, вызывая высвобождение IL-6, IL-13 и моноцитарного хемо-аттрактантного белка 1, который, в свою очередь, может регулировать активность микроглии. Точно так же высвобождаемая из ТК триптаза индуцирует активацию микроглии посредством сигнальных путей ПАР-2-МАРК-NF-κB [Zhang et al., 2012], облегчая высвобождение провоспалительных медиаторов, таких как TNFα, IL-6, и активных форм кислорода, которые, следовательно, усиливают экспрессию рецепторов ПАР-2 на ТК [Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2012].

Кроме того, микроглия конститутивно экспрессирует все 4 типа рецептора гистамина (H1R, H2R, H3R и H4R), в свою очередь, гистамин в зависимости от дозы избирательно повышает экспрессию H1R и H4R в первичной культуре микроглии. Гистамин также может дозозависимо стимулировать активацию микроглии и, как

следствие, продукцию провоспалительных факторов $\text{TNF}\alpha$ и IL-6. [Dong et al., 2014]. Гистамин-индуцированная активация микроглии запускается через H1R и H4R-МАРК и PI3K/AKT-NF- κ B сигнальные пути [Dong et al., 2014].

ТК продуцируют огромное количество медиаторов, которые включают биогенные амины, цитокины, ферменты, липидные метаболиты, АТФ, нейропептиды, факторы роста и оксид азота [Skaper et al., 2014].

АТФ является мощным стимулом для микроглии. Экспрессия различных подтипов рецепторов P2 может варьировать в зависимости от вида и источника ТК [Bulanova, Bulfone-Paus, 2010]. АТФ из одной ТК может распространяться на несколько сотен микрометров, вызывая повышение уровня Ca^{2+} в соседних клетках [Osipchuk, Cahalan, 1992]. Микроглия, чьи Toll-подобные рецепторы были активированы патоген-ассоциированными молекулярными структурами, реагирует на АТФ с высвобождением IL-33, который впоследствии может связываться с родственным ему рецептором ТК и индуцировать секрецию воспалительных молекул для модуляции активности глиальных клеток (IL-6, IL-13 и CCL2) [Skaper et al., 2017].

Взаимодействия между астроцитами и ТК также возможны, поскольку они имеют периваскулярную локализацию [Kim et al., 2010; Silver, Curley, 2013].

Медиаторы воспаления, секретируемые ТК, могут активировать астроциты. Астроциты – тип глиальных клеток, которые участвуют в формировании и функционировании синапсов, регуляции гомеостаза нервной ткани, а также могут высвобождать провоспалительные сигнальные молекулы при стимуляции [Lyman et al., 2014; Rodrigues et al., 2014]. Такая «цепная» иммунная реакция может вызвать потенциально неблагоприятную воспалительную среду, что приводит к необратимому повреждению нейронов и нарушению ГЭБ [Lehnardt, 2010; Rodrigues et al., 2014].

In vitro было показано, что совместное культивирование ТК и астроцитов приводит к высвобождению нескольких медиаторов, таких как гистамин и лейкотриены, через взаимодействия CD40-CD40L [Kim et al., 2010]. Кроме того, продуцирование цитокинов и хемокинов (например, IL-6, $\text{TNF}\alpha$, MCP-1 и CCL5) индуцируется посредством двунаправленной активации астроцитов и ТК [Kim et al., 2010; Kim et al., 2011]. Кроме того, астроциты экспрессируют IL-33, который выделяется при повреждении [Yasuoka et al., 2011; Saluja et al., 2015]. IL-33 считается тревожным цитокином, который, стимулируя ТК, предупреждает врожденный иммунный ответ. IL-33 может активировать как микроглию, так и ТК через рецептор ST2, с помощью которого он способствует пролиферации микроглии и стимулирует ТК к продуцированию IL-6, IL-8 и IL-13

[Iikura et al., 2007; Moulin et al., 2007; Gadani et al., 2015]. Как и микроглия, астроциты экспрессируют гистаминовые рецепторы (H1R, H2R и H3R), через которые ТК могут влиять на активность астроцитов [Hösli et al., 1984; Mele, Jurič, 2013; Silver, Curley, 2013]. Недавно Патель с соавторами продемонстрировали, что гистамин индуцирует продукцию матриксной металлопротеиназы (ММП)-9 в культуре астроцитов человека через рецептор H1 [Patel et al., 2016].

Астроциты являются наиболее распространенными клетками в ЦНС и организованы в непрерывную и непересекающуюся анатомическую структуру. Они играют ключевую роль в облегчении связи между нейронами и другими астроцитами [Pappura et al., 1994; Nedergaard et al., 2003].

Кроме того, астроциты имеют механочувствительные ионные каналы, которые открываются в результате травматического повреждения, приводящего к увеличению внутриклеточного Ca^{2+} [Rzigalinski et al., 1997]. Эта волна Ca^{2+} приводит к высвобождению АТФ, который действует как внеклеточный мессенджер, который в конечном итоге играет роль в миграции и активации микроглии [Stout et al., 2002; Davalos et al., 2005]. При активации в астроцитах наблюдается перестройка белков цитоскелета, что указывает на необходимость этих белков для надлежащей инициации и поддержания реактивного астроглиоза [Burda et al., 2016]. Активация TLR2/TLR4 ТК запускает высвобождение цитокинов, что ведет к рекрутированию иммунных клеток в область повреждения; при этом вовлечение микроглии опосредуется через TLR2/TLR4-зависимые сигнальные пути [Brzezińska-Baszczyk et al., 2011; Aguirre et al., 2013]. Активация ТК усиливает экспрессию хемокинов (например, CCL5 / RANTES), что также может вызывать провоспалительный ответ в микроглии. Кроме того, полученные из микроглии IL-6 и CCL5, в свою очередь, могут влиять на экспрессию TLR2 / TLR4 в ТК [Skaper et al., 2017].

Активированные ТК также могут потенцировать нейродегенерацию во время нейровоспаления. Обнаружено, что инактивация ТК замедляет нейродегенерацию в смешанных культурах нейронов-глии.

Полученный из ТК TNF α , в сочетании с другими цитокинами, индуцирует высвобождение NO астроцитами, что приводит к нейротоксичности [Skaper et al., 2002; Hendrix et al., 2013].

В нервной ткани ТК и нейроны колокализированы и пространственный зазор между ними составляет менее 20 нм. Совместная локализация ТК и нейронов необходима для нейроиммунных взаимодействий. Подобное взаимодействие поддерживается с помощью молекул клеточной адгезии 1 (CADM1), экспрессирующихся в нейронах и ТК

[Nagiyama et al., 2011]. Медиаторы, высвобождаемые ТК, могут регулировать функциональную активность нейронов. К примеру, NGF (фактор роста нервов) необходим для дифференцировки и выживаемости нервов. АТФ, высвобождаемый ТК, может активировать соседние сенсорные нейроны. Нейропептиды, секретируемые нейронами (субстанция Р), способствуют дегрануляции ТК.

ТК могут изменять внутреннюю среду нейронов, что указывает на новую форму нейроиммунного общения [Wilhelm et al., 2005]. Например, было высказано предположение, что ТК могут изменять чувствительность нейронов за счет трансгрануляции гепарина [Hendriksen et al., 2017].

Двунаправленное взаимодействие ТК и нейронов продемонстрировано в эксперименте по кокультивированию перитонеальных ТК и гиппокампальных нейронов. Показано, что деполяризация нейронов вызывала внутриклеточные колебания $[Ca^{2+}]_i$ в колокализованных с ними ТК. Кроме того, активация ТК антигеном или соединением 48/80, также приводила к изменению $[Ca^{2+}]_i$ в близлежащих нейронах. Кроме того, аппликация на нейроны медиаторного коктейля ТК вызывала рост $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах. При этом показано, что подобная связь опосредуется через NMDA рецептор-зависимый механизм [Flores et al., 2019].

Также существуют данные, что гистамин потенцирует NMDA-опосредованную синаптическую передачу и эксайтотоксичность в нейронах гиппокампа [Bekkers, 1993; Skaper et al., 2001].

Другим фактом взаимодействия ТК–нейроны является то, что нейроны крыс секретируют фактор стволовых клеток (SCF), цитокин, необходимый для выживания, пролиферации и дифференцировки ТК [Okayama, Kawakami, 2006]. SCF является фактором роста, который связывается с c-kit-рецептором тирозинкиназы на ТК. Кроме того, пептидергические нейроны модулируют активность ТК, секретируя нейромедиаторы; например, вещество Р очень эффективно индуцирует высвобождение гистамина из ТК мозга [Corrigan et al., 2016].

ТК могут действовать опосредованно через свои взаимодействия с глиальными клетками и нейронами (приводя к высвобождению молекул, таких как IL-6, IL-1 β и оксид азота), но также напрямую через высвобождение медиаторов (например, TNF α , гистамин, химазу) [Zhang et al., 2016]. В частности, ТК являются единственными клетками мозга, в которых хранится предварительно сформированный TNF α [McKittrick et al., 2015]. TNF α составляет почти 25% содержания гранул тучных клеток [Skaper et al., 2001].

Чрезмерная активация ТК и высвобождение провоспалительных медиаторов (например, TNF α и IL-1) может способствовать гиперстимуляции клеток мозга и развитию токсичности.

Эксайтотоксичность – гибель нейронов, вызванная чрезмерной или длительной активацией рецепторов глутамата, основного возбуждающего нейротрансмиттера ЦНС [Pickering et al., 2005; Olmos, Lladó, 2014]. Нарушение поглощения глутамата глиальными клетками приводит к его накоплению во внеклеточном пространстве, что может привести к гиперстимуляции рецепторов глутамата [Pickering et al., 2005]. Цитокины, связанные с нейровоспалением, особенно TNF α и IL-1, могут влиять на глутаматергический ответ [Viviani et al., 2014]. Физиологический уровень TNF α необходим для реализации синаптической пластичности, что опосредуется изменением эффективности ионного транспорта через ионотропные рецепторы. TNF α в высокой концентрации ингибирует транспортеры глутамата на астроцитах, что приводит к повышению концентрации медиатора в паренхиме ЦНС [Pickering et al., 2005; Zou, Crews, 2005; Olmos, Lladó, 2014]. Таким образом, TNF α способен усиливать нейротоксичность глутамата [Zou, Crews, 2005] и увеличивать гибель нейронов гиппокампа при эксайтотоксичности *in vitro* и *in vivo* [Zhu et al., 2010]. Помимо TNF α , IL-1 β может также индуцировать глутаматную эксайтотоксичность [Fogal, Hewett, 2008]. Гистамин, напротив, может снижать содержание внеклеточного глутамата, что приводит к нейропротекции от эксайтотоксичности. Фанг и соавторы установили, что гистамин защищает от индуцированной глутаматом гибели нейронных клеток путем активации транспортера глутамата GLT-1 на астроцитах через H1 рецептор гистамина [Fang et al., 2014].

Подводя итоги, можно сказать, что нейровоспаление обладает рядом уникальных характеристик. Во-первых, представителями врожденного иммунитета являются микроглия и ТК, а также иммунокомпетентные астроциты [Xanthos, Sandkühler, 2014]. Во-вторых, проницаемость микроциркуляторного русла ЦНС для компонентов плазмы и клеток крови ограничена ГЭБ [Xanthos, Sandkühler, 2014]. Хотя воспаление является защитным и высокорезультативным ответом, длительное нейровоспаление может приводить к пагубным последствиям, включая изменения в паренхиме головного мозга, изменения ГЭБ, повышенную возбудимость и гибель нейронов [Bañuelos-Cabrera et al., 2014; Dong et al., 2014; Lyman et al., 2014]. Стойкое нейровоспаление в настоящее время признано механизмом, который может способствовать или даже вызывать повреждение ЦНС, связанное с патогенезом некоторых нейродегенеративных заболеваний [Lehnardt, 2010; Lyman et al., 2014].

Поэтому нейровоспаление все больше привлекает внимание как мишень для лечения заболеваний головного мозга [Silver, Curley, 2013; Skaper et al., 2014].

Таким образом, способность модуляции активности иммунокомпетентных клеток (ТК и астроцитов) и нейронов в ЦНС играет важную роль при терапии нейровоспаления и нейродегенеративных заболеваний. Нейровоспаление может быть результатом нарушения взаимодействия или чрезмерного воздействия экзогенных факторов на связь микроглии-астроцитов-тучных клеток (Рисунок 19).

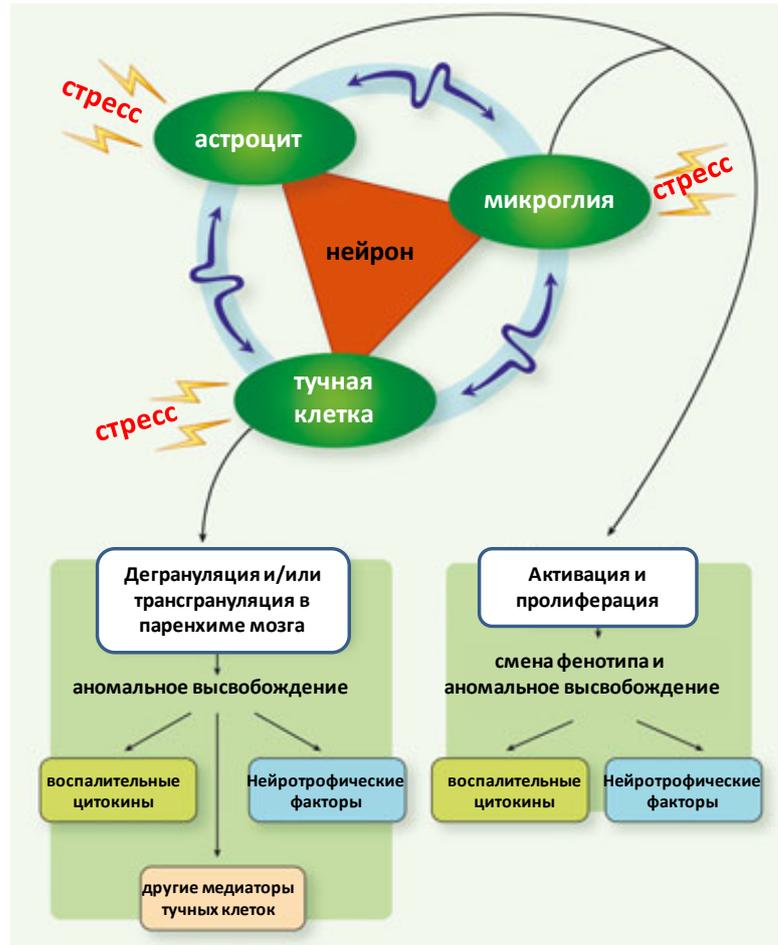


Рисунок 19. Взаимодействие тучных клеток с клетками микроглии и астроцитами [Skaper et al., 2014; в модификации].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. ОСНОВНЫЕ ПРЕПАРАТЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В РАБОТЕ

Активированный протеин С, тромбин человека, персульфат аммония (PSA), диметилсульфоксид (DMSO), ортофталевый альдегид, гистамин, липополисахарид из *E.coli* (ЛПС), ионофор A23187, глутамат, папаин, ДНКаза, ДНК-тропный краситель DAPI, ингибиторы протеаз и фосфатаз, лизирующий буфер RIPA, 4-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминид (Sigma, США); NaOH, HCl, Na₃PO₄, NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, KH₂PO₄, NaH₂PO₄, HEPES, DMEM, NBM, параформальдегид, инактивированная эмбриональная телячья сыворотка HI FBS, раствор Хенкса без кальция и без магния HBSS –Ca²⁺, –Mg²⁺, трипсин-ЭДТА L-глутамин, пенициллин/стрептомицин, GlutaMax, SupplementB-27 (Gibco, Invitrogen, США); МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолийбромид), ЭГТА, иономицин, Тритон X-100, Fura-2/AM Syto 59, Pluronic F-127 (Molecular Probes, США); реактив для измерения клеточной пролиферации WST-1, набор реактивов для измерения содержания LDH (CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, США); антитела: первичные анти-ThrombinR антитела (АТАР2), анти-ЭРПС антитела (p-20), анти-ПАР2 антитела (SAM11) (SantaCruz, США); вторичные антитела AlexaFluor 488, AlexaFluor 555, анти-GAPDH антитела (Millipore, США); Rat TNF α ELISA kit, Rat IL-6 ELISA kit (ab100772, Abcam, Великобритания); раствор Версена (Панэко, Россия); среда α -MEM (Панэко, Россия); TNF α (Jena Bioscience GmbH, PR-431); реагент Бредфорда (Bio-Rad, США); хемилюменисцентный набор ECL (Thermo Scientific, США).

Синтез пептида-агониста ПАР-1 (АП9) (NPNDKYEPF-амид) был осуществлен в лаборатории синтеза пептидов ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ М.В. Сидоровой по стандартной технологии пептидного синтеза на твердой фазе с применением методологии Fmoc-(9-флуоренилметоксикарбонил). Структура пептида подтверждена данными 1H-ЯМР-спектроскопии, а гомогенность – данными аналитической ВЭЖХ.

2.2. МЕТОДЫ

В работе использовали самцов беспородных крыс весом 200 – 300 г и новорожденных самцов крыс линии Wistar.

Экспериментальные протоколы одобрены Комитетом по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова (протокол № 2014-10-23-93-0-3). Все эксперименты выполнены согласно Директиве 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза.

2.2.1. Выделение тучных клеток из брюшной полости крыс

[Uvnäs, Thon, 1959; в модификации]

Животных (беспородных белых крыс весом 200 – 300 г) наркотизировали эфиром, декапитировали и обескровливали. В брюшную полость вводили 10 мл 145 мМ раствора NaCl, забуференного 10 мМ HEPES (pH 7.4), брюхо мягко массировали в течение 1 - 2 мин. Перитонеальную жидкость собирали, пробирку с клетками помещали на лед во время проведения работы, а затем центрифугировали в течение 10 мин при 800 об/мин. Супернатант отбрасывали, осадок суспендировали в 2 мл буфера. ТК очищали на двухступенчатом градиенте фиколла (35% и 25% плотности) центрифугированием при 4°C и 1200 об/мин. Двухступенчатый градиент фиколла готовили следующим образом: на слой 35% фиколла (2 мл) наносили 3 мл 25% фиколла, растворенного в Na-HEPES-буфере (pH 7.4), содержащем 145 мМ NaCl, сывороточный альбумин (1 мг/мл) и глюкозу (2мг/мл). Пул ТК при центрифугировании концентрируется на границе раздела растворов фиколла. Клетки осторожно отбирали пипеткой из 25% фиколла, переносили в пробирку со сбалансированным раствором (3 мл) следующего состава (в мМ): NaCl 145, HEPES 10, KCl 5, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, глюкоза 5, 0.1% сывороточного альбумина; pH 7.4 и промывали. После каждого промывания клетки центрифугировали в течение 10 мин при 1000 и 800 об/мин, соответственно. Осадок ТК после последнего промывания ресуспендировали в малом объеме сбалансированного раствора (2 мл). Количество ТК, предварительно окрашенных толуидиновым синим, подсчитывали в камере Горяева. Количество ТК определяли по формуле: $N = a \times 2.5 \times c \times 10^5$, где N – общее количество ТК в 1 мл, а – среднее количество ТК в большом квадрате, с – разведение.

2.2.2. Определение гистамина, секретируемого перитонеальными тучными клетками

[Shore et al., 1959; в модификации]

Метод определения гистамина основан на реакции конденсации гистамина с ортофталевым альдегидом, в результате которой образуется флюоресцирующий комплекс.

Клеточную суспензию (по 500 – 600 тысяч клеток) инкубировали с исследуемыми веществами в течение часа при 37°C. Реакцию останавливали трехкратным объемом ледяного сбалансированного раствора на льду. Далее пробы центрифугировали при 400g 10 мин, супернатант отбирали и переносили в охлажденные центрифужные пробирки (Eppendorf). Осадок ресуспендировали в сбалансированном буфере и разрушали кипячением на водяной бане в течение 5 мин, затем вновь центрифугировали 10 мин при 400g и отбирали супернатант для анализа остаточного гистамина в клетках. Для определения содержания гистамина к 500 мкл пробы добавляли 100 мкл 1N NaOH, 25 мкл 0,1% раствора ортофталевого альдегида в 96% этаноле. Образовавшийся флуорофор стабилизировали подкислением раствора 50 мкл 3N HCl. После добавления каждого реактива смесь тщательно перемешивали. После чего переносили аликвоты по 100 мкл в 3 повторностях в 96-луночный планшет. Флуоресценцию измеряли на планшетном спектрофлуориметре Multilabel counter 1420, VICTOR2 PerkinElmer при 460 нм, возбуждая при 355 нм. Для определения абсолютных значений высвобождения гистамина клетками строили калибровочную кривую (5; 2; 1; 0,8; 0,6; 0,45; 0,3; 0,15 мкг/мл гистамина).

Для каждой отдельной пробы рассчитывали долю высвободившегося гистамина в процентах. Высвобождение гистамина = (концентрация гистамина в супернатанте)/(концентрация гистамина в супернатанте + концентрация внутриклеточного гистамина). Влияние тестируемых веществ на уровень секреции гистамина представлено в относительных величинах, где доля высвобождаемого гистамина клетками контрольной группы (спонтанная секреция) принята за 1.

2.2.3. Измерение секреции гистамина клетками линии RBL-2H3

[Shore et al., 1959; в модификации]

Для индукции секреции гистамина клетки линии RBL-2H3 инкубировали с исследуемыми веществами 90 минут при 37°C, 5% CO₂. Реакцию останавливали помещением планшета на лёд. Анализ экстраклеточного гистамина проводили в клеточном супернатанте. Для определения внутриклеточного гистамина клетки разрушали 15 минутной инкубацией с 0.1% раствором детергента Тритона-X100. Метод определения гистамина основан на реакции конденсации гистамина с ортофталевым альдегидом, в результате которой образуется флуоресцирующий комплекс. Для определения содержания гистамина к пробам добавляли 1N NaOH и 0,1% раствор ортофталевого альдегида в 96% этаноле. Образовавшийся флуорофор стабилизировали подкислением раствора 3N HCl. Флуоресценцию измеряли на планшетном спектрофлуориметре Multilabel counter 1420, VICTOR2 PerkinElmer при 460 нм, возбуждая при 355 нм.

Для определения абсолютных значений высвобождения гистамина клетками строили калибровочную кривую (5; 2; 1; 0,8; 0,6; 0,45; 0,3; 0,15 мкг/мл гистамина).

Для каждой отдельной пробы рассчитывали долю высвободившегося гистамина в процентах. Высвобождение гистамина = (концентрация гистамина в супернатанте)/(концентрация гистамина в супернатанте + концентрация внутриклеточного гистамина). Влияние тестируемых веществ на уровень секреции гистамина представлено в относительных величинах, где доля высвобождаемого гистамина клетками контрольной группы (спонтанная секреция) принята за 1.

2.2.4. Измерение секреции β -гексозаминидазы (БГА) клетками линии RBL-2H3

[Schwartz et al., 1979; в модификации]

Для определения β -гексозаминидазы использовали метод, предложенный Schwartz [1979], в нашей модификации. Степень секреции перитонеальных тучных клеток и клеток линии RBL-2H3 определяли по расщеплению специфического хромогенного субстрата – 4-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминида. Субстрат в концентрации 4 мМ, растворенный в 0,04 М цитратном буфере (рН 4.5), содержащем 0.9 % NaCl добавляли в соотношении 1 : 1 к полученным образцам. Инкубацию с субстратом проводили в 96-луночном планшете в течении 2 часов при температуре 40°C. Реакцию останавливали добавлением равного объема 0.2 М Глицин-NaOH (рН 10.7) буфера. После добавления стоп-реагента раствор получал ярко-желтую окраску, интенсивность которой была пропорциональна содержащемуся в нем количеству β -гексозаминидазы. Оптическую плотность образцов измеряли на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» АИФР-01 (ЗАО «Пикон», Россия) при $\lambda = 405$ нм. Количество секретированной β -гексозаминидазы вычисляли по формуле: секреция = $X/(X + Y)$, где X – оптическая плотность образца, содержащего фермент, выделившийся во время инкубации клеток с агонистами, Y – оптическая плотность образца, содержащего фермент, выделившийся после разрушения клеток.

Влияние тестируемых веществ на уровень секреции БГА представлено в относительных величинах, где доля высвобождаемой БГА клетками контрольной группы (спонтанная секреция) принята за 1.

2.2.5. Биохимический метод оценки гибели клеток (МТТ-тест) и реагент WST-1

Основа МТТ метода при оценки содержания живых клеток в культуре – восстановление клетками солей тетразолия до сильно поглощающих в видимой области спектра формазанов [Mosmann, 1983]. МТТ (3 (4,5 диметил 2 тиазолил) 2,5-дифенил-2Н-

тетразолийбромид) восстанавливается до формазана митохондриями только живых клеток. Водный раствор МТТ (Molecular Probes, США) добавляли в культуральную среду до конечной концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали клетки 2 часа при 37°C, 5% CO₂. Растворение формазанов осуществляли с помощью DMSO (Sigma, США). Оптическую плотность измеряли на фотометре iMark (Bio-Rad, США) при 530 нм. Оценивали результаты в процентах по отношению к контролю.

Также для оценки содержания живых клеток использовали реактив WST-1, который так же восстанавливается под действием дегидрогеназ живых клеток в формазан, но в отличие от МТТ-теста не требует дальнейшего растворения кристаллов в DMSO. Это позволяет производить оценку, не нарушая структуры клеток.

Реактив WST-1 (Promega, США) добавляли в соотношении 1:10 к культуральной среде, в которой находятся клетки. Далее клетки инкубировали 2 часа при 37°C, 5% CO₂. Оптическую плотность измеряли при 450 нм.

При обработке данных оптическую плотность контрольной группы (клетки в бессывороточной культуральной среде и без воздействий) принимали за 1.

2.2.6. Оценка уровня некроза клеток по высвобождению лактатдегидрогеназы (LDH)

Лактатдегидрогеназа (LDH) – это стабильный цитозольный фермент, который высвобождается при нарушении целостности цитоплазматической мембраны клетки. Под действием лактатдегидрогеназы соли тетразолия превращаются в красный формазан. Интенсивность окрашивания культуральной среды пропорциональна количеству лизированных клеток, что позволяет оценить уровень некроза.

Для оценки уровня высвободившегося LDH использовали CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США). Отбирали 30 мкл клеточной среды, в которой находились клетки, в 96-ти луночный планшет, добавляли 30 мкл CytoTox 96 Reagent. Далее инкубировали 30 минут при комнатной температуре в темноте. Реакцию останавливали добавлением 30 мкл Stop Solution. Оптическую плотность измеряли при 490 нм на фотометре iMark (Bio-Rad, США).

При обработке данных оптическую плотность контрольной группы (клетки в бессывороточной культуральной среде) принимали за 1.

2.2.7. Иммуноцитохимическое окрашивание

Клетки, культивируемые на чашках Петри Glass Bottom (MatTek, США), промывали тёплым фосфатно-солевым буфером (PBS) и фиксировали в 4% параформальдегиде (15 минут). После отмывки (1x10 мин 120 мМ Na-фосфатом; 1x10 мин низкосолевым

буфером (150 мМ NaCl, 10 мМ Na₂HPO₄), 2x10 мин высокосолевым буфером (0,5 М NaCl, 20 мМ Na₂HPO₄) клетки пермибилизовали и блокировали неспецифическое связывание инкубацией в буфере FSBB, содержащем 0,1% Triton X-100, 5% FBS в PBS. Первичные антитела анти-ThrombinR (ATAР2) инкубировали с клетками в течение ночи при 4°C в FSBB. На следующий день культуры трижды отмывали от первичных антител высокосолевым буфером, затем в течение 1.5 часа инкубировали со вторичными антителами. Для оценки реорганизации F-актина Клетки инкубировали с фаллоидином (1:40), конъюгированным с Alexa 488. Далее клетки промывали (1x10 мин высокосолевым буфером (0,5 М NaCl, 20 мМ Na₂HPO₄); 1x10 мин 120 мМ Na-фосфатом; 1x10 мин 5 мМ Na-фосфатом). Для визуализации ядер к клеткам добавляли ДНК-тропный краситель SYTO 59 или DAPI (1:500), разведенные в 5 мМ Na₂HPO₄. Далее клетки анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 700 (ZEISS, Germany).

2.2.8. Вестерн-блоттинг

Для подтверждения данных иммуноцитохимии экспрессию рецептора ПАР-1 оценивали при помощи метода вестерн-блоттинга. Культуральные чашки Петри с клетками переносили на лёд, один раз отмывали холодным фосфатно-солевым буфером. Затем клетки лизировали с использованием буфера RIPA, содержащего ингибиторы протеаз и фосфатаз (Sigma, США). Лизаты собирали, инкубировали 30 мин и далее центрифугировали при 14 000 rpm, 40°C в течение 10 минут. Супернатанты аккуратно отбирали, измеряли содержание белка, замораживали и хранили на -70°C. При проведении ПААГ-электрофореза аликвоту лизата каждой группы добавляли к соответствующему объёму проб-буфера (12,5 мМ Tris/HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% глицерол, 0,025% бромфеноловый синий, 20% β-меркаптоэтанол, pH 6.8) и наносили в карманы геля. После разделения белков в ПААГ осуществляли перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану при 20 V, 0.4 A в течение часа. Мембрану блокировали и затем инкубировали с первичными антителами к ПАР-1 (1:100, Santa Cruz, США) в течение ночи при +40°C на шейкере. Далее несвязавшиеся антитела отмывали, мембрану инкубировали со вторичными HRP-антителами в течение 1,5 часов. После отмывки мембрану проявляли на плёнку, используя хемилюменисцентный набор ECL (Thermo Scientific, США). После мембрану инкубировали в растворе Stripping Buffer (Thermo Scientific, США) в течение 30 минут, отмывали, блокировали и инкубировали с анти-GAPDH антителами (1:300, Millipore, США) с последующей детекцией, как указано выше.

2.2.9. Измерение внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ измеряли методом флуоресцентной микроскопии с помощью высокоаффинного Ca^{2+} индикатора Fura-2 или Fluo-4 (Molecular Probes, США) [Grynkiewicz et al., 1985].

Перед экспериментом клетки нагружали ацетоксиметильным (AM) эфиром индикатора Fura-2 или Fluo-4 в культурной среде в течение 40 минут при 37°C в CO_2 -инкубаторе, добавляя индикаторы в концентрациях 1 – 2 мкМ. Для облегчения проникновения индикаторов сквозь клеточную мембрану загрузку осуществляли в присутствии «мягкого» неионного детергента Pluronic F-127 (0,02%) (Molecular Probes, США), затем культуру отмывали HEPES-солевым буфером и выдерживали в нем 10 - 15 минут для полной этерификации молекул индикатора.

Стекло с клетками помещали на столик микроскопа ZEISS (РНИМУ имени Н.И.Пирогова) в случае использования Fluo-4; или Olympus (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей», Минздрава России) при регистрации кальциевого сигнала с помощью Fura-2. Флуоресценцию Fura-2 возбуждали, облучая клетки поочередно светом с динами волн 340 и 380 нм в течение 100 – 200 мс, с интервалом 5 – 10 с; эмиссию регистрировали в диапазоне 505 - 535 нм. Изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ оценивали, как отношение интенсивности флуоресценции Fura-2 при возбуждении на 340 и 380 нм с учётом фонового излучения. Расчет внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} проводили, как описано в работе Grynkiewicz [Grynkiewicz et al., 1985]. Флуоресценцию Fluo-4 возбуждали, облучая клетки светом с длиной волны 488 нм в течение 100-200 мс, с интервалом 10-13 с; эмиссию регистрировали в диапазоне 505 – 535 нм. Данные Ca^{2+} -зависимой флуоресценции Fluo-4 представлены в виде относительных значений, полученных в результате нормирования флуоресцентного сигнала в каждой клетке на эффект иономицина, принятый за единицу.

2.2.10. Количественная оценка высвобождения TNF α и IL-6

Для оценки количества высвободившегося IL-6 через 12 часов после воздействия исследуемых веществ на первичную культуру астроцитов производили отбор культуральной среды из экспериментальных лунок планшета. Пробы анализировали на IL-6 с помощью ELISA в соответствии с инструкциями производителя (Abscam, Великобритания). Предел чувствительности IL-6 составляет 30 пг/мл.

Через 24 часа после воздействия исследуемых веществ отбирали культуральную среду, лунки промывали натрий-фосфатным буфером и производили лизирование клеток с помощью лизирующего буфера по ранее установленному протоколу. Лизаты центрифугировали при 14 000 g 15 минут при 4°C, после чего собирали супернатанты.

Измерение содержания TNF α в пробах производили с помощью ELISA в соответствии с инструкциями производителя (Abcam, Великобритания). Предел чувствительности TNF α составляет 25 пг/мл. Высвобождение TNF α было рассчитано как отношение концентрации TNF α в культуральной среде к сумме концентраций TNF α в культуральной среде и клеточных лизатах.

При кокультивировании первичной культуры астроцитов и клеток линии RBL-2H3 с использованием Transwell co-culture system через 6 часов после воздействия исследуемых веществ производили отбор культуральной среды из лунок (экстраклеточный для астроцитов) и из трансвеллов (экстраклеточный для RBL-2H3). Далее лизировали клетки согласно протоколу, описанному выше (лизат астроцитов (внутриклеточный для астроцитов) и RBL-2H3 (внутриклеточный для RBL-2H3)). Пробы анализировали на IL-6 с помощью ELISA в соответствии с инструкциями производителя (Abcam, Великобритания). Предел чувствительности IL-6 составляет 30 пг/мл. Формула для расчёта уровня секреции ИЛ-6, %: экстра / (экстра + внутри) * 100

2.2.11. Получение культуры гиппокампальных нейронов

[Gorbacheva et al., 2006]

Исследования проводили на первичных культурах нейронов гиппокампа (10 DIV), извлеченных из мозга 1 – 3 дневных крысят Wistar. Крысят линии Wistar декапитировали, извлекали гиппокампы из мозга, помещали в раствор Хенкса HBSS («Gibco», США) без Ca²⁺ и Mg²⁺, содержащий 1 мМ пируват натрия, 10 мМ HEPES (pH 7.2) и измельчали. Затем клетки переносили в PBS, содержащий DL-цистеин-HCl (0,2 мг/мл), бычий сывороточный альбумин (0,2 мг/мл), глюкозу (5 мг/мл), папаин (0,5 мг/мл, «Sigma»), DNAasa (0,01 мг/мл) и инкубировали при 37°C 5 – 10 мин. Далее клетки помещали и диспергировали в растворе Хенкса HBSS («Gibco», США) без Ca²⁺ и Mg²⁺, содержащем DNAasa (0,01 мг/мл) и центрифугировали при 200 g 4 минуты. Супернатант сливали, а к осажённым клеткам добавляли раствор Хенкса HBSS («Gibco», США) с Ca²⁺ и Mg²⁺, содержащий 1 мМ C₃H₃NaO₃, 10 мМ HEPES (pH 7.2), диспергировали и центрифугировали при 200 g 4 минуты. Полученный осадок ресуспензировали в нейробазальной среде для нейронов (NBM, «Gibco», США), содержащей 0,5 мМ L-glutamine, 2% Supplement B-27 и 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина («Gibco», США). Полученную суспензию клеток (1x10⁶ клеток/мл) (100 мкл на 1 стекло) переносили на чашки Петри Glass bottom, покрытые PEI (Sigma, USA). Через 1 ч (37°C, 5% CO₂) удаляли неприкрепившиеся клетки и добавляли 1.5 мл культуральной среды. Через 24 часа добавляли арабинозид (ARAC, 10⁻⁵ М) для подавления роста глиальных клеток, в результате доля глиальных клеток в

культуре не превышала 5%. Далее осуществляли смену 1/3 среды в клетках каждые 3 дня. Полученная культура содержала не более 5% глиальных клеток.

2.2.12. Кокультивирование гиппокампальных нейронов и перитонеальных тучных клеток

Экспериментальные воздействия.

ТК активировали, инкубируя их в течение 1 часа в присутствии ЛПС (1 мкг/мл, Sigma, L3024) или TNF α (50 нг/мл, Jena Bioscience GmbH, PR-431). Далее суспензию ТК (15 - 20 тыс. клеток) добавляли к культуре гиппокампальных нейронов, инкубировали в течение 30 минут, затем нейроны помещали в исходную культуральную среду. Выживаемость нейронов оценивали через 24 часа. Предобработку ТК протекторами (АПС (10 нМ) и АП9 (10 мкМ)) проводили за 15 мин до активации. «Выключение» ПАР-1 осуществляли с помощью селективного блокатора ПАР-1 – SCH 79797 (50 нМ) (или специфическими анти-ПАР-1-антителами, АТАР2, 20 мкг/мл) за 30 мин до последующей обработки клеток.

2.2.13. Морфологическая оценка гибели нейронов.

Выживаемость нейронов оценивали морфологически с использованием флуоресцентных красителей: Hoechst 33342 (ядерная фрагментация и конденсация, апоптоз) (Sigma, США), ДНК/РНК-тропного витального красителя SYTO-13 (Molecular Probes, США) и гомодимера этидия, проникающего только через поврежденную мембрану (некроз), через 24 часа после 30-мин воздействия суспензии активированных ТК. При апоптозе происходит фрагментация и конденсация хроматина, что обеспечивает более интенсивную флуоресценцию Hoechst 33342. В живых клетках хроматин распределен более равномерно по всему объему ядра, а интенсивность флуоресценции Hoechst 33342 ниже. Клетки с конденсированными и фрагментированными ядрами (т.е. с интенсивной флуоресценцией Hoechst 33342) относили к апоптотическим, их количество выражали в процентах от общего числа клеток. Окрашенные клетки визуально исследовали под флуоресцентным микроскопом (Axiovert 200 Zeiss, Германия).

Морфологическая оценка гибели клеток линии RBL-2H3 осуществлялась по протоколу, описанному выше.

2.2.14. Клеточная культура RBL-2H3

В работе были использованы культивируемые аналоги тучных клеток – клетки линии RBL-2H3 [Eccleston et al., 1973; Kulczycki et al., 1974]. Эта линия клеток была

получена из крыс линии Wistar с химически индуцированной базофильной лейкемией. Данные клетки экспрессируют рецепторы FcεRI и способны секретировать гистамин. Клетки обладают способностью к дегрануляции, т.е. к высвобождению ряда веществ, в частности, гистамина, связанных с иммунными реакциями. Клетки линии RBL-2H3 были взяты из ККК УНУ ИБР РАН.

Клетки выращивали на культуральных флаконах 25 см² в среде α-MEM, содержащей 0,5 mM L-glutamine, 10% HI FBS и 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина. Пассирование клеток осуществляли с использованием раствора Версена и 0.05% трипсина-ЭДТА один раз в три дня. Для экспериментов клетки культивировали на 96- и 48-луночных планшетах (по 5x10⁴ и 8x10⁴ клеток/лунку, соответственно) или на чашках Петри Glass Bottom (MatTek, США) (по 8x10⁴ клеток/стекло) при 37°C и 5% CO₂. Воздействия исследуемыми веществами осуществляли через 24 часа после нанесения клеточной суспензии на культуральные планшеты или чашки Петри.

2.2.15. Получение первичной культуры астроцитов крыс

[Ivanova et al., 2014]

Работа проводилась на первичной культуре астроцитов, полученных из мозга новорожденных или однодневных крысят линии Wistar. Крысят декапитировали, извлекали головной мозг, помещали его в раствор Хенкса HBSS («Gibco», США) без Ca²⁺ и Mg²⁺, содержащий DNAasa (0,01 мг/мл). Далее полушария отделяли от ствола мозга, удаляли гиппокамп и обонятельные луковицы, кортекс очищали от плёнок и сосудов и тщательно измельчали в камере Максимова. Измельчённый кортекс переносили в раствор папаина 5 Ед./мл (Sigma, США) и инкубировали при 37°C в течение 7 – 8 минут. По истечении времени инкубирования клетки отмывали от папаина раствором HBSS без Ca²⁺ и Mg²⁺ с добавлением DNAasa (0,01 мг/мл), проводили тщательное суспендирование и пропускали через нейлоновое сито. Суспензию клеток центрифугировали (1800 rpm, 8 мин, 4°C), осадок разводили в среде DMEM, с добавлением 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина и HI FBS 10% (Invitrogen, США). Суспензию с клетками рассеивали на культуральные фальконы площадью 75 см² и инкубировали в течение 10 дней при 37°C, 5% CO₂. При каждой смене питательной среды матрасы тщательно трясли от микроглии и олигодендроцитов. По истечении сроков инкубации астроциты снимали с матрасов раствором 0,05% трипсина-ЭДТА (Invitrogen, США) и рассеивали на чашки Петри Glass Bottom (MatTek, США) или культуральные планшеты. Далее астроциты инкубировали при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе в течение 2 дней. На 14 день

культивации астроцитов, среда замещалась на бессывороточную на ночь, для подготовки клеток к экспериментальным воздействиям.

2.3. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Статистический анализ данных проводился в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США) с помощью One-way ANOVA (с последующим применением теста Сидака для множественных сравнений) или Краскела-Уоллиса (с последующим применением теста Данна для множественных сравнений). Сравнение уровня цитозольного кальция проводили с помощью Two-way ANOVA (тест Даннета). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднего \pm стандартной ошибки среднего, n – число независимых экспериментов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ВЛИЯНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА КЛЕТКИ-УЧАСТНИКИ ВОСПАЛЕНИЯ

3.1.1. Особенности провоспалительной активации тучных клеток

3.1.1.1. Влияние провоспалительных факторов на секреторную активность тучных клеток

Известно, что ТК являются одними из ключевых регуляторов процесса воспаления в организме. Благодаря экспрессии множества рецепторов данный тип клеток способен отвечать на широкий спектр стимулов и участвовать в самых разных физиологических и патофизиологических процессах. Наиболее показательным критерием функциональной активации ТК является их дегрануляция. Известно, что секреция целого спектра медиаторов, в том числе гистамина и β -гексозаминидазы (БГА), происходит в ответ на воспаление и стимуляцию иммунными и неиммунными факторами. В связи с этим, выбор ТК в качестве объекта исследования про- и противовоспалительных свойств новых препаратов вполне обоснован. Более того, данный тип клеток относится к иммунной системе и принимает участие во всех видах острого и хронического воспаления, например, перитонита, нейровоспаления и т.д. ТК являются датчиками и эффекторами во взаимодействиях многих систем организма – нервной, сосудистой и иммунной. ТК обнаруживаются в головном мозге у позвоночных, в том числе у человека. В мозге они взаимодействуют с нейронами, глией, кровеносными сосудами и клетками крови через высвобождаемые нейроактивные вещества, преобразованные и вновь синтезированные [Nautiyal et al., 2012]. Несмотря на малочисленность ТК в головном мозге, они могут влиять на все компоненты нервно-сосудистого аппарата. Показано, что количество ТК увеличивается в полушарии, подвергнутой ишемии в остром периоде реперфузии после транзиторной окклюзии средней мозговой артерии, где они являются потенциальными инициаторами нейровоспаления и повреждения ГЭБ [McKittrick et al., 2015].

Для количественной оценки воспалительного ответа ТК производился анализ высвобождения гистамина и БГА при их активации специфическими провоспалительными факторами [TNF α (50 нг/мл), ЛПС (1 мкг/мл)] и неспецифическими – вещество 48/80 (0,8 мМ) и кальциевый ионофор A23187 (50 нМ) в комплексе с форболовым эфиром (РМА) (50 нМ).

TNF α является распространенным фактором, участвующим в различных патологических состояниях [Gorbacheva et al., 2009; Konanki et al., 2014], способствующим активации клеток. Результаты наших экспериментов показали, что активация ТК с помощью TNF α (60 мин) приводит к повышению уровня секреции в 4,6 раза по сравнению с контролем (Рисунок 20).

Бактерии и их продукты, такие как ЛПС, действуют на ТК, вызывая секрецию множества цитокинов, включая IL-1, TNF α , IL-18 и IL-33 и др. ЛПС усиливает Fc ϵ R1-опосредованную дегрануляцию клеток RBL-2H3 и перитонеальных ТК мыши в зависимости от дозы и времени [Yang et al., 2012].

ЛПС, взаимодействуя со своим рецептором TLR4, играет важную роль в воспалении и является фактором риска развития астмы, опосредованной ТК [Yamashita, Nakayama, 2008; Park et al., 2015]. Кроме того, ЛПС/TLR4 активация ТК приводит к генерации цитокинов Т-хелперами 2 типа, потенцируя аллергическое воспаление [Enoksson et al., 2011].

Нами обнаружено, что обработка клеток ЛПС (90 мин) также способствовала повышению секреторной активности ТК в 1,3 раза относительно группы неактивированных клеток (Рисунок 20).

Таким образом, наиболее значимым специфическим активатором ТК выступил фактор некроза опухоли. Среди неспецифических провоспалительных факторов подобный эффект вызвала инкубация клеток с ионофором A23187 в комплексе с форболовым эфиром (24 часа). Кальциевый ионофор способствует повышению внутриклеточной концентрации кальция, образуя поры в мембране клеток, в то время как форболовый эфир легко проникает в клетку и, имея структурное сходство с диацилглицерином, взаимодействует с его участком связывания на молекуле PKC [Nishizuka, 1988], также способствуя росту внутриклеточного кальция. В нашей работе сочетанное воздействие A23187 и PMA способствовало повышению уровня дегрануляции в 4,9 раз.

Соединение 48/80 является дегранулятором, который активирует тучные клетки через связанный с G-белком рецептор Mrgprb2/MRGPRX2 [McNeil et al., 2015]. В нашей работе вещество 48/80 приводило к повышению уровня секреции в 2,8 раза (Рисунок 20).

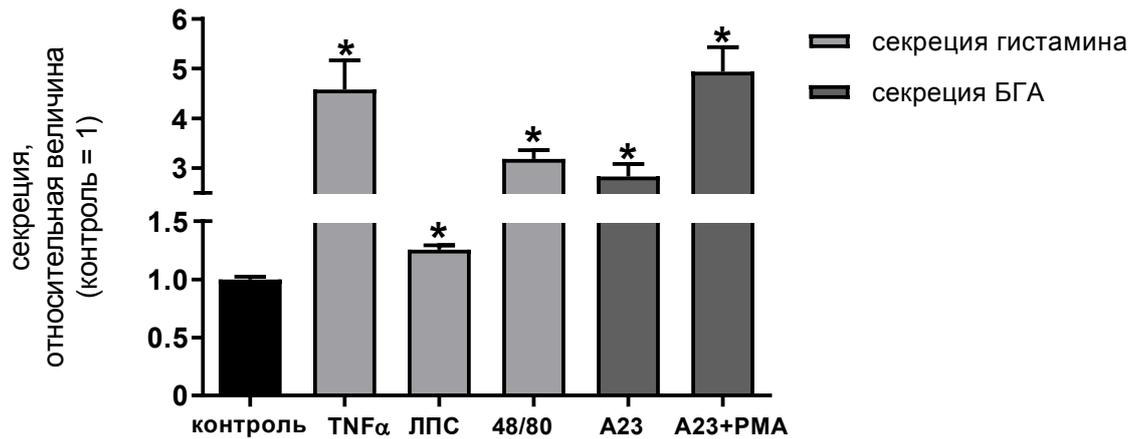


Рисунок 20. Влияние провоспалительных факторов (TNF α (50 нг/мл), ЛПС (1 мкг/мл), вещество 48/80 (0,8 мМ) и кальциевый ионофор A23187 (50 нМ) в комплексе с форболовым эфиром (PMA) (50 нМ)) на секреторную активность тучных клеток. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем. $n \geq 3$.

3.1.1.2. Влияние провоспалительных факторов на выживаемость тучных клеток

Активация ТК в условиях воспаления может приводить не только к повышению их секреторной активности, но и сопровождаться клеточной гибелью. В наших исследованиях мы оценивали выживаемость с помощью МТТ-теста и гибель клеток в LDH-тесте в условиях действия эндотоксина ЛПС (1 мкг/мл), кальциевого ионофора A23187 (50 нМ) и совместного воздействия A23187 и форболового эфира (50 нМ).

Чрезмерная стимуляция клеток ЛПС может способствовать запуску «цитокиновых бурь», включающих как провоспалительные цитокины (IL-1, IL-6), так и противовоспалительные, например (IL-10), что является частой причиной смертности, связанной с воспалением [Wang et al., 2015].

Существуют данные, что ЛПС-индуцированный гепатит вызывает клеточную гибель, вовлекая TNF α , Fas/FasL и перфорин/гранзим зависимые сигнальные пути [Khan et al., 2017]. Также на альвеолярных эпителиальных клетках при ЛПС-индуцированном повреждении легких (модель респираторного дистресс-синдрома) показано, что некроз, включая некроптоз, а не апоптоз, является доминирующим типом гибели клеток [Tamada et al., 2019].

Нами показано, что в процессе развития острой воспалительной реакции, вызванной инкубацией клеток в присутствии ЛПС и ионофора A23187, наблюдалось достоверное снижение уровня живых клеток и увеличение гибели в культуре (Рисунок 21).

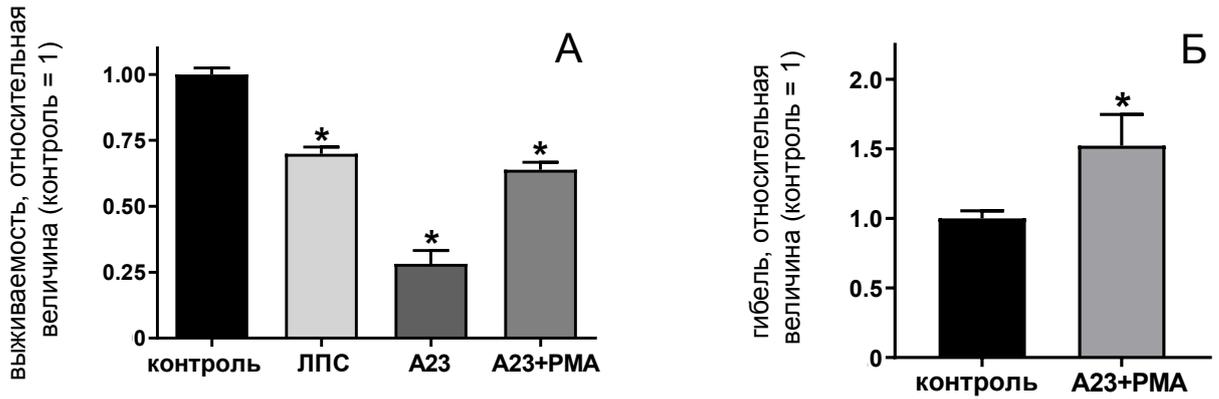


Рисунок 21. Влияние провоспалительных факторов (ЛПС (1 мкг/мл), кальциевый ионофор A23187 (50 нМ) в комплексе с фоболовым эфиром (PMA) (50 нМ)) на выживаемость (А) и гибель (Б) клеток линии RBL-2H3. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем. $n \geq 3$.

3.1.1.3. Влияние провоспалительных факторов на кальциевый гомеостаз тучных клеток

Ранее на клетках линии RBL-2H3, культивируемых аналогов ТК, показано, что развитие воспалительной реакции сопровождается увеличением концентрации цитозольного Ca^{2+} в них [Huang et al., 2014]. Известно, что ЛПС стимулирует дегрануляцию клеток и способствует FcεRI-зависимой мобилизации Ca^{2+} через SOCs (депо-управляемые Ca^{2+} каналы), влияя на экспрессию и транскрипцию субъединиц этих каналов. ЛПС увеличивает уровень мРНК TLR4, тем самым потенцируя свои эффекты на клетки [Yang et al., 2012].

Нами показано, что одним из возможных механизмов провоспалительной ЛПС-вызванной активации ТК, выраженной в повышении секреторной активности (см. выше), является запуск Ca-ответа и транзиторное увеличение его внутриклеточной концентрации (Рисунок 22).

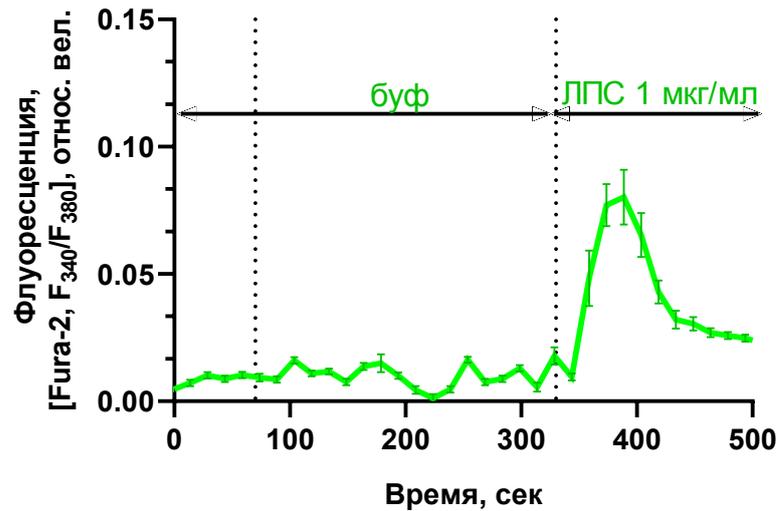


Рисунок 22. Влияние ЛПС (1 мкг/мл) на изменение концентрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$, нМ) в культуре клеток линии RBL-2H3. $[Ca^{2+}]_i$ измеряли методом флуоресцентной микроскопии с использованием высокоаффинного кальциевого индикатора Fura-2. $n = 60 \pm 10$ нейронов в не менее 2-х независимых культурах клеток.

3.1.1.4. Влияние провоспалительных факторов на изменение актинового цитоскелета тучных клеток

Известно, что активация иммунокомпетентных клеток сопровождается запуском секреции, что сопряжено с перестройкой актинового цитоскелета [Deng et al., 2009]. Данный процесс, например в макрофагах, опосредован нарастанием Ca^{2+} в цитозоле, в присутствии которого актин-связывающий белок гельзолин вызывает фрагментацию актиновых филаментов [Sun et al., 1997]. Существуют данные, что кальмодулин также играет важную роль в Ca^{2+} -зависимой разборке кортикального F-актина в перитонеальных ТК крыс [Sullivan et al., 2000]. В активированных клетках RBL-2H3 кальмодулин концентрировался в богатом актином кортексе клетки [Psatha et al., 2004], где взаимодействовал с актин-связывающим каркасным белком IQGAP1. Rho GTPases высвобождаются из IQGAP1, когда кальмодулин связывает Ca^{2+} . Таким образом, повышение уровня кальция инициирует разборку существующего актинового цитоскелета клетки, устраняя тем самым физическую преграду для слияния везикул с плазматической мембраной [Psatha et al., 2007].

В связи с этим, в следующей серии экспериментов мы оценили состояние F-актина в клетках линии RBL-2H3 на фоне исследуемых активаторов: ЛПС и кальциевого ионофора A23187. Нами показано, что ионофор A23187 (24 часа) и ЛПС (90 мин) изменяли

структуру актинового цитоскелета клеток, обеспечивая перестройку актина, характерную для экзоцитоза (Рисунок 23).

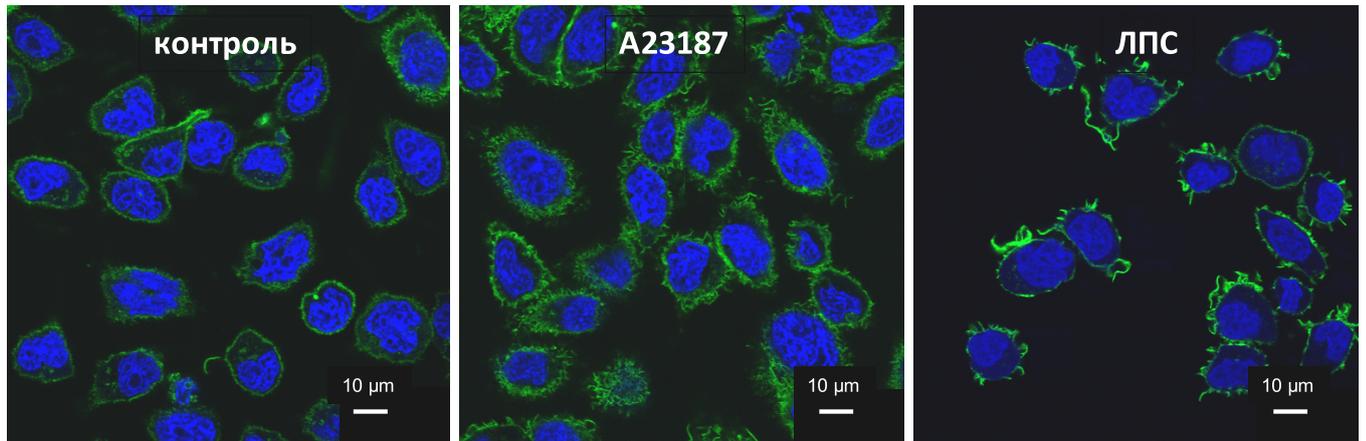


Рисунок 23. Влияние A23187 (50 нМ) и ЛПС (1 мкг/мл) на изменение актинового цитоскелета клеток линии RBL-2H3. Детекцию F-актина осуществляли с использованием фаллоидина, конъюгированного с Alexa 488 (зелёная флуоресценция). Синяя флуоресценция – DAPI – ДНК-тропный краситель. Репрезентативные снимки соответствующих клеточных культур получены с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (ZEISS, Германия).

3.1.2. Особенности провоспалительной активации астроцитов

3.1.2.1. Влияние провоспалительных факторов на пролиферацию астроцитов

Нейровоспаление определяется как воспалительный ответ центральной нервной системы на воздействия, которые нарушают гомеостаз. Клетки, реактивно активирующиеся при воспалительной реакции в нервной ткани – это глиальные клетки (в том числе Шванновские клетки и сателлитная глия в периферической нервной системе; микроглия, астроциты и олигодендроциты в ЦНС) и иммунные клетки (включая резидентные тучные клетки и макрофаги, а также инфильтрованные нейтрофилы и Т-клетки) [Grigoriadis et al., 2006].

Астроциты составляют 20 – 30% от общего числа глиальных клеток в мозге человека [Pelvig et al., 2008]. В физиологических условиях астроциты выполняют многочисленные функции, которые необходимы для выживания нейронов [Bakunina et al., 2015]; например, взаимодействие между астроцитами и нейронами, которое происходит путем выделения нейротрофических факторов [Choi et al., 2012].

Астроциты являются иммунокомпетентными клетками мозга, которые могут оказывать влияние на состояние ГЭБ, функционирование и дифференцировку нейронов,

формирование синапсов, модуляцию синаптической передачи и многое другое [Sofroniew, Vinters, 2010; цит. по Chelini et al., 2018].

Активация астроцитов может приводить к формированию астроглиального рубца, при ишемии мозга, с одной стороны, уменьшая очаг воспаления, а с другой, уплотняя ткань мозга и препятствуя прорастанию и регенерации нейритов [Sofroniew, Vinters, 2010].

Известно, что ЛПС запускает развитие реактивного астроглиоза и формирования глиального рубца, препятствующего прорастанию аксонов нейронов и восстановлению функций нервной ткани [Zhang et al., 2017].

В связи с этим, на следующем этапе нашей работы мы оценили влияние экзотоксина – ЛПС на пролиферативную активность культивируемых астроцитов крыс.

Нами обнаружено, что однократное 15-минутное воздействие ЛПС (0,1 мкг/мл) не влияло на пролиферацию астроцитов, в то время как трёхкратная аппликация ЛПС приводила к повышению пролиферации астроцитов через 48 часов приблизительно в 1,3 раза по сравнению с контролем (Рисунок 24).

Чжан и его коллеги на культуре астроцитов человека обнаружили, что помимо провоспалительных цитокинов, ЛПС вызывает высвобождение нейротрофического фактора (BDNF), который, взаимодействуя с TrkB рецептором на астроцитах, запускающим PI3K/Akt внутриклеточный сигнальный путь, приводит к их активации и пролиферации [Zhang et al., 2017]. Таким образом, можно предположить, что ЛПС запускает подобные реакции в используемых нами условиях на астроцитах крысы.

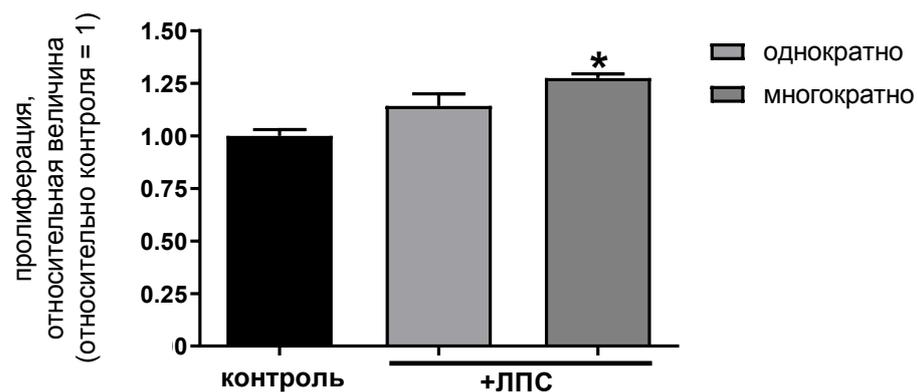


Рисунок 24. Влияние ЛПС (0,1 мкг/мл) на пролиферацию культивируемых астроцитов крыс. * $p < 0,05$ – относительно контроля. $n \geq 3$.

Пуринергическая система играет важную роль в клеточном сигналинге. При травмах головного мозга, ишемии и т.д. происходит быстрое высвобождение синаптических и секреторных везикул с АТФ, а также гибель клеток, сопровождающаяся высвобождением

внутриклеточного АТФ. Данные события приводят к повышению концентрации внеклеточного АТФ и, как следствие, стимуляции P2X7 рецептора, активирующегося при высоких концентрациях АТФ (более 100 мкМ) [Mulder et al., 2012]. Подобная активация рецептора P2X7, присутствующего в большинстве иммунных клеток, приводит к высвобождению множества провоспалительных цитокинов и активации воспалительных процессов [Sperlágh, Illes, 2014; Franceschini et al., 2015; Burnstock, 2016; Karmakar et al., 2016].

В сочетании с факторами роста, АТФ может стимулировать пролиферацию астроцитов, способствуя процессу реактивного астроглиоза [Jun, Kim, 2004]. Имеются данные о том, что астроциты, в зависимости от уровня АТФ, высвобождающегося из повреждённых клеток, способны модулировать TNF α -опосредованный воспалительный ответ, опосредовано через соответствующий P2 рецептор [Kucher, Neary, 2005].

В связи с этим, в следующей серии экспериментов мы оценили влияние разных концентраций АТФ на первичную культуру астроцитов.

Анализ эффектов АТФ показал, что высокие концентрации АТФ оказывают токсическое действие на астроциты, вызывая их гибель. Уже 15-минутная инкубация астроцитов с 10 мМ АТФ вызвала значимую гибель клеток. 1 мМ АТФ не оказала влияния на количество астроцитов при 15-минутной инкубации, но вызвала повышение пролиферации астроцитов по сравнению с контрольной группой. Более низкие концентрации АТФ (0,1 мМ) так же повышали число клеток по сравнению с контролем (Рисунок 25).

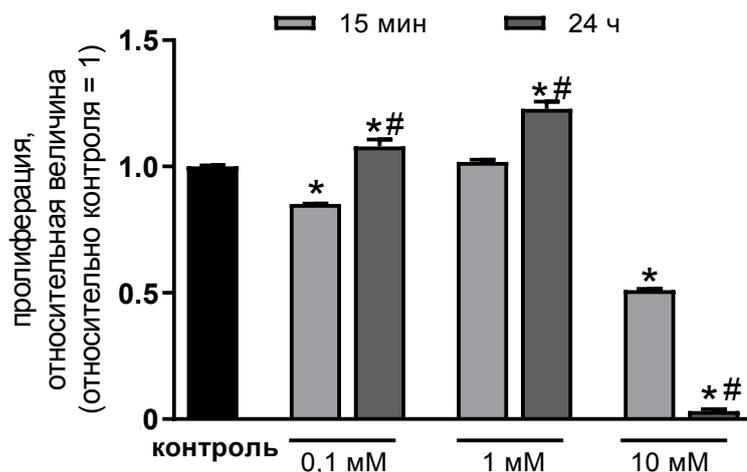


Рисунок 25. Влияние АТФ на пролиферацию культивируемых астроцитов крыс через 15 минут и 24 часа после воздействия. $n \geq 4$, * $p < 0,05$ – относительно контроля, # $p < 0,05$ – относительно группы «15 минут» с той же концентрацией АТФ. $n = 3$.

3.1.2.2. Влияние провоспалительных факторов на кальциевый гомеостаз астроцитов

Известно, что амплитуда Ca^{2+} -ответа астроцитов на гистамин, также как и для нейронов, имеет дозозависимый характер [Patel et al., 2016]. Профиль же ответа зависит от длительности воздействия токсического фактора. При продолжительном воздействии гистамина у большинства клеток был зарегистрирован двухфазный Ca^{2+} -ответ. При этом формирование первого пика происходит за счёт внутриклеточных запасов Ca^{2+} ; второго – в результате притока из экстраклеточного пространства через SOCs каналы [Jung et al., 2000; Linde et al., 2011]. На рисунке 26 видно, что 10-минутная аппликация астроцитов гистамином 100 мкМ также вызывает двухфазный Ca^{2+} -ответ.

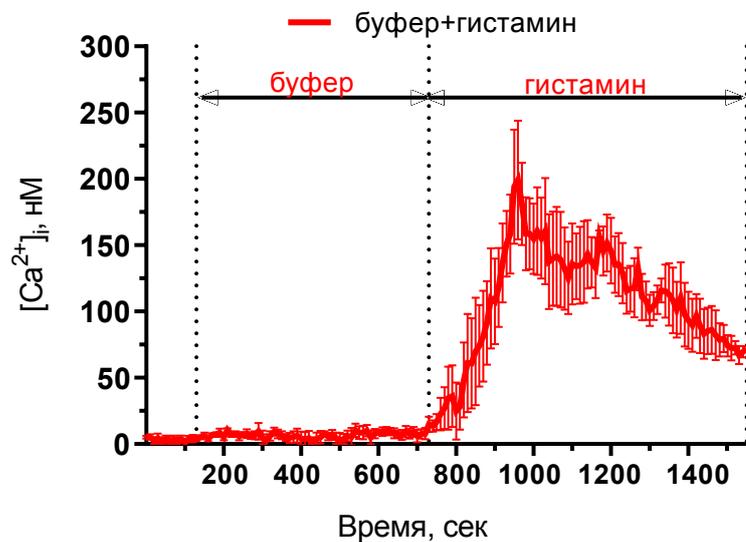


Рисунок 26. Влияние гистамина (100 мкМ) на изменение внутриклеточной концентрации кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$, нМ) в клеточной культуре астроцитов. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ измеряли методом флуоресцентной микроскопии с использованием высокоаффинного кальциевого индикатора Fura-2. $n \geq 4$.

3.1.3. Особенности провоспалительной активации нейронов

3.1.3.1. Влияние провоспалительных факторов на выживаемость нейронов

Известно, что нейротоксические воздействия, как в условиях ишемии, травмы мозга, так и при нейродегенеративных заболеваниях, сопровождаются воспалительными реакциями. При инсультах происходит активация ТК в мозге [Biran et al., 2008], что может приводить к нарушению ГЭБ, активации астроцитов и гибели нейронов. В лаборатории Линсберга [Lindsberg et al., 2010] показано, что гистамин и другие медиаторы, секретируемые ТК при воспалении, являются нейротоксическими факторами.

АТФ принимает активное участие в нейрон-нейронных и нейрон-астроцитарных взаимодействиях. При глутаматной эксайтотоксичности происходит активная гибель клеток и высвобождение из них АТФ; повышение внеклеточного АТФ усугубляет положение, инициируя гибель окружения через P2X7 рецептор, что приводит к увеличению объёма некроза. Данный механизм был предложен для описания патогенеза болезни Паркинсона [Jun, Kim, 2004]. Имеются убедительные доказательства того, что рецепторы P2X7 влияют на активность нейронов [Sperlágh et al., 2006; Díaz-Hernandez et al., 2008; Carrasquero et al., 2009; Nörenberg et al., 2010; Oliveira et al., 2011] и могут координировать микроглиальные и нейронные/астроглиальные ответы, как в физиологических, так и в патологических условиях [Fields, Stevens, 2000; Sperlágh et al., 2006; Ferrari et al., 2007].

Также стоит отметить, что массовое высвобождение АТФ из погибших нейронов, в свою очередь, приводит к активации микроглии и астроцитов через P2X7 рецептор и высвобождению из них провоспалительных факторов, вовлекая все клетки мозга в «порочный круг» развития нейродегенеративных процессов.

В следующей серии экспериментов мы оценивали выживаемость нейронов в присутствии АТФ. Нами показано, что АТФ дозозависимо вызывает гибель нейронов (Рисунок 27).

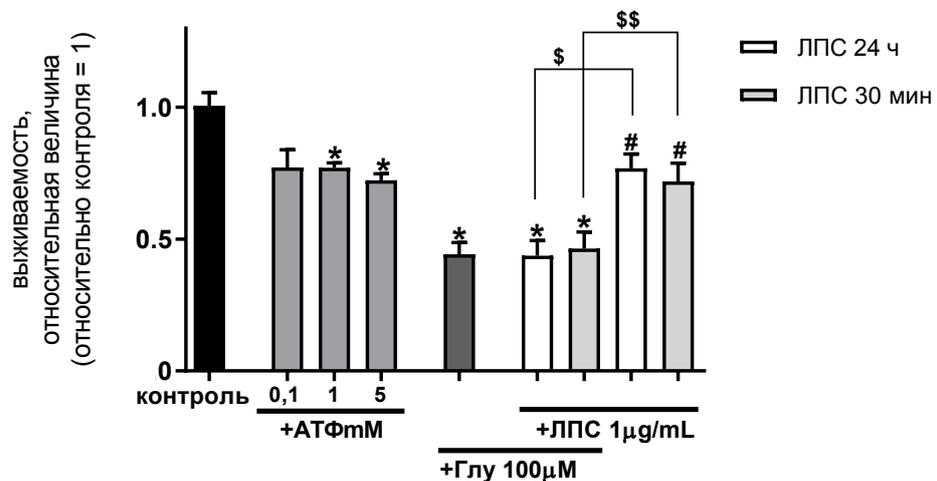


Рисунок 27. Влияние провоспалительных факторов (АТФ, ЛПС и глутамат (Глу)) на выживаемость гиппокампальных нейронов. * $p < 0,05$ – по отношению к контролю; # $p < 0,05$ – по отношению к Глу; \$ $p < 0,05$ – по отношению к ЛПС сут без Глу; \$\$ $p < 0,05$ – по отношению к ЛПС 30 мин без Глу. $n \geq 3$.

Кроме того, любое повреждение нервной ткани, например при ишемии, сопровождается воспалительным процессом, нарушением ГЭБ и, следовательно, повышением возможности проникновения патогенов в мозговую ткань.

Также ишемическое повреждение мозга способствует нарушению работы натрий-калиевой АТФазы, и впоследствии нарушению поддержания ионного гомеостаза. Всё это неизбежно приводит к чрезмерному высвобождению глутамата в межсинаптическую щель. В дополнение происходит сбой в транспортерах обратного захвата глутамата, как пресинаптическими нейронами, так и астроцитами. Высокая внеклеточная концентрация глутамата способствует избыточной стимуляции ионотропных глутаматных рецепторов, запуская повреждения нейронов при ишемическом инсульте [Stanika et al., 2009].

Активация ионотропных глутаматных рецепторов запускает вход ионов Ca^{2+} и Na^{+} в нейроны, в то время как ионы K^{+} выходят из клетки. Эти события вызывают сдвиг мембранного потенциала в сторону деполяризации и открытие потенциал-чувствительных Ca^{2+} -каналов и массивному входу в клетку этого иона.

Дизрегуляция кальциевого гомеостаза запускает каскад внутриклеточных реакций, вызывающих гибель нейронов, преимущественно путём апоптоза. Этот процесс получил название глутаматная эксайтотоксичность [Berliocchi et al., 2005; Bano, Nicotera, 2007].

При этом глутаматная эксайтотоксичность является одним из повреждающих факторов, который действует на клетки в комплексе с другими факторами, в частности, с нейровоспалением.

Имеются данные, что местное интрастриатальное введение ЛПС активирует глиальные клетки и увеличивает продукцию свободных радикалов и секрецию глутамата и аденозина на ранней стадии воспаления [Noworyta-Sokołowska et al., 2013].

В связи с этим, в следующей серии экспериментов мы исследовали выживаемость нейронов при сочетанном воздействии двух факторов – ЛПС и глутамата. Как суточное, так и 30-минутное однократное, воздействие ЛПС вызывает гибель клеток. Возможно, отсутствие дополнительного эффекта при совместном воздействии глутамата и ЛПС связано с тем, что глутамат оказывает более травматическое действие на клетки, чем ЛПС (Рисунок 27).

Механическая травма или нарушение обмена веществ, например, ишемия или инсульт, приводят к немедленной необратимой гибели ткани в месте поражения, а также к вторичному расширению зоны повреждения ткани с течением времени. Этот тип травмы способствует высвобождению АТФ/аденозина из разных клеток, что усугубляет повреждение нейронов и глии в перифокальной зоне. Исследования *in vivo*, в которых использовали модели фокальной ишемии, а также различные модели механического

повреждения nucleus accumbens и спинного мозга крысы, описывали устойчивое высвобождение АТФ и глутамата в перитравматической области [Wang et al., 2004; Melani et al., 2005; Franke et al., 2006; Frenguelli et al., 2007]. Во время ишемии и механической травмы высвобождение АТФ является достаточным для стимуляции рецепторов P2X7 и повреждения нейронов. Эти события блокируются антагонистами P2X7 [Arbeloa et al., 2012].

Между тем, активация рецепторов P2X7 АТФ в астроцитах может не только повысить высвобождение АТФ, но также и глутамата и ГАМК в перифокальной области [Pannicke et al., 2000; C. M. Wang et al., 2002; Duan et al., 2003]. Рецептор глутамата играет решающую роль в гибели нейронов, и его чрезмерная стимуляция связана с этиологией некоторых нейродегенеративных заболеваний [Liu, Zukin, 2007].

Нами показано, что анализ выживаемости нейронов в условиях токсичности, вызванной АТФ и глутаматом, морфологическим методом подтвердил данные, полученные биохимическим методом. Данные факторы достоверно снижают уровень живых клеток по сравнению с контрольной группой (Рисунок 28 и 29).

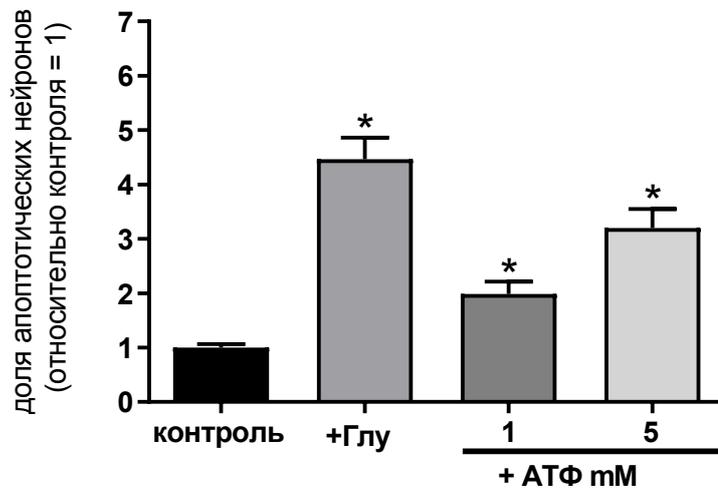


Рисунок 28. Влияние провоспалительных факторов (АТФ и глутамат (100 мкМ) (Глу)) на выживаемость гиппокампальных нейронов. Морфологическая оценка выживаемости. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем. $n \geq 3$.

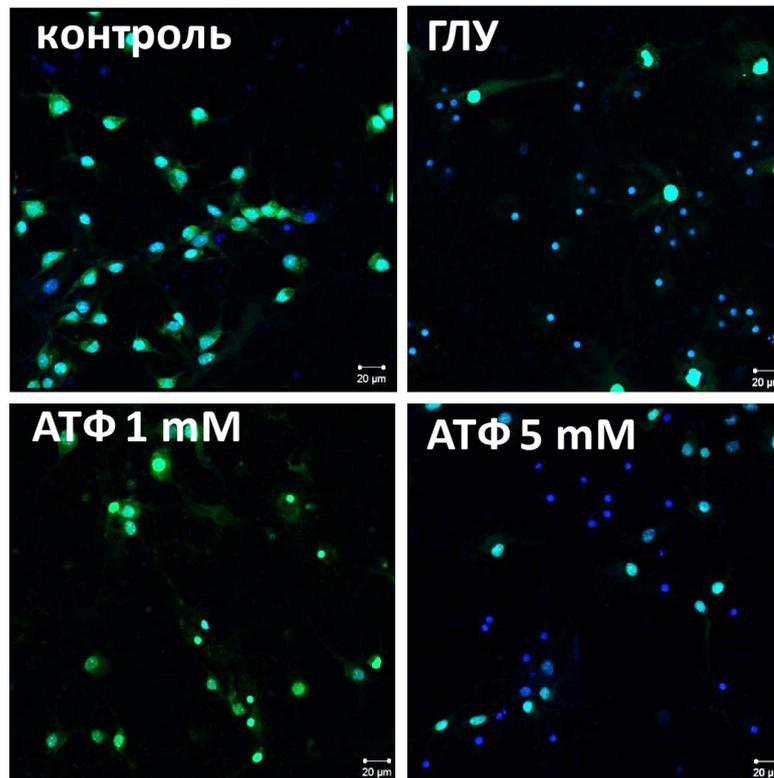


Рисунок 29. Микрофотографии нейронов, окрашенных витальным красителем Syto-13 (зелёная флуоресценция) и ДНК-тропным красителем Hoechst 33342 (апоптоз, синяя флуоресценция). Репрезентативные снимки соответствующих клеточных культур получены с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (ZEISS, Германия).

3.1.3.2. Влияние разных концентраций гистамина на кальциевый гомеостаз в нейронах

Несмотря на малочисленность ТК в головном мозге, их число резко возрастает при повреждениях, как травматических, так и ишемических [Jin et al., 2009; Lindsberg et al., 2010; Nelissen et al., 2013]. Высвобождаемые ими медиаторы могут работать в качестве катализаторов, усиливая и продлевая действие многих вазоактивных, нейроактивных и иммуноактивных веществ. ТК могут проникать через ГЭБ и изменять его архитектуру. Так же эти клетки могут изменять проницаемость сосудов, выделяя многочисленные мощные вазодилататоры (гепарин, гистамин, серотонин, оксид азота, вазоактивный кишечный пептид, CGRP, VEGF) и цитокины (TNF α), что в свою очередь индуцирует экспрессию молекул межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) и привлекает лейкоциты к пострадавшим тканям.

Показано, что гистамин и другие медиаторы, секретируемые тучными клетками при воспалении, являются нейротоксическими факторами [Strbian et al., 2009]. В экспериментах по совместному культивированию клеток RBL-2H3 с нейронами

подслизистой кишечника показано, что медиаторы, высвобождаемые ТК при активации веществом 48/80, способствуют росту концентрации цитозольного кальция в нейронах [Bell et al., 2015]. Нарастание внутриклеточной концентрации ионов кальция, в свою очередь, приводит к транзиторной активации различных Ca^{2+} -зависимых ферментов, включая Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую протеинкиназу С, кальцинейрин, фосфолипазу А2, фосфолипазу С, ряд эндонуклеаз и NO-синтазу. При этом оксид азота также может оказывать существенное влияние на кальциевый гомеостаз клеток [Mitrokhin et al., 2018]. Самым первым признаком последующей гибели клетки является невозможность ею восстановить исходную концентрацию $[\text{Ca}^{2+}]_i$ после глутаматного воздействия [Randall, Thayer, 1992]. Стойкое возрастание $[\text{Ca}^{2+}]_i$ наблюдается в тех нейронах, которые затем погибают. Доказательства связи степени возрастания $[\text{Ca}^{2+}]_i$ с последующей нейрональной гибелью получены в исследованиях Огура [Ogura, Nishida, 1988] и Лимбрика [Limbrick et al., 1995]. Всё это указывает на несомненную важность контроля кальциевого гомеостаза в нейронах для модуляции негативных процессов при травмах мозга.

В наших экспериментах в качестве стимулятора нейронов и астроцитов мы использовали гистамин. Этот выбор обоснован и данными, полученными в лаборатории Белл [Bell et al., 2015], где показано, что из всего коктейля медиаторов, освобождаемых клетками линии RBL-2H3 при их активации, гистамин через H1-гистаминовый рецептор играл преобладающую роль в запуске Ca^{2+} -ответа нейронами при их кокультивировании.

Нами установлено, что эффект гистамина на культивируемые нейроны зависел от его концентрации и носил дозозависимый характер (Рисунок 30). С увеличением концентрации провоспалительного медиатора возрастал как процент ответивших нейронов, так и амплитуда пиков, отражающих рост внутриклеточной концентрации Ca^{2+} .

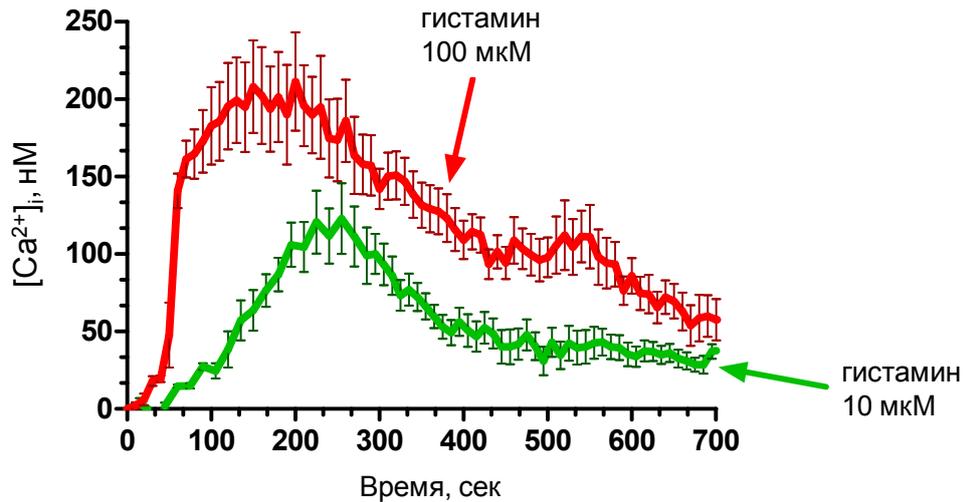


Рисунок 30. Дозо-зависимый эффект гистамина на изменение концентрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$, нМ) в гиппокампальных нейронах. $[Ca^{2+}]_i$ измеряли методом флуоресцентной микроскопии с использованием высокоаффинного кальциевого индикатора Fura-2. $n = 7$.

3.1.3.3. Вклад NMDA в развитие глутаматной эксайтотоксичности

Выделяют несколько подтипов ионотропных глутаматных рецепторов, которые активируются различными аналогами глутамата: AMPA рецепторы – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота, NMDA рецепторы – агонистом является N-метил-D-аспарагиновая кислота и КА рецепторы – каиновая кислота.

Одним из ключевых факторов глутамат-вызванной токсичности является кальциевая перегрузка нейронов, ведущая к их гибели. Данный эффект глутамата опосредуется через 2 основных класса ионотропных рецепторов – NMDA и AMPA. Каков вклад каждого из них в гибель нейронов крысы при глутаматной эксайтотоксичности не ясно. При этом, имеются данные о возможности модулирования активности, например, NMDA сериновыми протеазами гемостаза через ПАР-1.

Интересно, что активация ПАР-1 вызывает высвобождение глутамата из астроцитов грызунов [Lee et al., 2007; Ramos-Mandujano et al., 2007]. Этот процесс зависит от ПАР-1-опосредованного внутриклеточного роста кальция [Lee et al., 2007; Ramos-Mandujano et al., 2007]. Повышенный внеклеточный глутамат активирует рецепторы NMDA на соседних нейронах [Lee et al., 2007], а ПАР-1 может усиливать функцию рецептора NMDA в нейронах гиппокампа грызунов [Gingrich et al., 2000]. Эти результаты показывают, что ПАР-1 может усугублять опосредованную NMDA

рецептором гибель нейронов после разрушения ГЭБ при определенных патологических состояниях, таких как церебральная ишемия и инсульт.

В связи с этим мы оценили вклад NMDA в гибель нейронов, вызванную глутаматной токсичностью. Использование специфического антагониста NMDA рецепторов МК-801 показало, что блокада этого типа рецепторов несколько снижает гибель нейронов при глутаматной токсичности. Наиболее эффективными концентрациями оказались концентрации МК-801 в 10 и 20 мкМ (Рисунок 31).

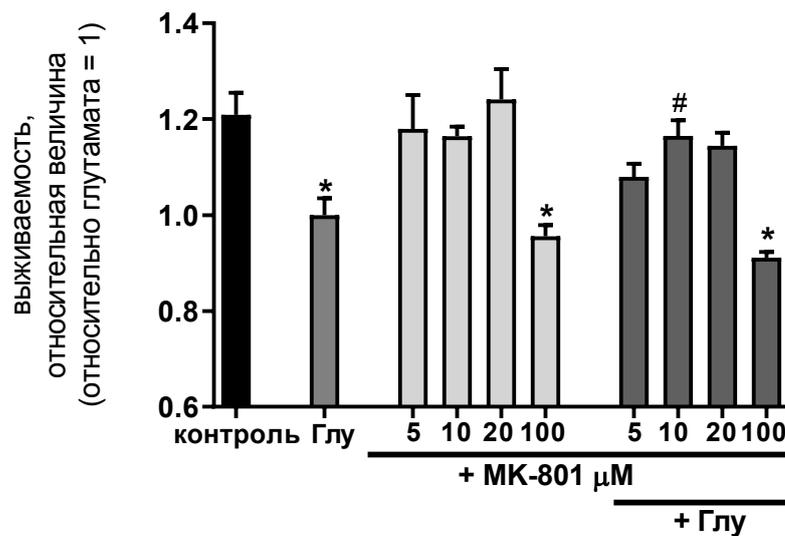


Рисунок 31. Влияние глутамата (100 мкМ) (Глу) на фоне действия специфического антагониста NMDA рецепторов (МК-801) на выживаемость нейронов. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем. # $p < 0,05$ по сравнению с глутаматом. $n \geq 3$.

Итак, нами обнаружено, что провоспалительные факторы TNF α , ЛПС, кальциевый ионофор A23187 приводят к активации ТК, повышая их секреторную активность через Ca²⁺-опосредуемые механизмы и перестройку актинового цитоскелета, характерного для экзоцитоза. ЛПС и высвобождаемые ТК факторы, в частности гистамин и АТФ, могут приводить к смене фенотипа астроцитов в сторону провоспалительного, способствуя усилению их пролиферации. При нейровоспалении активация иммунокомпетентных клеток мозга (ТК и астроциты) неизбежно способствует изменению функционального состояния нейронов, кальциевой перегрузке, являющейся одной из причин глутаматной токсичности и их гибели. Кроме того, высвобождение АТФ из погибших клеток, приводит к замыканию «порочного» круга воспаления.

3.2. ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ ПАР-1 НА КЛЕТКИ-УЧАСТНИКИ ВОСПАЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ

3.2.1. Особенности влияния агонистов ПАР-1 на тучные клетки

3.2.1.1. Экспрессия ПАР-1, ЭРПС на клетках линии RBL-2H3

Воспаление является одним из ключевых процессов в организме, сопровождающим разного рода повреждения и патологии, при которых нарушается регуляция адаптивной физиологической роли воспаления. В связи с этим терапия заболеваний и травматических повреждений, вышедших из-под контроля адаптивных реакций, должна включать элементы противовоспалительной терапии. В последнее время накоплено существенное количество фактов, указывающих на противовоспалительные свойства сериновой протеазы гемостаза – АПС [Esmon, 2004; Howard, Cohen, 2016]. Показано, что противовоспалительное действие протеазы реализуется через ПАР-1. Активация ПАР может осуществляться и посредством пептидов-агонистов, аналогичных неканоническому «привязанному лиганду», освобождаемому АПС [Mosnier et al., 2007]. Низкомолекулярные соединения, например пептиды, могли бы представлять интерес как перспективные терапевтические средства для купирования воспаления. Поэтому несомненный практический интерес представляет исследование возможных противовоспалительных свойств синтетического пептида – агониста рецептора ПАР-1, освобождаемого АПС (АП9).

В Российском кардиологическом научно-производственном комплексе в лаборатории к.х.н. М.В. Сидоровой по нашей просьбе синтезирован пептид-АП9 (NPNDKYEPF амид), аналогичный по аминокислотной последовательности «привязанному» лиганду, освобождаемому АПС.

Необходимо отметить, что ряд данных зарубежных и отечественных исследователей указывают на вовлечение в АПС-зависимую регуляцию клеточных функций эндотелиального рецептора протеина С (ЭРПС), помимо ПАР-1 [Mosnier et al., 2012]. С помощью иммуноцитохимического окрашивания нами показано наличие двух (ПАР-1 и ПАР-2) из четырех типов рецепторов ПАР и впервые обнаружена экспрессия эндотелиального рецептора протеина С (ЭРПС) на клетках линии RBL-2H3. Используя вестерн иммуно-блоттинг, с помощью специфических анти-ПАР-1 антител мы подтвердили данные иммуноцитохимического окрашивания (Рисунок 32).

Это свидетельствует о возможности запуска клеточных каскадов, активируемых АПС через ПАР-1 и его корецептор ЭРПС, а также запускаемых АП9 – неканоническим агонистом ПАР-1.

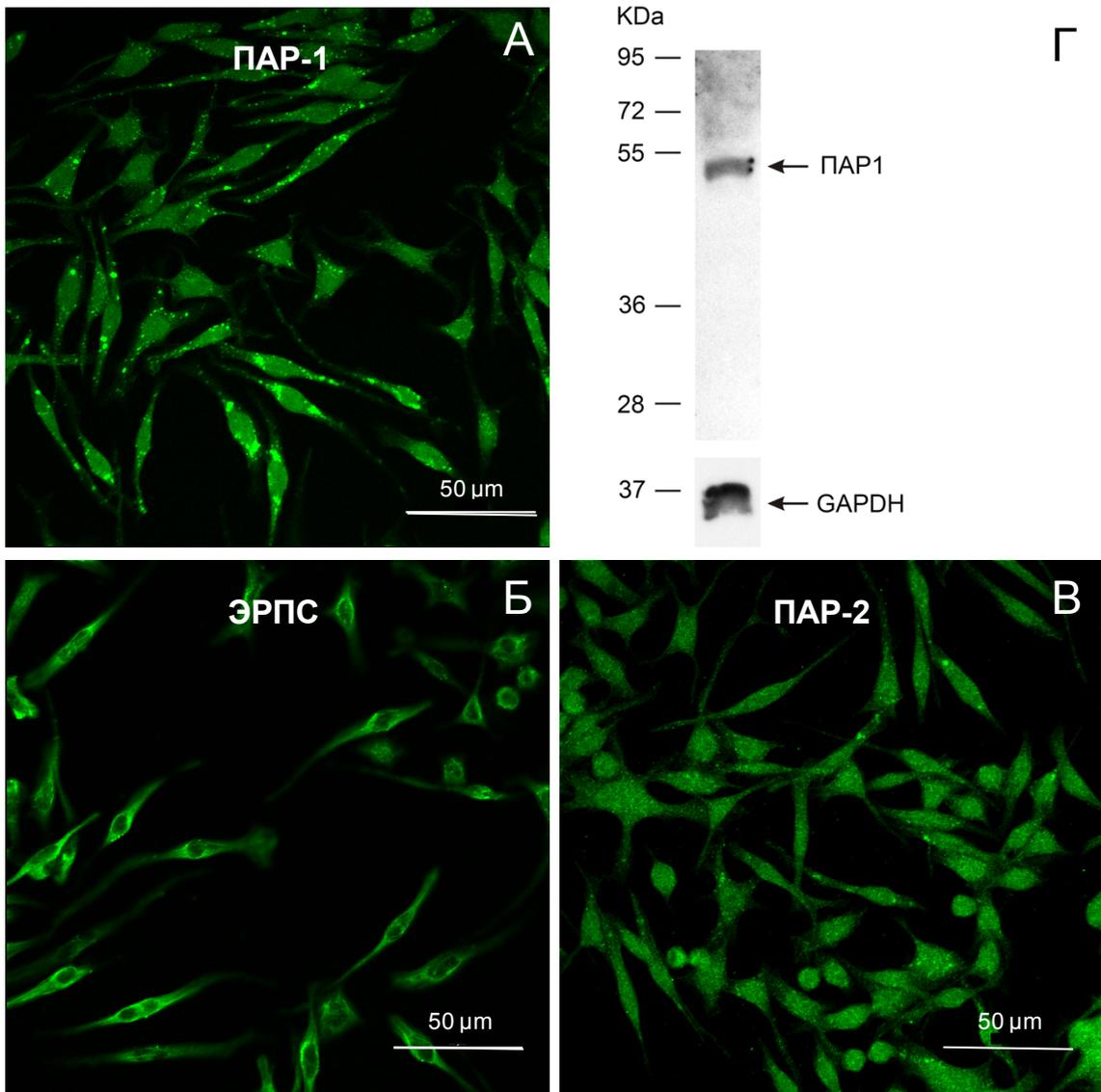


Рисунок 32. Экспрессия ПАP-1, ПАP-2 и ЭPПC в клетках линии RBL-2H3. Репрезентативные данные иммуноцитохимического окрашивания (А, Б, В) и вестерн-блоттинга (Г). ПАP-1 (АТАP2)-специфические анти-ПАP-1 антитела, ПАP-2 (SEM11) – специфические анти-ПАP-2 антитела, ЭPПC (P20)-специфические анти-ЭPПC антитела (SantaCruz, США), GAPDH – анти-глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа антитела (Millipore, США).

3.2.1.2. Влияние агонистов ПАP-1 на секрецию тучных клеток

Клеточная линия RBL-2H3 – культивируемый аналог тучных клеток, полученная из периферической крови крыс с базофильной лейкоимией [Eccleston et al., 1973; Kulczycki et al., 1974]. Данный тип клеток способен к дегрануляции и высвобождению целого ряда медиаторов, в том числе гистамина и БГА [Tang et al., 2015]. Нами показано, что изолированное воздействие агонистов ПАP-1 – тромбина, АПС и синтетического

пептида АП9 – в течение часа не оказывает влияния на секреторную активность клеток линии RBL-2H3 по сравнению с контрольной группой (Рисунок 33).

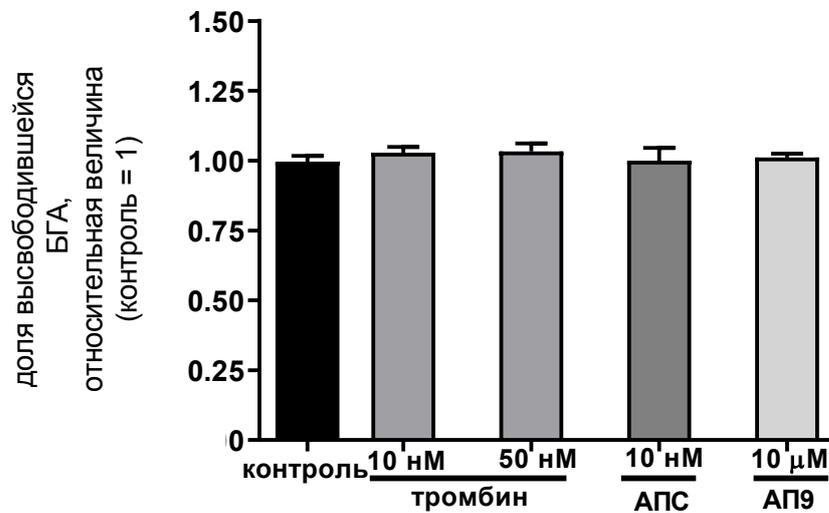


Рисунок 33. Влияние агонистов ПАР-1 (тромбин, АПС, АП9) на спонтанную секрецию β -гексозаминидазы (БГА) клетками линии RBL-2H3. $n \geq 3$.

Имеются данные о том, что внутрибрюшинное введение АПС в низких дозах крысам стабилизирует перитонеальные ТК, активированные при иммобилизационном стрессе [Rusanova et al., 2009]. После активации иммунными и неиммунными активаторами ТК, являясь одним из главных игроков в развитии воспалительной реакции, высвобождают как предварительно сформированные, так и синтезированные *de novo* медиаторы, включая цитокины и другие воспалительные медиаторы, активирующие факторы транскрипции. Показано, что после индукции острого воспаления (перитонита) у крыс однократное внутрибрюшинное введение АПС приводило к подавлению экспрессии и продукции IL-1, IL-6 и TNF α ТК, активированными провоспалительными агентами [Strukova et al., 2011].

В следующей серии экспериментов наряду со специфическими индукторами воспаления ТК – TNF α , ЛПС – к ТК добавляли неканонический агонист ПАР-1 – АПС (10 нМ). Результаты наших экспериментов показали, что предварительная 15-минутная инкубация клеток с АПС достоверно снижает секрецию гистамина, вызванную активацией клеток (Рисунок 34).

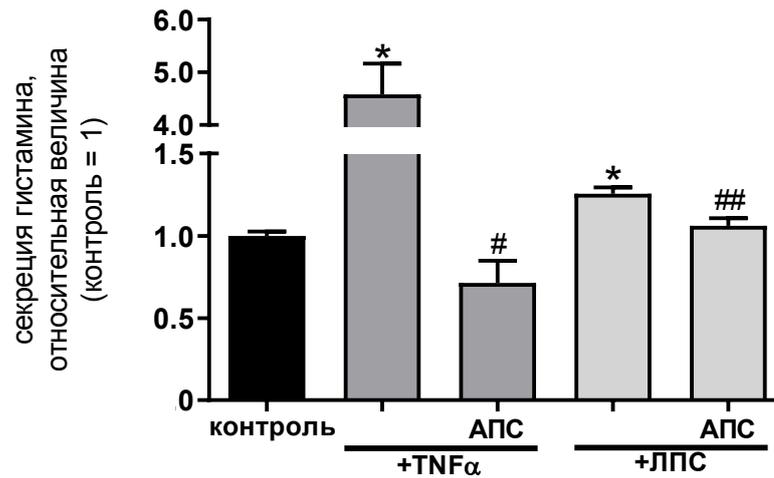


Рисунок 34. Влияние АПС (10 нМ) на секрецию гистамина тучными клетками, активированными провоспалительными факторами (TNF α (50 нг/мл), ЛПС (1 мкг/мл)), * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с группой TNF α , ## $p < 0,1$ по сравнению с группой ЛПС. $n = 4$.

Полученные данные согласуются с данными, полученными в нашей лаборатории ранее при исследовании противовоспалительного действия АПС. Так, было показано, что активация PAR-1 эндогенной протеазой АПС в низких концентрациях блокирует освобождение гистамина, БГА и других медиаторов перитонеальных ТК, активированных острым воспалением, и ускоряет репаративные процессы при заживлении экспериментальной язвы желудка у крыс (*in vivo*) [Макарова и др, 2006; Русанова и др, 2009]. На эндотелиальных клетках показано, что АПС вместе с корецептором – ЭРПС, активируя PAR-1, также оказывает цитопротекторный эффект, индуцируя экспрессию противоапоптотических генов, стабилизируя клетки эндотелия и снижая секрецию цитокинов [Mosnier et al., 2012; Griffin et al., 2015].

Использование рекомбинантных форм АПС при травмах мозга, инсульте и воспалении, в частности, при сепсисе, ограничено вследствие его антикоагулянтной активности, возможности кровотечений, аллергических реакций и отсутствия цитопротекторного действия в высоких концентрациях. Следующим шагом было создание модифицированных препаратов рекомбинантных форм АПС, лишённых антикоагулянтной активности, но сохранивших цитопротекторные свойства – 3К3А-АРС и 5А-АРС. На животных моделях инсульта [Guo et al., 2009; Wang et al., 2009, 2012], травматического повреждения головного мозга [Walker et al., 2010], бокового амиотрофического склероза [Zhong et al., 2009] и при бактериальном сепсисе [Kerschen et al., 2007] АПС-аналоги (3К3А-АРС и 5А-АРС) оказывали положительные

эффекты, которые были эквивалентны, а иногда и больше, чем в случае рекомбинантного АПС.

Рекомбинантный АПС и его сигнально-компетентные аналоги преодолевают ГЭБ с помощью эндотелиального рецептора протеина С [Deane et al., 2009; Zhong et al., 2009] и оказывают прямое нейропротекторное действие *in vivo* и *in vitro* [Guo et al., 2004; 2009; Liu et al., 2004].

В связи с этим, на следующем этапе нашей работы было оценено влияние нового синтетического пептида 9 (АП9), подобного по структуре «привязанному» лиганду ПАР-1, освобождаемого АПС, на уровень секреции ТК, активированных цитокином $TNF\alpha$, экзотоксином ЛПС и неспецифическим дегранулятором веществом 48/80. Обнаружено, что АП9 (10 μM) (15-ти минутная предобработка клеток) на фоне провоспалительной активации ТК $TNF\alpha$ и ЛПС способствовал снижению данного параметра до контрольных значений. Кроме того, АП9 подавлял высвобождение гистамина в группе активированных веществом 48/80 ТК в 1,2 – 1,5 раза (Рисунок 35).

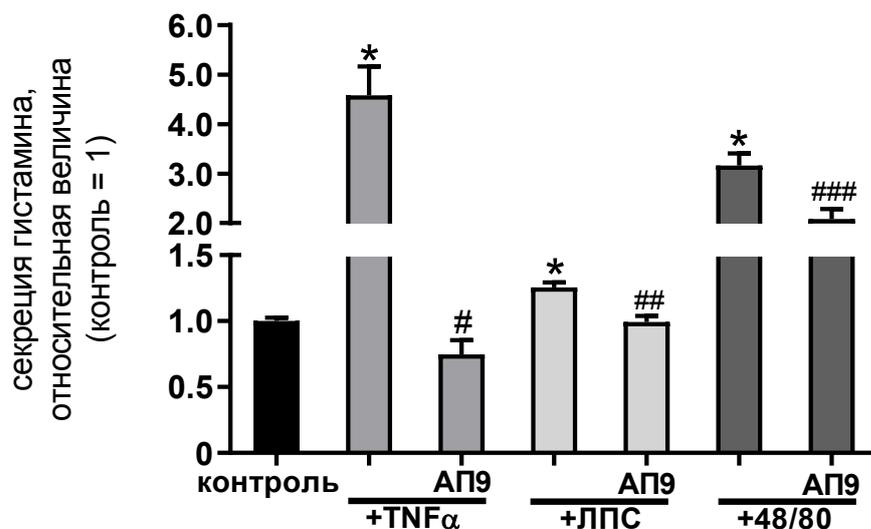


Рисунок 35. Влияние АП9 (10 μM) на секрецию гистамина тучными клетками крыс, активированными провоспалительными факторами (($TNF\alpha$ (50 нг/мл), ЛПС (1 мкг/мл), вещество 48/80 (0,8 мМ)), * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с группой $TNF\alpha$, ## $p < 0,1$ по сравнению с группой ЛПС, ### $p < 0,05$ по сравнению с группой 48/80. n = 4.

Известно, что сериновые протеазы могут оказывать как провоспалительное, так и противовоспалительное действие в зависимости от концентрации.

Особенностью тромбина является дозозависимый характер запускаемых каскадов: от провоспалительных до цитопротекторных. Высокие концентрации тромбина, как известно, токсичны. Однако, накопленные за последние годы данные показали, что тромбин в очень низких и умеренных концентрациях является нейропротектором для мозга. Активация ПАР-1, вызванная тромбином (10 пМ – 10 нМ) защищает нейроны и астроциты гиппокампа крыс от гибели клеток *in vitro*, в ответ на кислородно-глюкозную депривацию, глутамат, гипогликемию, окислительный стресс или агрегацию β -амилоида [Vaughan et al., 1995; Pike et al., 1996; Masada et al., 2000; Striggow et al., 2000; Jiang et al., 2002; Горбачева и др., 2006].

Интересно, что опосредованная тромбином гибель и выживаемость клеток имеют общие исходные рецепторные белки [Ho et al., 1994; Luo et al., 2009].

Высокие концентрации тромбина обнаружены в межклеточном пространстве мозга при травмах, воспалении, нарушении ГЭБ, и других патологических процессах [Suo et al., 2002], при этом он оказывает токсическое действие на клетки, способствуя запуску воспалительного каскада реакций и гибели клеток.

Нами показано, что тромбин в концентрации 10 нМ, в отличие от 50 нМ, подобно синтетическому пептиду АП9, снижал высвобождение гистамина активированными кальциевым ионофором А23187 клетками (Рисунок 36).

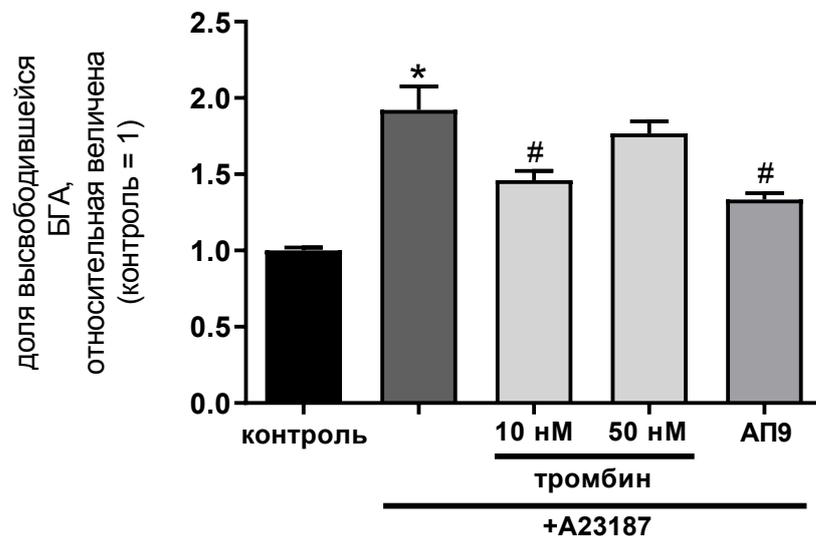


Рисунок 36. Влияние кальциевого ионофора А23187 (50 нМ) на фоне действия агонистов ПАР-1 (тромбина и АП9 (10 мкМ)) на секрецию β -гескозаминидазы (БГА) клетками линии RBL-2H3. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с группой А23187. $n \geq 3$.

Полученные данные говорят о том, что синтетический пептид АП9, подобно АПС и тромбину 10 нМ, демонстрирует противовоспалительное действие на активированные ТК, снижая секрецию провоспалительных медиаторов (гистамина и БГА) и стабилизируя клетки.

3.2.1.3. Влияние агонистов ПАР-1 на выживаемость тучных клеток

Высокая степень дегрануляции ТК может приводить к их гибели. В связи с этим, в следующей серии экспериментов мы оценили влияние агонистов ПАР-1 на выживаемость клеток в условиях воспаления *in vitro*.

Нами показано, что изолированное воздействие агонистов ПАР-1 – тромбина, АПС и синтетического пептида АП9 не оказывает влияния на клеточную гибель линии RBL-2H3 по сравнению с контрольной группой (Рисунок 37).

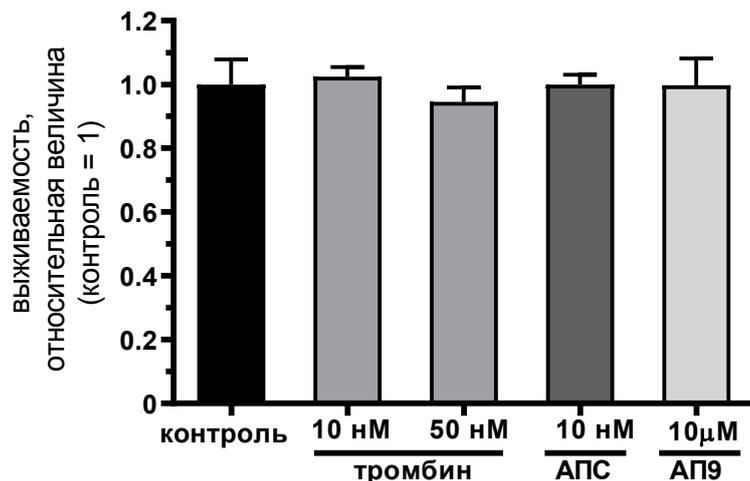


Рисунок 37. Влияние агонистов ПАР-1 (тромбин, АПС и АП9) на выживаемость тучных клеток. $n \geq 3$.

На ТК, активированных широко распространенным индуктором воспаления – ЛПС и кальциевым ионофором A23187, нами продемонстрировано противовоспалительное и цитопротекторное действие АПС и тромбина в низких концентрациях.

АПС, действующий на ПАР-1, передает внутриклеточные сигналы по механизму «смещенного агонизма» неканоническим путем через β -аррестины [Russo et al., 2009; Mosnier et al., 2012]. ПАР-1-опосредованный механизм защитного действия АПС на ТК показан Макаровой с коллегами [Makarova et al., 2008].

АПС индуцирует ингибирование активации транскрипционного фактора NF- κ B, регулирующего экспрессию целого набора генов, в том числе ответственных за

клеточную гибель, тем самым подавляя воспалительный ответ и способствуя выживанию активированных ТК [Strukova et al., 2011].

В нашей работе предобработка клеток АПС возвращала уровень выживаемости к контрольным значениям в случае активации клеток ЛПС; и повышала данный показатель в 2,5 раза по сравнению с группой обработанной А23187 в отсутствие протекторов. Тромбин (10 нМ) защищал клетки линии RBL-2H3 от токсического воздействия кальциевого ионофора, подобно АПС (Рисунок 38).

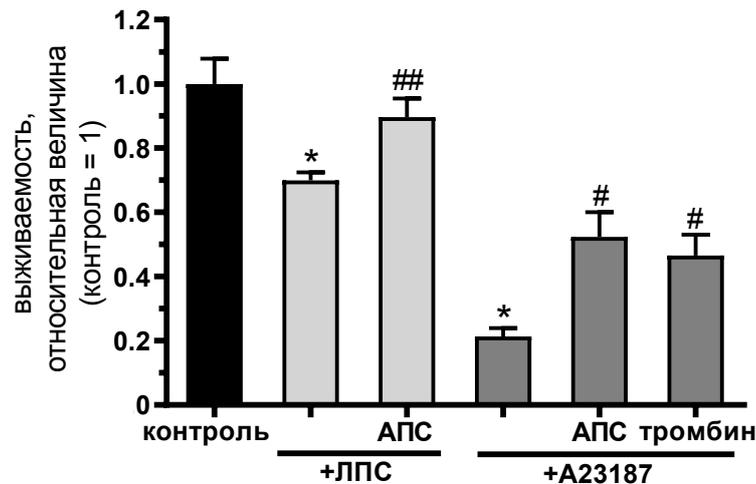


Рисунок 38. Влияние АПС (10 нМ) и тромбина (10нМ) на выживаемость тучных клеток, активированными ЛПС (1 мкг/мл), А23187 (50 нМ). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с группой А23187, ## $p < 0,05$ по сравнению с группой ЛПС. $n = 4$.

В соответствии с описанным уникальным механизмом активации ПАР-1, расщепление и образование «привязанного лиганда», определенным образом изменяют конформацию рецептора, индуцируют надлежащий сигнальный каскад и определяют ориентацию клеточных ответов, которые модулируют гемостаз, тромбоз, воспаление, восстановление тканей и нейродегенерацию, а также могут быть причиной канцерогенеза [Strukova, 2006; Mosnier et al., 2007; Russo et al., 2009; Ramachandran et al., 2012]. Таким образом, конформация ПАР-1 может быть «сдвинута» в сторону β -аррестин-зависимого сигнального каскада [Rajagopal et al., 2010; Kahsai et al., 2016]. Это может дать объяснение нейропротекторному действию тромбина при очень низких концентрациях, особенно когда протеин С связан с ЭРПС, это явление иногда называют «EPCR occupancy» [Rezaie, 2011; García et al., 2015; Roy et al., 2016].

Следующим этапом работы было исследование влияния синтетического пептида АП9 на выживаемость клеточной культуры в условии воспаления *in vitro*. Предварительная аппликация культуры с АП9 способствуют повышению числа живых клеток, активированных экзотоксином ЛПС, приближая данный показатель к контрольным значениям. Кроме того, АП9, подобно АПС, повышает уровень выживаемости в 2,5 раза по сравнению с изолированным воздействием ионофора А23187 (Рисунок 39).

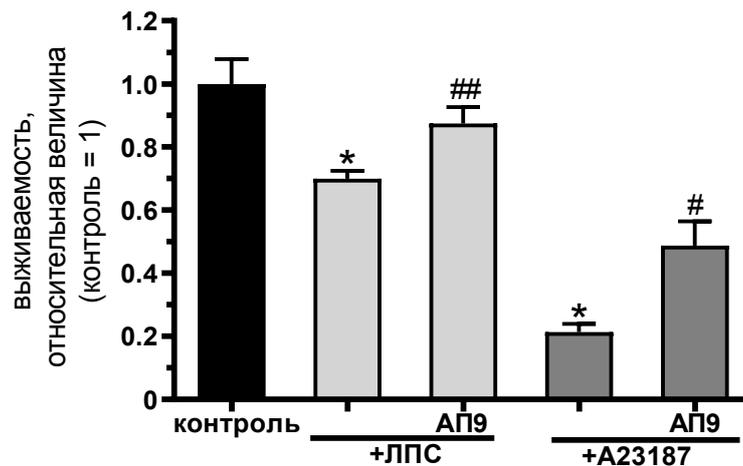


Рисунок 39. Влияние АП9 (10 мкМ) на выживаемость тучных клеток, активированными ЛПС (1 мкг/мл), А23187 (50 нМ), * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с группой А23187, ## $p < 0,05$ по сравнению с группой ЛПС. $n \geq 3$.

Для вызванной активации клеток RBL-2H3 используют не только кальциевый ионофор А23187, но и форболовый эфир, который через активацию протеинкиназы С может как сам активировать клетки, так и потенцировать их активацию другими лигандами. Совместное воздействие кальциевого ионофора и РМА на ТК индуцировало клеточную гибель. АП9 значительно снижал в этих условиях гибель клеток до контрольных значений. При добавлении АПС наблюдалась тенденция к снижению гибели клеток в условиях их активации А23187 и РМА. В данных условиях тромбин не оказывал протекторного действия на активированные ионофором совместно с форболовым эфиром клетки (Рисунок 40).

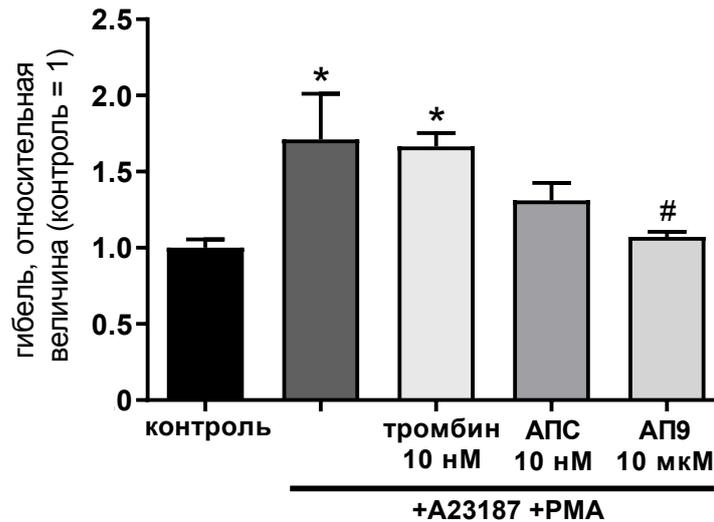


Рисунок 40. Влияние агониста ПАР-1 (АП9, АПС и тромбин) на выживаемость тучных клеток, активированными А23187 в комплексе с PMA, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с группой А23187. $n \geq 3$.

Известно, что протекторное действие АПС на эндотелиальные клетки связано с усилением экспрессии генов, ответственных за выживание, включая Bcl2, эндотелиальную NO-синтазу (eNOS), ингибитор апоптоза (IAP), а также с подавлением экспрессии апоптоз-ассоциированных генов (кальретикулин и TRMP2) [Joyce et al., 2001]. Возможно, протекторное действие АПС на клетках линии RBL-2H3 также опосредовано регуляцией генов, участвующих в запуске клеточной гибели.

Таким образом, активация RBL-2H3, вызванная эндотоксином, кальциевым ионофором и фторболовым эфиром, сопровождается активацией секреции и снижением выживаемости клеток. Нами впервые обнаружено противовоспалительное и протекторное действие нового синтетического пептида АП9 на ТК в условиях воспаления *in vitro*. Пептид, подобно эндогенной протеазе АПС, защищает клетки в условиях действия провоспалительных факторов, что позволяет рассматривать АП9 как возможный терапевтический агент при воспалительных процессах.

3.2.1.4. Влияние агонистов ПАР-1 на кальциевый гомеостаз тучных клеток

Возрастание концентрации ионов кальция является ключевым фактором, опосредующим многие внутриклеточные процессы и, в частности, активацию клеток. Ранее на клетках линии RBL-2H3 показано, что развитие воспалительной реакции сопровождается увеличением концентрации цитозольного Ca^{2+} [Nizamutdinova et al., 2016]. На уровень внутриклеточного Ca^{2+} может дозозависимо

влиять сериновая протеаза гемостаза – тромбин, которая в высоких концентрациях выступает в качестве провоспалительного фактора. Известно, что тромбин в высоких концентрациях через ПАР-1 активирует перитонеальные ТК, вызывая их дегрануляцию [Strukova et al., 1996]. IP₃-опосредованное высвобождение Ca²⁺ – это основной механизм тромбин-ПАР-1-G_{q/11}-опосредованного увеличения [Ca²⁺]_i в эндотелиальных клетках головного мозга крыс (RBMVEC). IP₃, воздействуя на рецепторы IP₃, высвобождает Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума. Локальное увеличение [Ca²⁺]_i дополнительно способствует высвобождению данного иона через рианодиновые рецепторы по Ca²⁺-индуцированному механизму [Brailoiu et al., 2017]. В эндотелиальных клетках, аналогично другим клеткам, высвобождение Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума и последующее истощение его запасов приводит к притоку Ca²⁺ посредством SOCE (депо-управляемого входа кальция) [Putney, 1986; Tiruppathi et al., 2006]. На клетках RBMVEC тромбин подобным образом высвобождает Ca²⁺ из хранилища ретикулума и способствует SOCE.

ЛПС стимулирует дегрануляцию клеток и способствует FcεRI-зависимой мобилизации Ca²⁺ через SOCs, влияя на экспрессию и транскрипцию субъединиц этих каналов [Yang et al., 2012]. При активации ТК происходит повышение [Ca²⁺]_i, связанное с его выходом из эндоплазматического ретикулума, ведущее к истощению этого депо Ca²⁺ и инициирующее вход Ca²⁺ через SOCs плазматической мембраны. Все это приводит к увеличению [Ca²⁺]_i, что является существенным для сигнальных каскадов клетки [Blank, Rivera, 2004; Rivera et al., 2008; Dráber et al., 2012].

Нами показано, что тромбин (10 нМ) вызывает транзиторное возрастание внутриклеточной концентрации [Ca²⁺]_i в RBL-2H3, имеющее сходную конфигурацию с ответом клеток на ЛПС, но более выраженное по амплитуде (о чем свидетельствует размер площади под графиком), чем при добавке эндотоксина (Рисунок 41). На рисунке 41А видно, что вызванное ЛПС изменения внутриклеточного кальция отменяется предварительной инкубацией клеток с тромбином.

Вероятно, это связано с трансдукцией сигнальных путей, запускаемых тромбином через G_q-белок при расщеплении ПАР-1 и активируемых ЛПС TLR4 через фосфоинозитидный путь с образованием вторичных мессенджеров IP₃ и DAG, приводящим к выходу кальция из эндоплазматического ретикулума [Coughlin, 2000; Chiang et al., 2012; Tauseef et al., 2012]. Трансдукция сигнальных каскадов наблюдается при разных типах воспалительных воздействий: известно, что действие интерферона гамма на фибробласты сопряжено с перекрестом PKG- и PKA-ассоциированных путей [Mitrokhin et al., 2019] Можно предположить, что к моменту добавления ЛПС (на фоне

тромбина) запасы Ca^{2+} истощены или инактивированы механизмы высвобождения иона в цитозоль.

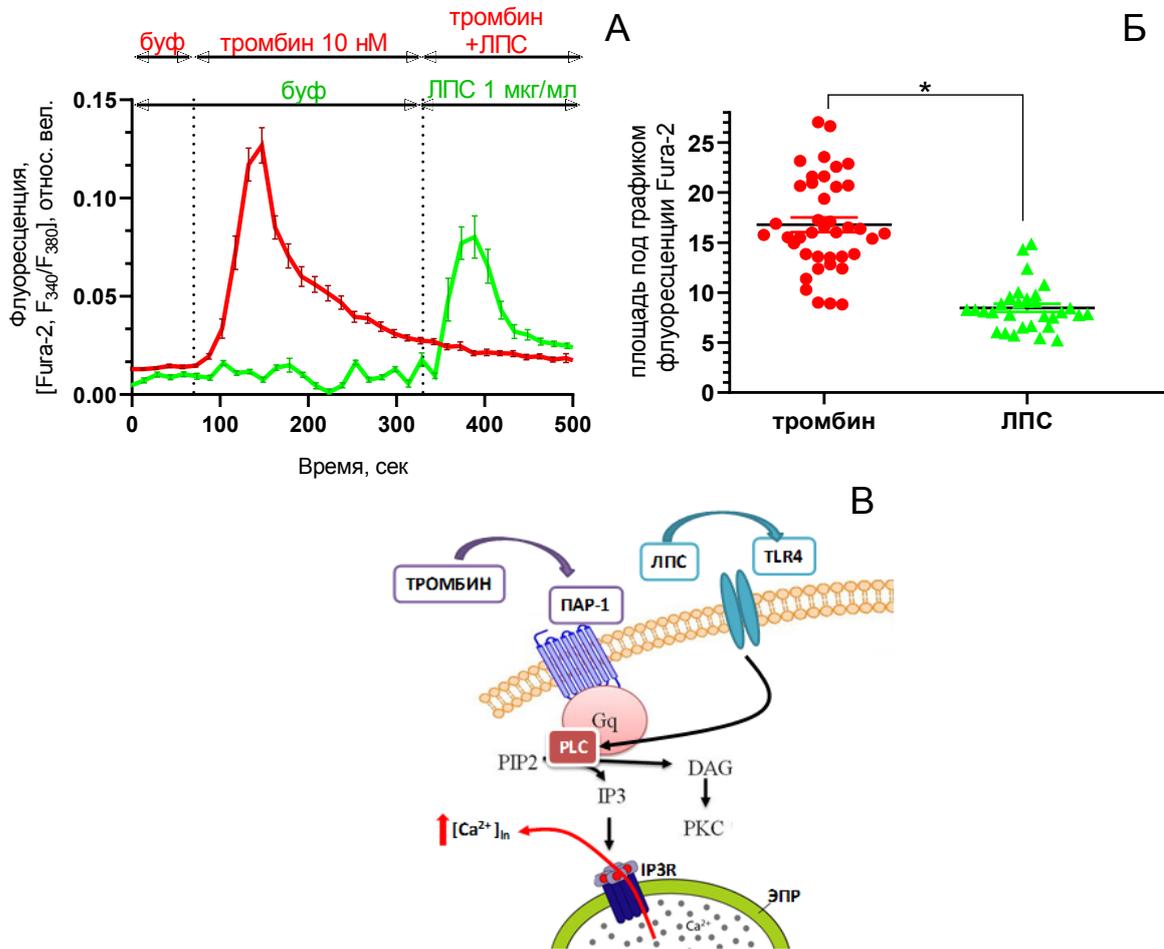


Рисунок 41. Влияние тромбина (10 нМ) и ЛПС (1 мкг/мл) на изменение внутриклеточной концентрации кальция в культуре клеток линии RBL-2H3 (А). Площадь под графиком Ca^{2+} -зависимой флуоресценции Fura-2 на клетках линии RBL-2H3 (Б). Схема трансдукции сигнальных путей, запускаемых тромбином и ЛПС (В). Ca^{2+} -зависимая флуоресценция высокоаффинного кальциевого индикатора Fura-2. * $p < 0,05$ по сравнению с тромбином, $n = 60 \pm 10$ нейронов в не менее 2-х независимых культурах клеток в каждой группе.

Тромбин дозозависимо вызывает кальциевый ответ на эндотелиальных клетках головного мозга крысы [Brailoiu et al., 2017]. Тромбин в высокой концентрации демонстрирует провоспалительное действие, что согласуется с данными нашей лаборатории о провоспалительном действии тромбина в высоких концентрациях [Strukova et al., 1996; Иванова и др., 2013].

На следующем этапе, мы оценивали влияние АПС и АП9 на $[Ca^{2+}]_i$ в RBL-2H3. Нами показано, что 10-минутная предобработка клеток линии RBL-2H3 с АП9 приводила к существенному уменьшению амплитуды Ca^{2+} -ответа, вызванного высокой концентрацией тромбина (50 нМ). Интересно, что АПС не обладал столь выраженным действием в этих условиях (Рисунок 42). При этом, изолированное действие АПС и АП9 не влияло на уровень кальция, что согласуется с ранее полученными нами для АПС данными на нейронах [Gorbacheva et al., 2008]. Возможно, протекторный механизм действия синтетического пептида АП9 и АПС связан с запуском β -аррестин-зависимого сигнального каскада, который, как показано ранее, вызывает эффект противоположный G-белок зависимому действию тромбина [Schulte, Shenoy, 2011].

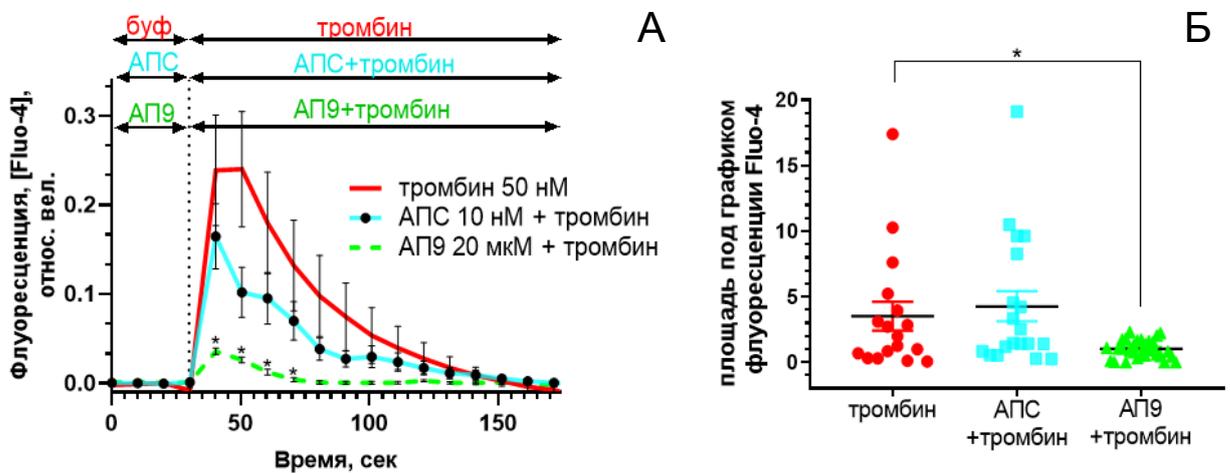


Рисунок 42. Влияние АПС (10 нМ) и АП9 (20 мкМ) на изменение внутриклеточной концентрации кальция в культуре клеток линии RBL-2H3, при активации их тромбином (50 нМ) (А). Площадь под графиком Ca^{2+} -зависимой флуоресценции Fluo-4 на клетках линии RBL-2H3 (Б). Ca^{2+} -зависимая флуоресценция высокоаффинного кальциевого индикатора Fluo-4. $n = 80 \pm 5$. * $p < 0,05$ по сравнению с тромбином.

Необходимо отметить, что выраженность изменения $[Ca^{2+}]_i$ при аппликации тромбина (50 нМ) на клетки по сравнению с действием других провоспалительных стимулов, например, ЛПС, может свидетельствовать о более высокой специфичности провоспалительного действия протеазы на RBL-2H3, чем эндотоксина.

3.2.1.5. Влияние агонистов ПАР-1 на изменение актинового цитоскелета тучных клеток

Активация иммунокомпетентных клеток сопровождается запуском секреции, что сопряжено с перестройкой актинового цитоскелета [Deng et al., 2009].

Ранее нами показано, что стимуляция клеток линии RBL-2H3 провоспалительными либераторами приводит к реорганизации актинового цитоскелета, характерного для экзоцитоза (Рисунок 23). Защитные эффекты, вызванные АПС при остром воспалении, могут быть связаны со стабилизацией цитоскелета ТК.

Установлено, что предобработка клеток АП9, АПС, а также тромбином (10 нМ) перед активаторами (ЛПС и А23187) способствовала стабилизации цитоскелета клеток до уровня контрольной группы (Рисунок 43). Ранее феномен стабилизации цитоскелета, индуцируемый АПС, был описан в активированных эндотелиальных клетках [Komarova et al., 2007]. Аналогичный эффект АПС продемонстрирован на астроцитах, где он снижал вызванную тромбином дезорганизацию фибрилл и образование «free fields» [Иванова и др., 2013]. Возможный механизм подобного эффекта показан Мознером с коллегами: АПС запускает активацию Rac1 в эндотелиальных клетках, стабилизируя цитоскелет-опосредованные межклеточные взаимодействия и предотвращая формирование стресс-фибрилл [Mosnier et al., 2014].

Необходимо отметить, что анализ данного параметра при аппликации на клетки тромбина 50 нМ указывает на провоспалительный характер действия протеазы и потенцирование эффектов ЛПС и А23187 (Рисунок 43). Из литературных источников известно, что тромбин в эндотелиальных клетках капилляров мозга крысы увеличивал F-актиновые стрессовые волокна, уменьшал периферическое окрашивание ZO-1 (белок плотных контактов) и индуцировал образование межклеточных зазоров, указывая на изменения цитоскелета и разрушение плотных контактов, и способствовал увеличению проницаемости капилляров [Brailoiu et al., 2017].

В нашей работе тромбин в высокой концентрации 50 нМ способствует смещению актиновых филаментов в околядерную зону из подмембранной области отростков. Схожие перестройки кортикального F-актина наблюдаются после FcεRI-вызванной стимуляции ТК и интерпретируется во многих исследованиях как важный шаг в облегчении слияния гранул с плазматической мембраной, необходимого для высвобождения содержимого гранул во внеклеточную среду [Holm Nielsen et al., 1989; Narasimhan et al., 1990; Frigeri, Apgar, 1999; Oka et al., 2004; Gorbacheva et al., 2008]. Подобные изменения, вероятно, опосредованы взаимодействием тромбина с ПАР-1 и усилением сигнала через активацию RhoA, что приводит к перестройке цитоскелета в клетках [Soh et al., 2010].

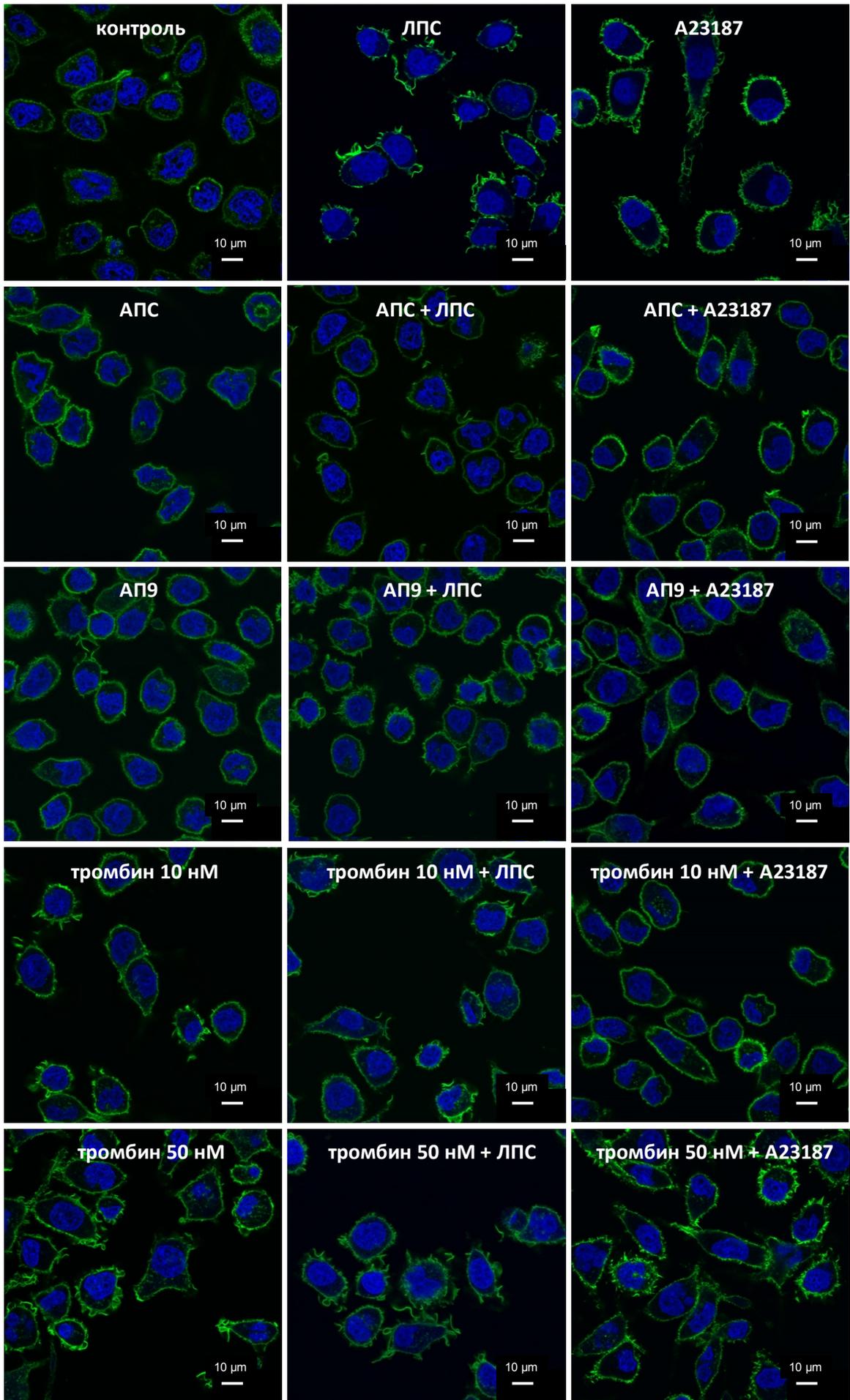


Рисунок 43. Влияние агонистов ПАР-1 на изменение актинового цитоскелета клеток линии RBL-2H3, активированных A23187 и ЛПС. Детекцию F-актина осуществляли с использованием фаллоидина, конъюгированного с Alexa 488 (зелёная флуоресценция). Синяя флуоресценция – DAPI – ДНК-тропный краситель. Репрезентативные снимки соответствующих клеточных культур, полученные с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (ZIESS, Германия).

3.2.2. Особенности влияния агонистов ПАР-1 на астроциты

3.2.2.1. Экспрессия ПАР-1, ЭРПС на астроцитах

Из литературных данных известно, что астроциты экспрессируют ПАР-1. С помощью иммуноцитохимического окрашивания нами показано наличие эндотелиального рецептора протеина С (ЭРПС) на астроцитах крыс. Это свидетельствует о возможности запуска клеточных каскадов, активируемых АПС через ПАР-1 и его корецептор ЭРПС, также активируемых АП9 – неканоническим агонистом ПАР-1 (Рисунок 44).

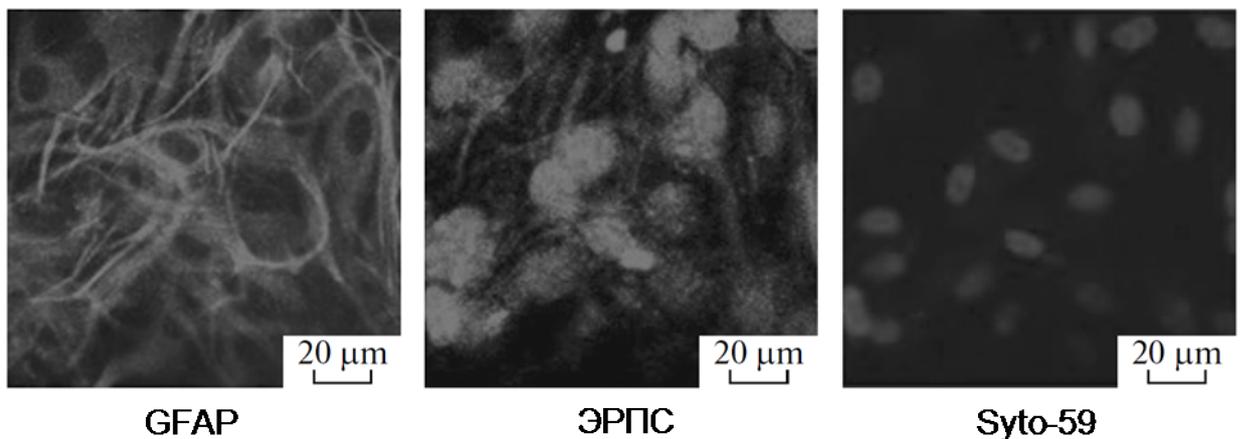


Рисунок 44. Экспрессия ЭРПС, GFAP в первичной культуре астроцитов крыс. Репрезентативные данные иммуноцитохимического окрашивания ЭРПС – специфическими анти-ЭРПС антителами (Santa Cruz, США), GFAP – специфическими анти-GFAP антителами (Millipore, США) и ДНК-тропного маркера Syto59 получены с помощью LSM 510 (Carl Zeiss). GFAP = глиальный фибриллярный кислый белок.

3.2.2.2. Влияние агонистов ПАР-1 на пролиферацию и выживаемость астроцитов в условиях их активации провоспалительными факторами

Согласно литературным данным, одним из проявлений провоспалительной активации астроцитов является усиление их пролиферации.

Существуют доказательства, что активация ПАР-1 приводит к астроглиозу после повреждения головного мозга *in vivo* через путь ERK1/2 [Wang et al., 2002; Nicole et al., 2005]. Астроглиоз считается барьером для нейрорегенерации и связан с нейродегенерацией после травмы головного мозга. Следовательно, глиальная активация ERK1/2, вызванная ПАР, может привести к потере нейронов после повреждения головного мозга. ERK1/2 также принимает непосредственное участие в ПАР-1- и ПАР-4-опосредованной гибели нейронов гиппокампа.

Мы оценили изолированное действие АПС, тромбина и АП9 на пролиферативную активность первичной культуры астроцитов. Установлено, что АПС, АП9 и тромбин 10 нМ не оказывают влияния на данный показатель. Однако, тромбин в высоких концентрациях достоверно повышал уровень пролиферации астроцитов в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой, что согласуется с литературными данными о провоспалительном действии протеазы (Рисунок 45).

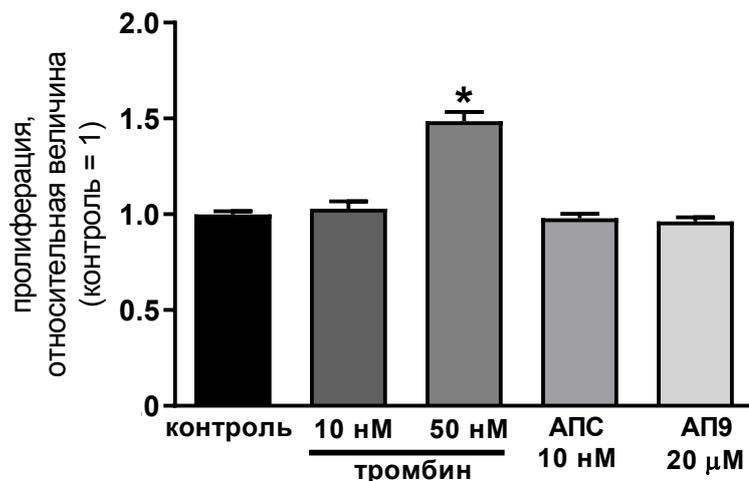


Рисунок 45. Влияние агонистов ПАР-1 (тромбина, АПС и АП9) на пролиферацию первичной культуры астроцитов. * $p < 0,05$ – относительно контроля. $n \geq 6$.

Ранее нами показано, что элемент клеточной стенки бактерий – ЛПС (0,1 мкг/мл) стимулирует активацию астроцитов и повышает их пролиферативную активность (Рисунок 24). В следующей серии экспериментов установлено, что АП9 (20 мМ) как при однократной, так и многократной аппликации ЛПС, не изменял уровень пролиферации астроцитов (Рисунок 46).

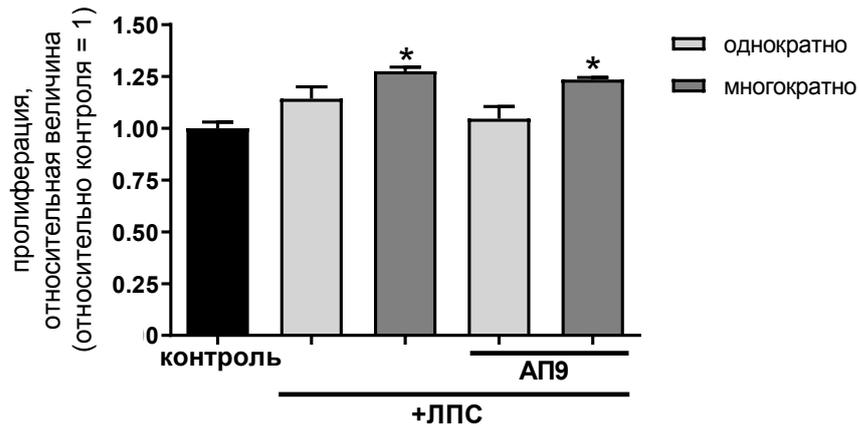


Рисунок 46. Влияние АП9 (20 μM) на ЛПС (0,1 мкг/мл)-вызванную пролиферацию астроцитов крыс в культуре. * $p < 0,05$ – относительно контроля. $n \geq 4$.

Согласно литературным данным, в очагах повреждения и воспаления происходит активное высвобождение АТФ через неселективные поры поврежденной плазматической мембраны активированных клеток, а также из погибших клеток и существенное повышение его внеклеточной концентрации. В данной ситуации он может выступать как провоспалительный агент, взаимодействуя с пуриновыми рецепторами клеток мозга.

Внеклеточный АТФ играет важную роль в координации активности астроцитов и нейронов, а aberrantная сигнализация связана с нейродегенеративными заболеваниями. У грызунов АТФ стимулирует открытие Ca^{2+} каналов, образованных субъединицами P2X-рецептора [Muller, Taylor, 2017].

Таким образом, АТФ в астроцитах способствует различным физиологическим и патофизиологическим процессам, включая высвобождение гликотрансммиттера, экспрессию цитокинов, ноцицепцию, регуляцию синаптической активности, астроглиоз, вызванный ишемией, и болезнь Альцгеймера [Franke et al., 2001; Duan et al., 2003; Pascual et al., 2005; Lämmer et al., 2006; Delekate et al., 2014].

На первичной культуре астроцитов нами показано, что 48-часовое воздействие бензоилАТФ в концентрации 100 и 300 μM не влияло на уровень выживаемости астроцитов, в тоже время бензоилАТФ в более высокой концентрации (500 μM) способствовал снижению данного показателя по сравнению с контрольной группой. Предварительная аппликация АПС (10 нМ), но не тромбина (10 нМ), за 15 минут до воздействия АТФ повышала выживаемость клеток в первичной культуре астроцитов (Рисунок 47).

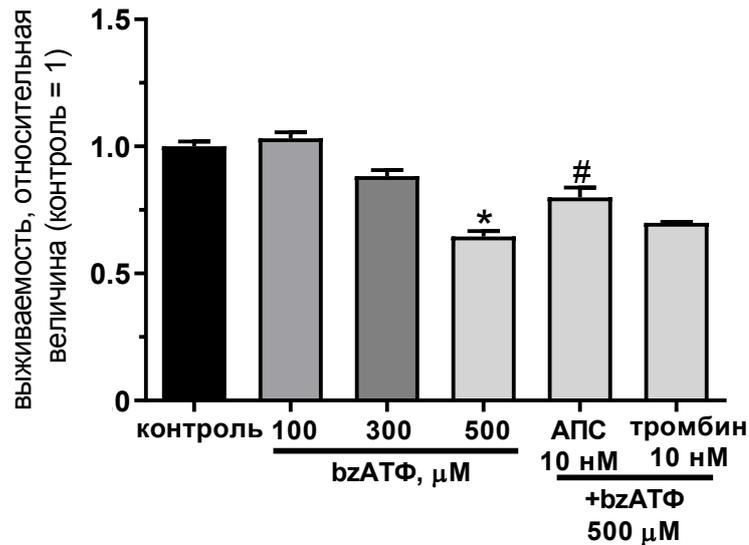


Рисунок 47. Влияние агонистов ПАР-1 (АПС и тромбин) на выживаемость активированных бензоилАТФ (bzАТФ) астроцитов. * $p < 0,05$ – по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ – по сравнению с группой bzАТФ 500 μM . $n \geq 3$.

3.2.2.3. Влияние агонистов ПАР-1 на секреторную активность астроцитов в условиях их активации провоспалительными факторами

В последние годы тромбин все чаще рассматривается как провоспалительный агент, поскольку он способен стимулировать клетки к высвобождению провоспалительных медиаторов. Астроциты являются важным типом клеток, участвующим в воспалительных реакциях, индуцируемых ПАР в мозге. Действительно, тромбин, воздействуя на ПАР, индуцирует высвобождение арахидоновой кислоты в клетках астроцитомы человека [Hernández et al., 1997] и астроцитах крысы [Strokin et al., 2003].

IL-6 и TNF α одними из первых высвобождаются в очаге повреждения мозговой ткани, запуская морфологические и функциональные изменения клеток мозга, увеличивая проницаемость ГЭБ, инфильтрацию лейкоцитов, а так же модулируя выживаемость как нейронов, так и глии [Penkowa et al., 2003; Kucher, Neary, 2005; Mosnier et al., 2014].

Активация астроцитов запускает и усиливает секрецию ими цитокинов, таких как TNF α , IL-1 β и IL-6 [Ponath et al., 2018].

На следующем этапе работы установлено, что тромбин 50 нМ повышал высвобождение TNF α . В тоже время предварительная инкубация клеток с АПС или АП9 способствовала снижению секреции провоспалительного цитокина (Рисунок 48).

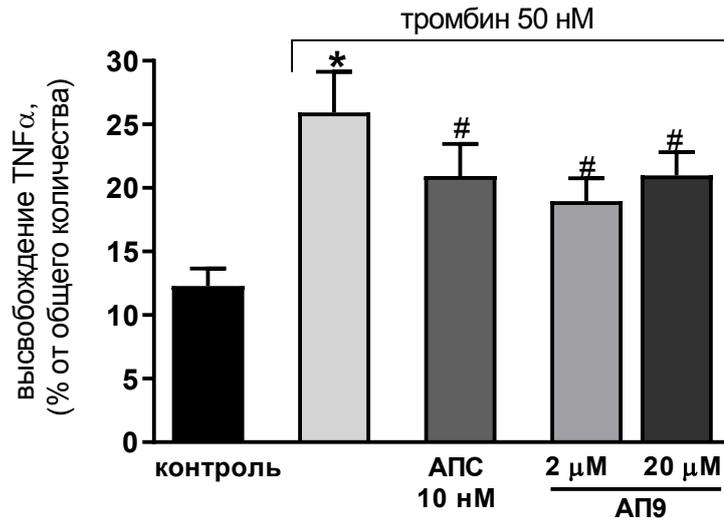


Рисунок 48. Влияние АПС и АП9 на тромбин-вызванное высвобождение TNF α астроцитами крыс через 24 часа после воздействия. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с тромбином 50 нМ. $n \geq 3$.

Другим активно вовлекаемым в развитие воспаления цитокином является IL-6. Астроциты экспрессируют провоспалительный цитокин IL-6, высвобождаемый ими при развитии воспаления [Benveniste et al., 1990].

Нами показано увеличение секреции IL-6 астроцитами под действием высоких концентраций тромбина. При этом АП9 не купирует тромбин-вызванную активацию секреции астроцитами (Рисунок 49).

В лаборатории Окада на модели повреждения спинного мозга показано, что тромбином-индуцируемое высвобождение IL-6 может обеспечиваться ПАР-1-опосредованной активацией белка $G_{12/13}$, запускающего каскада RhoGEF-RhoA-фосфолипаза C ϵ – DAG и PKC – PKD, завершающийся повышением экспрессии IL-6, COX-2 и других провоспалительных генов [Okada et al., 2004].

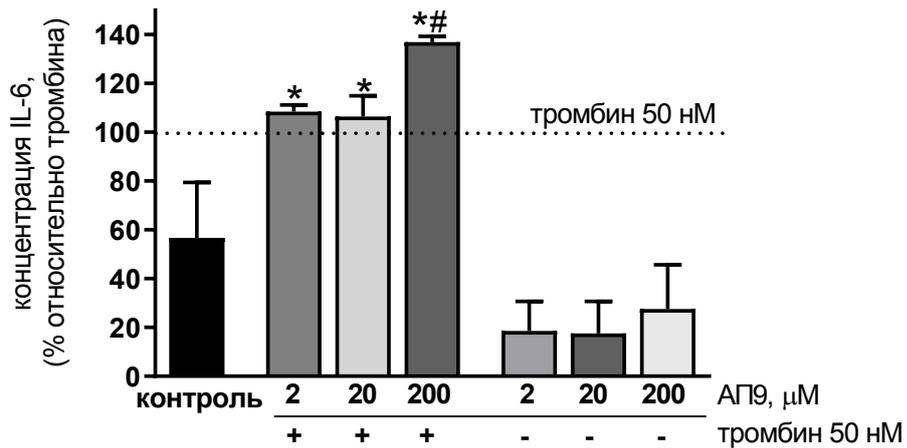


Рисунок 49. Влияние АП9 на высвобождение IL-6 астроцитами крыс, вызванное тромбином, через 12 часа после воздействия. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с тромбином 50 нМ. $n \geq 3$.

3.2.2.4. Влияние агонистов ПАР-1 на кальциевый гомеостаз астроцитов в условиях их активации провоспалительными факторами

Известно, что высвобождаемый при провоспалительной стимуляции ТК гистамин может потенцировать активацию клеток микроокружения – астроцитов и нейронов.

Известно, что амплитуда Ca^{2+} -ответа астроцитов на гистамин, так же как и для нейронов, имеет дозозависимый характер [Patel et al., 2016]. При воздействии гистамина у большинства астроцитов был зарегистрирован двухфазный Ca^{2+} -ответ. 10-минутная инкубация астроцитов с АП9 приводит к изменению кальциевого ответа астроцитов на последовательно добавленный гистамин. Наблюдается уменьшение амплитуды Ca^{2+} -ответа на гистамин и смена двухфазного профиля ответа на однофазный (Рисунок 50).

АП9, по-видимому, не только снижает секреторную активность иммунокомпетентных клеток, демонстрируя защитное действие, но и предотвращает распространение воспаления, снижая потенциал провоспалительных медиаторов, направленный на вовлечение новых клеток в воспалительный процесс.

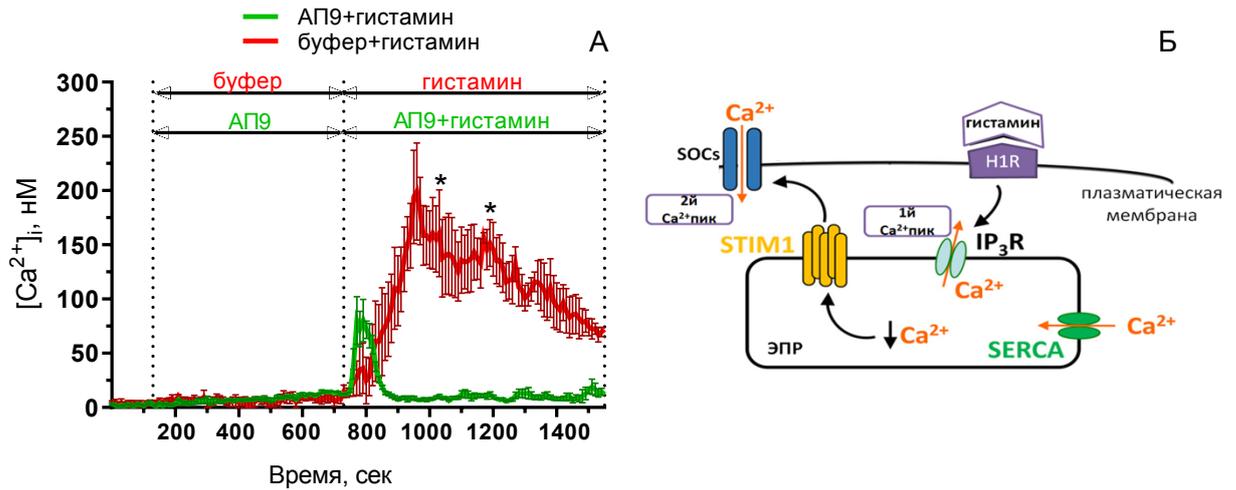


Рисунок 50. Влияние предварительной аппликации АП9 (100 мкМ) на вызванное гистамином (100 мкМ) изменение внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в культуре астроцитов (А). Сигнальный каскад, приводящий к росту внутриклеточной концентрации кальция (Б). $[Ca^{2+}]_i$ измеряли методом флуоресцентной микроскопии с использованием высокоаффинного кальциевого индикатора Fura-2. * $p < 0,05$ по сравнению с группой, где клетки не предобработывали АП9. $n = 4$.

3.2.3. Особенности влияния агонистов ПАР-1 на нейроны

3.2.3.1. Экспрессия ПАР-1, ЭРПС на нейронах

С помощью иммуноцитохимического метода и вестерг-блоттинга нами подтверждено наличие ПАР-1 и ЭРПС на клеточной поверхности нейронов. Данные результаты свидетельствуют о возможности запуска ПАР-1-опосредованных сигнальных каскадов (Рисунок 51 и 52).

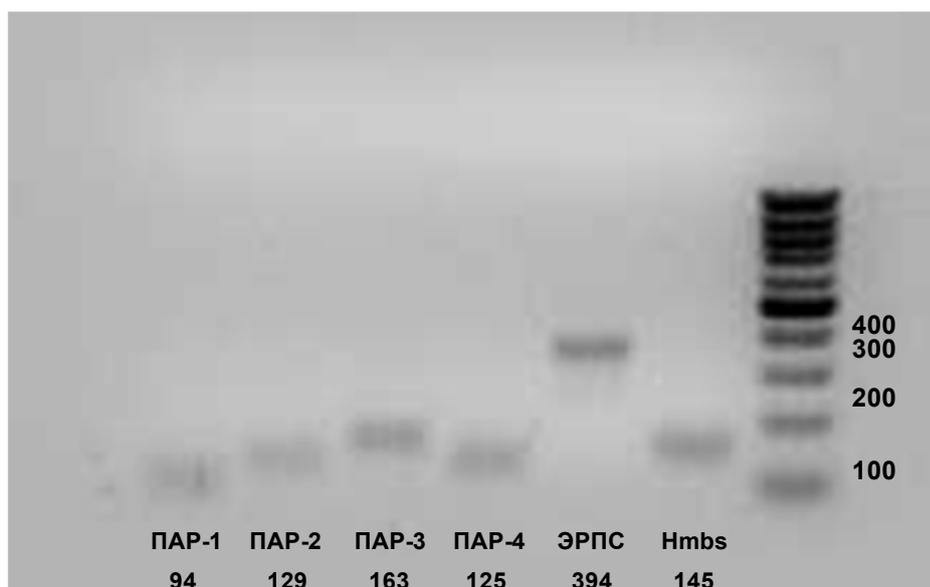


Рисунок 51. Экспрессия ПАР, ЭРПС и референсного гена Hmbs в 9-дневной культуре гиппокампальных нейронов. Результаты ОТ ПЦР визуализированы методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием с маркером Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, США).

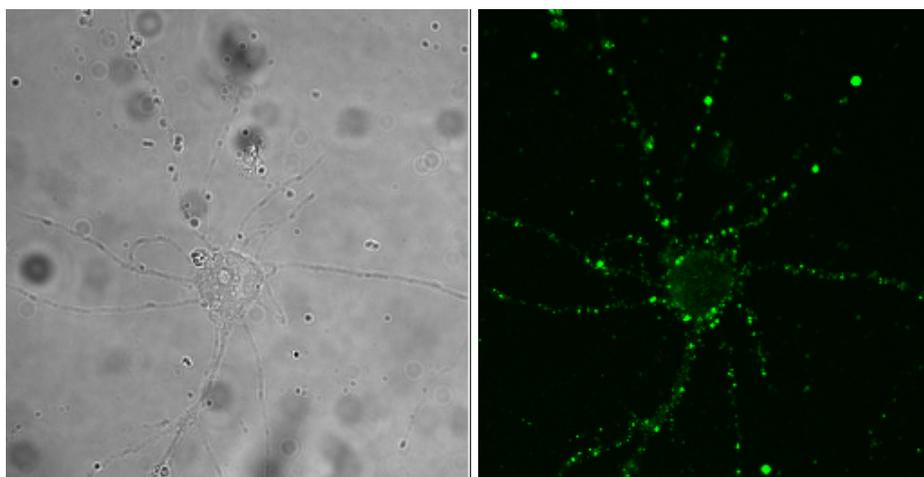


Рисунок 52. Иммунофлуоресцентное окрашивание (АТАР2)-специфическими анти-ПАР-1 антитела (SantaCruz, США) первичной культуры нейронов крысы.

3.2.3.2. Влияние агонистов ПАР-1 на выживаемость нейронов в условиях их активации провоспалительными факторами

АТФ является транмиттером во многих типах нейронов, что, вероятно, отражает раннее эволюционное появление пуриnergической сигнальной системы [Burnstock, 1996, 2004]. Высокие уровни «сигнала опасности» - АТФ и другие нуклеотиды - активно высвобождаются при стимуляции или пассивной утечке из поврежденных или умирающих клеток [Bulanova, Vulfone-Paus, 2010], что в свою очередь приводит к

активации нейронов, микроглии и астроцитов через P2X7 рецептор и запуску высвобождения из них провоспалительных факторов, вовлекая все клетки мозга в «порочный круг» развития нейродегенеративных процессов.

На нейронах обнаружено 7 подтипов P2X (P2X1- P2X7) [Li et al., 2008], которые опосредуют быстрый ответ на АТФ. Особенно выделяется P2X7: для его активации нужны mM концентрации АТФ [Kim, Moalem-Taylor, 2011]; он запускает вход кальция и натрия и выход калия [Verkhrasky et al., 2009]; а при длительном воздействии АТФ данный рецептор становится неселективной трансмембранной порой [Yan et al., 2008].

Также показано, что рецепторы P2X7 участвуют в эпилептических припадках, поскольку гиппокамп хронических эпилептических крыс реагирует аномально на АТФ в связи с увеличением экспрессии этого рецептора [Vianna et al., 2002].

В следующей серии экспериментов мы исследовали влияния АП9 и АПС на клетки мозга в условии их активации АТФ. На культуре нейронов не выявлено достоверных изменений выживаемости на фоне действия 1 и 5 mM АТФ на клетки в присутствии АП9 и АПС. При этом, для данных концентраций АП9 и АПС есть тенденция повышения выживаемости нейронов. Возможно, более ярко этот эффект будет наблюдаться при иных концентрациях агонистов PAR-1 (Рисунок 53).

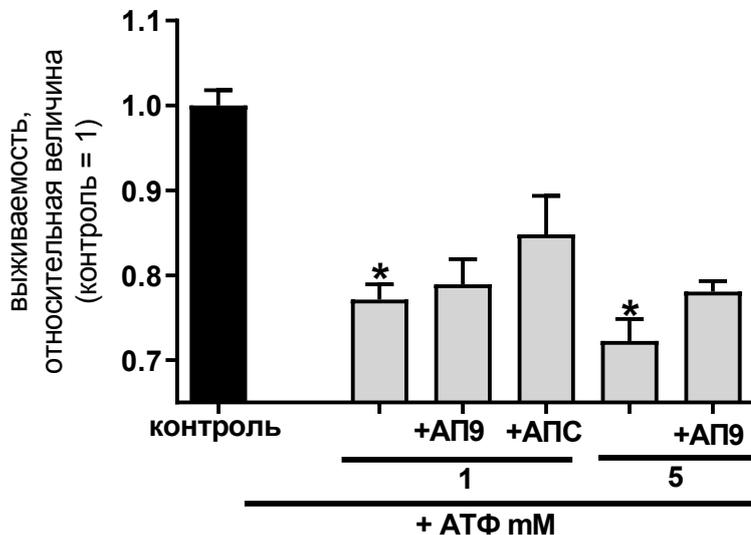


Рисунок 53. Влияние агонистов PAR-1 (АПС (10 нМ), АП9 (20 мкМ)) на выживаемость гиппокампальных нейронов при токсическом действии АТФ. * $p < 0,05$ – относительно контроля. $n \geq 3$.

Выход АТФ во время возбуждения или повреждения нейронов может усиливать воспалительные эффекты цитокинов и PGE2 астроцитов и способствовать развитию хронического воспаления, как при болезни Альцгеймера [Xu et al., 2003]. Рецепторы

R2X7, регулируемые АТФ, являются важными триггерами нейровоспаления в различных тканях, в том числе в головном мозге.

Используя морфологический метод оценки выживаемости нейронов в условиях токсичности, вызванной АТФ, было выявлено, что в этом случае тенденция протекторного действия АП9 на фоне АТФ более выражена, а при активации клеток 5 мМ АТФ достоверно снижает долю апоптотических клеток (Рисунок 54 и 55).

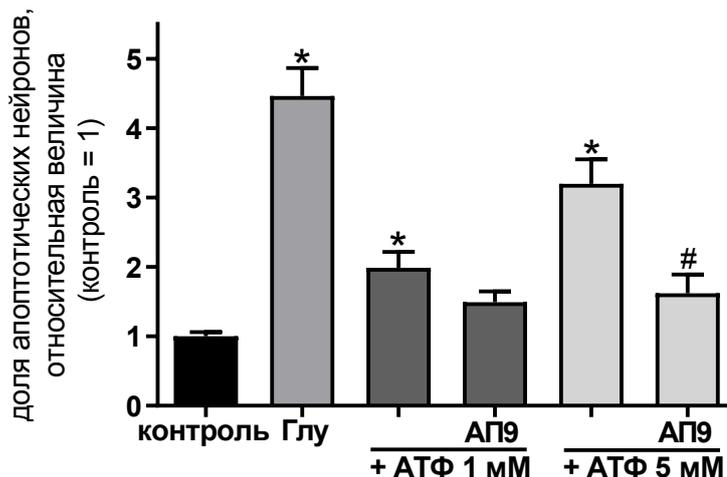


Рисунок 54. Влияние АП9 (20 мкМ) на выживаемость нейронов, активированных токсическим действием АТФ. Глутамат (100 мкМ) (Глу). Морфологическая оценка выживаемости нейронов. * $p < 0,05$ – относительно контроля. # $p < 0,05$ – относительно группы с АТФ 5 мМ. $n \geq 3$.

Высвобождающийся при возбуждении в синаптическую щель глутамат взаимодействует со своими рецепторами на постсинапсе, одним из которых является ионотропный рецептор NMDA.

Каков вклад данного типа рецепторов в глутамат опосредованную кальциевую дисрегуляцию мы исследовали с помощью селективного агониста NMDA-рецепторов – N-метил-D-аспарагиновую кислоту (300 мкМ). Данная концентрация NMDA вызывала развитие устойчивого Ca-ответа у нейронов. При добавлении бескальциевого раствора к клеткам с течением времени происходило восстановление базального уровня кальция.

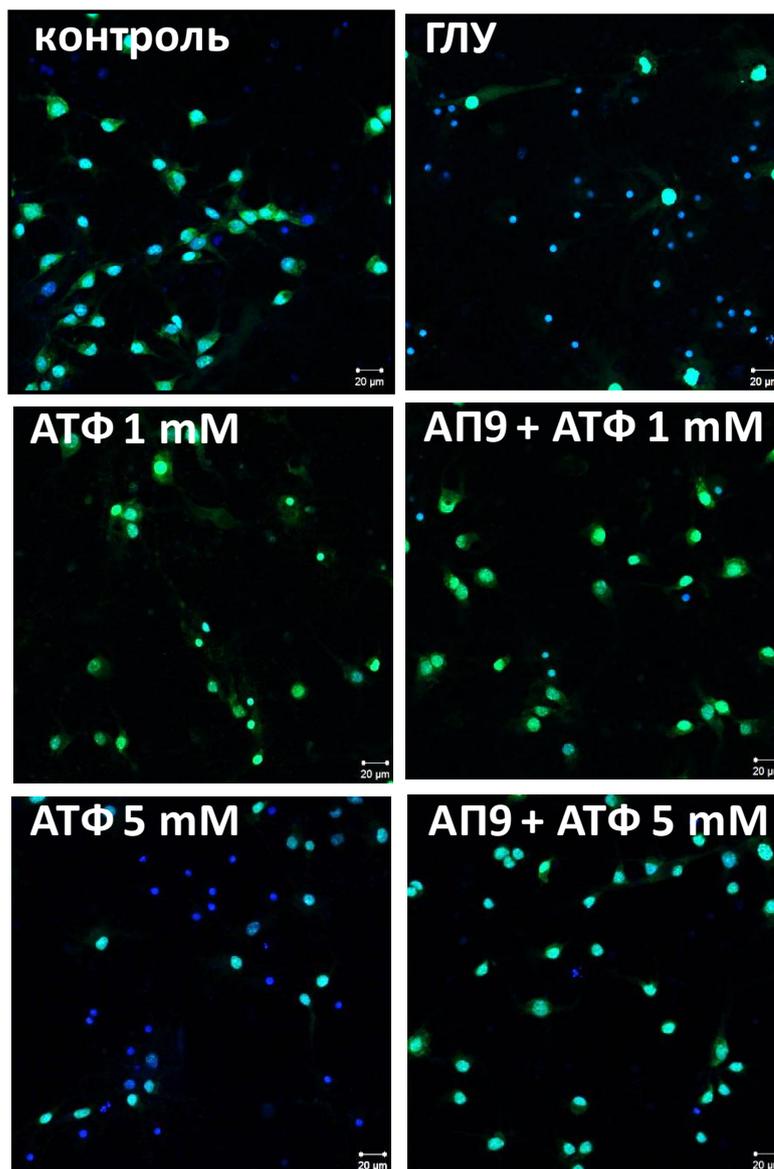


Рисунок 55. Микрофотографии нейронов, окрашенных витальным красителем Syto-13 (зелёная флуоресценция) и ДНК-тропным красителем Hoechst 33342 (апоптоз, синяя флуоресценция). Репрезентативные снимки соответствующих клеточных культур получены с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (ZIESS, Германия).

Далее мы оценивали действие агонистов ПАР-1 на Ca-ответ при активации NMDA рецепторов. Нами впервые продемонстрировано, что инкубация клеток с АП9 существенно изменяла NMDA-вызванную Ca-дизрегуляцию в нейронах, снижая как амплитуду, так и площади под кривой изменения цитозольного кальция (Рисунок 56).

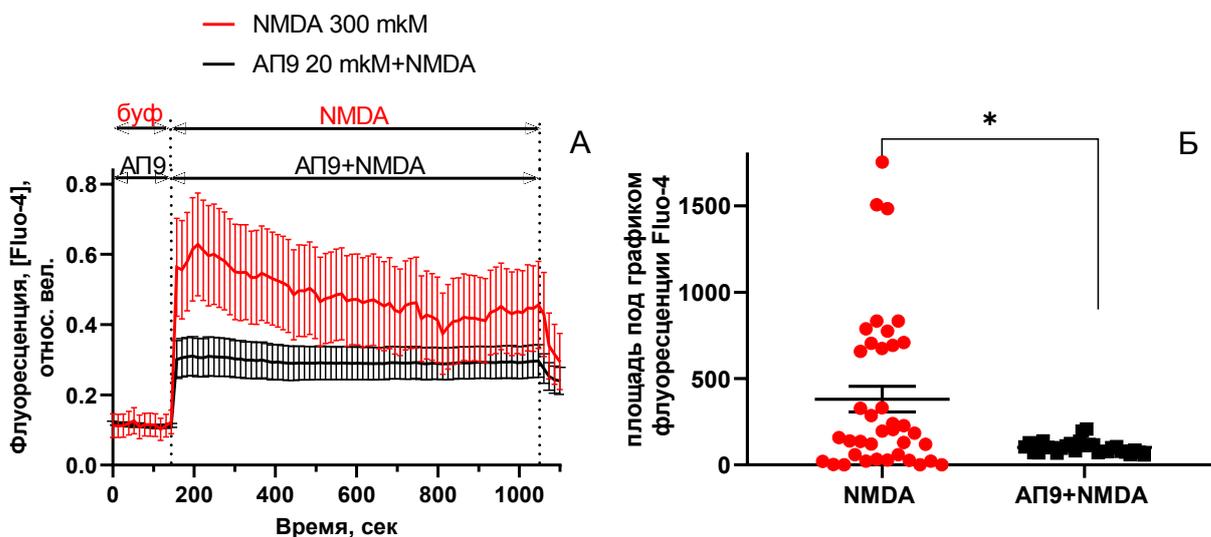


Рисунок 56. Влияние пептида АП9 (20 мкМ) на изменение внутриклеточной концентрации кальция в культуре гиппокампальных нейронов (А). Площадь под графиком Ca^{2+} -зависимой флуоресценции Fluo-4 на культуре гиппокампальных нейронов (Б). Ca^{2+} -зависимая флуоресценция высокоаффинного кальциевого индикатора Fluo-4. * $p < 0,05$ по сравнению с NMDA. $n = 40 \pm 10$ нейронов в не менее 2-х независимых культурах клеток в каждой группе.

Известно, что чрезмерная активация нейронов может приводить к кальциевой перегрузке и развитию глутаматной-эксайтотоксичности. Нами установлено, что предварительная аппликация клеточной культуры с протектором – синтетическим пептидом АП9 – способствует достоверному повышению числа живых клеток в условии токсичности, вызванной глутаматом (Рисунок 57).

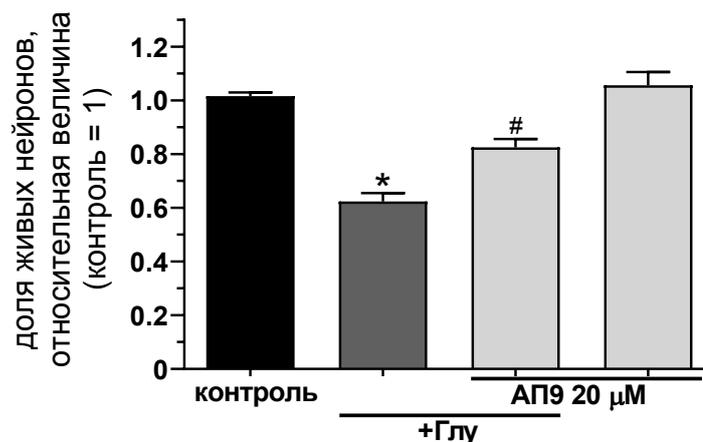


Рисунок 57. Влияние АП9 на выживаемость нейронов в условиях глутаматной эксайтотоксичности (Глу) (100 мкМ). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с глутаматом. $n = 10 - 15$.

Для исследования рецепторного механизма протекторного действия агонистов ПАР-1 – АПС и синтетического пептида АП9 в условиях глутаматной токсичности нами использован блокатор ПАР-1 – SCH79797. Установлено, что блокада ПАР-1 отменяет протекторное действие АПС и АП9 (Рисунок 58). При этом ранее показано, что АПС предотвращает активацию NF-κB, вызванную глутаматной эксцитотоксичностью, и оказывает цитопротекторных эффект, снижая клеточную гибель нейронов [Gorbacheva et al., 2010].

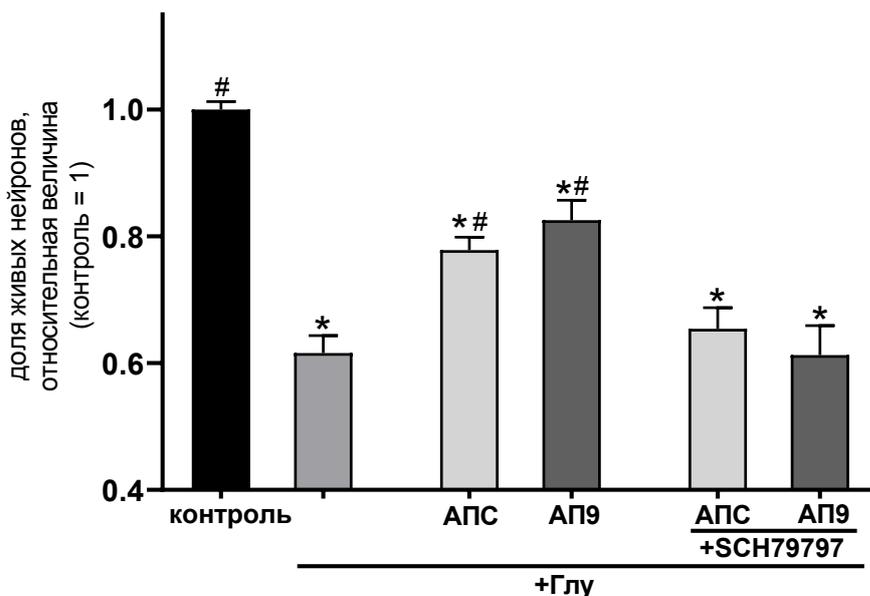


Рисунок 58. Влияние АП9 (20 мкМ), подобно АПС (10 нМ), оказывает протекторное действие при глутаматной эксцитотоксичности (Глу) (100 мкМ). Для нейропротекторного действия как АП9, так и АПС необходим ПАР-1. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с глутаматом. $n \geq 3$.

3.2.3.3. Влияние агонистов ПАР-1 на кальциевый гомеостаз нейронов в условия их активации провоспалительными факторами

Повреждение мозговой ткани сопровождается воспалительным процессом, что проявляется как в повышении уровня секреции ТК, так и их числа в очаге повреждения мозга. Каким образом активация ТК может сказываться на деятельности и состоянии клеток мозга до конца не ясно. В связи с этим, в следующей серии экспериментов мы оценивали уровень свободного кальция в нейронах при действии на них основного медиатора тучных клеток гистамина. Как видно на рисунке 59, добавление гистамина (100мкМ) в культуральную среду нейронов вызывает 2-х фазное изменение $[Ca^{2+}]_i$. За первоначальным, быстро нарастающим пиком, следовал второй пик меньшей амплитуды. Первый пик отражает рост концентрации Ca^{2+} за счёт его выхода из внутриклеточных

депо в цитозоль (в основном через IP₃-рецепторы на эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), в то время как второй пик опосредован входом экстраклеточного Ca²⁺ [Bell et al., 2015]. Вход экстраклеточного Ca²⁺ осуществляется через SOCs (депо-управляемые Ca²⁺ каналы) на плазматической мембране, активируемые в результате взаимодействия белков STIM в ЭПР и ORAI белков (являющихся частью SOCs) в плазматической мембране [Lee et al., 2010].

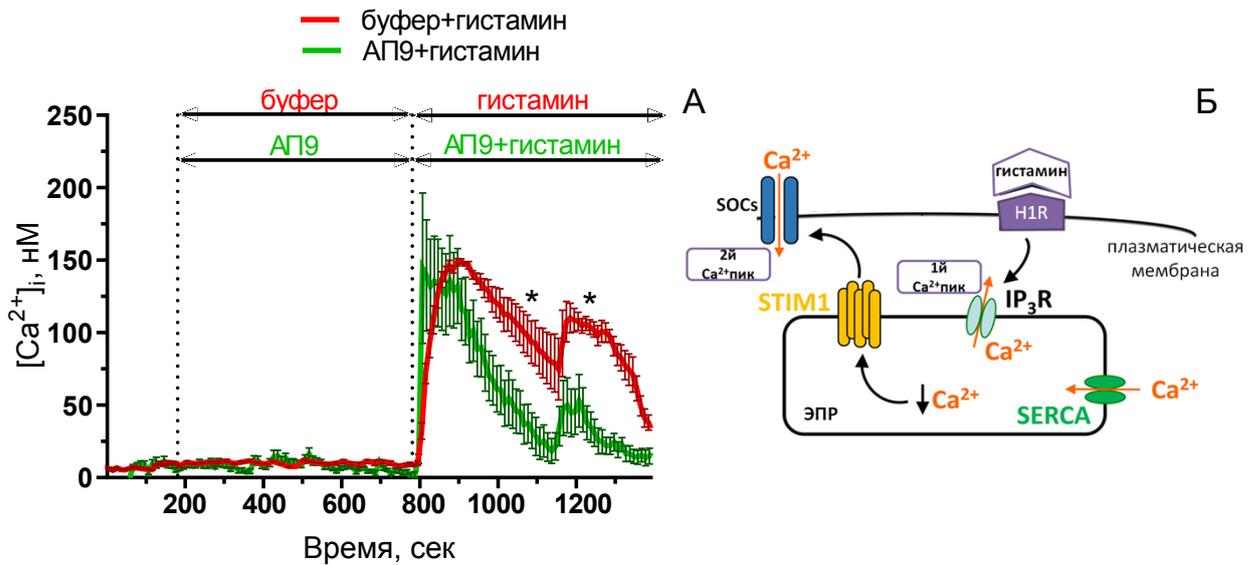


Рисунок 59. Влияние синтетического АП9 (100 мкМ) и гистамина (100 мкМ) на концентрацию внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в гиппокампальных нейронах (А). Сигнальный каскад, приводящий к росту внутриклеточной концентрации кальция (Б). $[Ca^{2+}]_i$ измеряли методом флуоресцентной микроскопии с помощью высокоаффинного индикатора Fura-2/AM. * $p < 0,05$ по сравнению с группой, где клетки не предобработывали АП9. $n = 7$.

Предобработка гиппокампальных нейронов АП9 в концентрации 100 мкМ за 10 минут до их активации гистамином приводила к сужению профиля Ca-ответа и уменьшению амплитуды второго пика (Рисунок 59).

3.3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК ПРИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИИ

3.3.1. Взаимодействие тучных клеток и нейронов в модели нейровоспаления

Известно, что нейротоксические воздействия как в условиях ишемии, травмы мозга, так и при нейродегенеративных заболеваниях сопровождаются воспалительными реакциями. В последнее время особое внимание уделяется роли ТК в развитии ишемии как сердца, так и мозга [Biran et al., 2008; Jin et al., 2009; Strbian et al., 2009; Lindsberg et al., 2010; Mina et al., 2013; Nelissen et al., 2013; Zheng et al., 2014]. ТК, являясь ключевым компонентом воспалительной сети, участвуют в регуляции проницаемости ГЭБ и изменяют его архитектуру [Lindsberg et al., 2010], способствуя гибели нейронов.

В лаборатории Линсберга [Lindsberg et al., 2010] показано, что гистамин и другие медиаторы, секретируемые тучными клетками при воспалении, являются нейротоксическими факторами. Результаты наших исследований подтверждают данные Линсберга с соавторами [2010].

Таким образом, процессы, развивающиеся при повреждениях мозга, характеризуются вовлечением разных типов клеток, их взаимным влиянием друг на друга, что может играть важную роль в модулировании исхода повреждения. Для оценки межклеточных взаимодействий мы использовали подход сокультивирования разных типов клеток с оценкой их функционального состояния при разных типах воздействий.

На первом этапе мы исследовали взаимодействие ТК и нейронов. Для точной характеристики объекта исследования (сокультуры тучных клеток и нейронов) использовано иммуноцитохимическое окрашивание клеточных культур специфическими маркерами. В качестве нейронального маркера использовали антитела к синаптотагмину – белку синапсов нейронов. В качестве специфического маркера ТК использованы антитела к триптазе, в качестве ядерного маркера использовали краситель Syto59. Результаты показали, что рабочая сокультура состояла в большей степени из гиппокампальных нейронов и имела небольшую примесь тучных клеток (1%).

В связи с этим, весьма актуальным является исследование влияния активированных провоспалительными факторами ТК на нейроны, а также поиск модуляторов данного взаимодействия.

Для оценки влияния ТК на выживаемость гиппокампальных нейронов использовали 30-минутную инкубацию нейронов с суспензией ТК, активированных под действием ЛПС (1 мкг/мл, 60 мин) или TNF α (50 нг/мл, 60 мин). Контролем служила группа, в которой гиппокампальные нейроны инкубировали с неактивированными ТК. Показано, что через

24 часа после 30-минутной инкубации нейронов в присутствии ЛПС или TNF α -стимулированных ТК, доля апоптотических клеток увеличивается в 2,6 и 2 раза, соответственно, по сравнению с контролем (Рисунок 60).

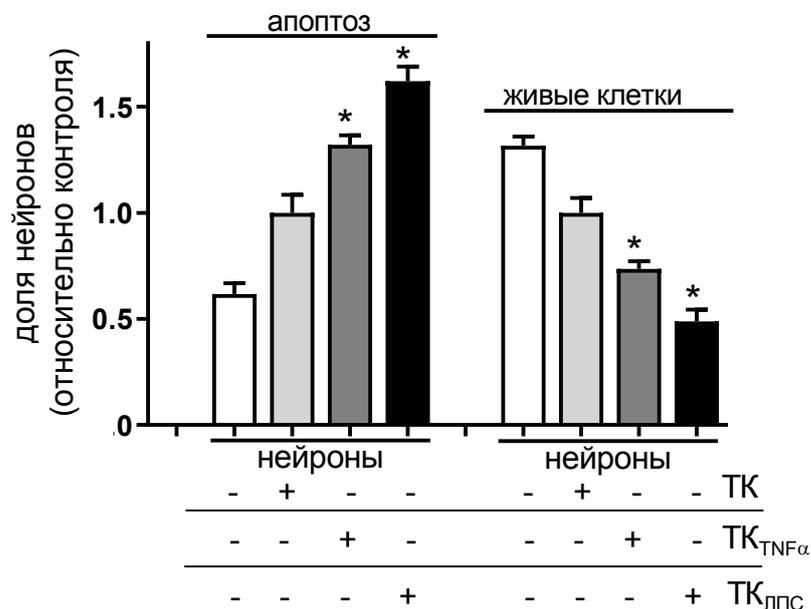


Рисунок 60. Влияние тучных клеток (ТК), активированных TNF α (50 нг/мл) (ТК_{TNF α}) и ЛПС (1 мкг/мл) (ТК_{ЛПС}), на выживаемость гиппокампальных нейронов при их совместном сокультивировании. Гибель нейронов в культуре определяли морфологическим методом через 24 часа после добавления ТК. *p<0,05 по сравнению с контролем (группой, где гиппокампальные нейроны сокультивировали с неактивированными ТК (ТК)). n = 5.

Эксперименты, проведённые в нашей лаборатории ранее [Strukova et al., 2001; Kiseleva et al., 2004; Strukova, 2006], показали, что активация ТК провоспалительными факторами может контролироваться сериновыми протеазами гемостаза, например АПС. В настоящей работе нами выдвинуто предположение о том, что стабилизация ТК с помощью АПС может привести к повышению выживаемости нейронов, сокультивируемых с ТК, активированными *in vitro*. Для проверки данного предположения в следующей серии экспериментов мы оценили влияние переживающих ТК, активированных ЛПС и предобработанных АПС (10 нМ) за 15 минут до активации, на выживаемость гиппокампальных нейронов крыс при их сокультивировании. Обнаружено, что предварительная инкубация ТК с АПС, наряду с эндотоксином, уменьшает токсичность их воздействия на нейроны, снижая долю апоптотических клеток в 2 раза по сравнению с воздействием ТК, предобработанных только ЛПС (Рисунки 61 и 62). Эти

данные свидетельствуют о том, что нейропротекторное действие АПС в условиях моделирования нейровоспаления может быть опосредованно блокадой секреторной активности ТК, стабилизацией их клеточной мембраны и снижением высвобождения таких медиаторов воспаления, как гистамин, что демонстрируют результаты, приведенные в предыдущей главе. Кроме того, наши данные согласуются с ранее полученными в нашей лаборатории результатами о нейропротекторном действии АПС на нейроны в условиях глутаматной эксайтотоксичности, а также с протекторным действием АПС на ТК [Горбачева и др., 2008; Русанова и др, 2009; Gorbacheva et al., 2010] и свидетельствуют о нейропротекторном действии протеазы также и в условиях моделирования нейровоспаления.

Далее мы сравнили влияние АПС и пептида АП9 на токсический эффект ТК, активированных ЛПС, на нейроны. Нами обнаружено, что предобработка ТК АПС (10 нМ) или АП9 (10 мкМ) за 15 минут до активации приводит к снижению уровня апоптотических нейронов в 2 и 1,8 раза, соответственно, по сравнению с группой ТК без воздействия АПС или пептида в условиях ЛПС-вызванного нейровоспаления (Рисунки 62 и 63).

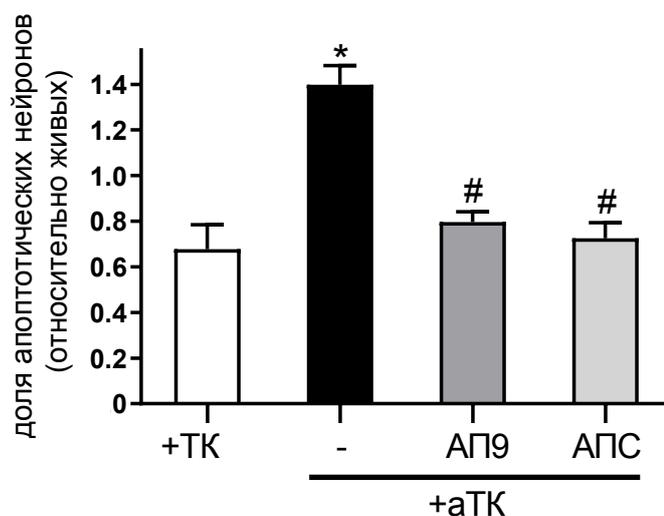


Рисунок 61. Влияние АПС (10 нМ) и пептида-агониста ПАР-1 – АП9 (10 мкМ) на выживаемость гиппокампальных нейронов в условиях токсичности, вызванной активированными ТК (аТК). Гибель нейронов в культуре определяли морфологическим методом через 24 часа после добавления ТК. * $p < 0,05$ – по сравнению с группой, где гиппокампальные нейроны сокультивировали с неактивированными ТК (+ТК); # $p < 0,05$ – по сравнению с группой, где нейроны кокультивировали с активированными ЛПС ТК (аТК). $n = 5$.

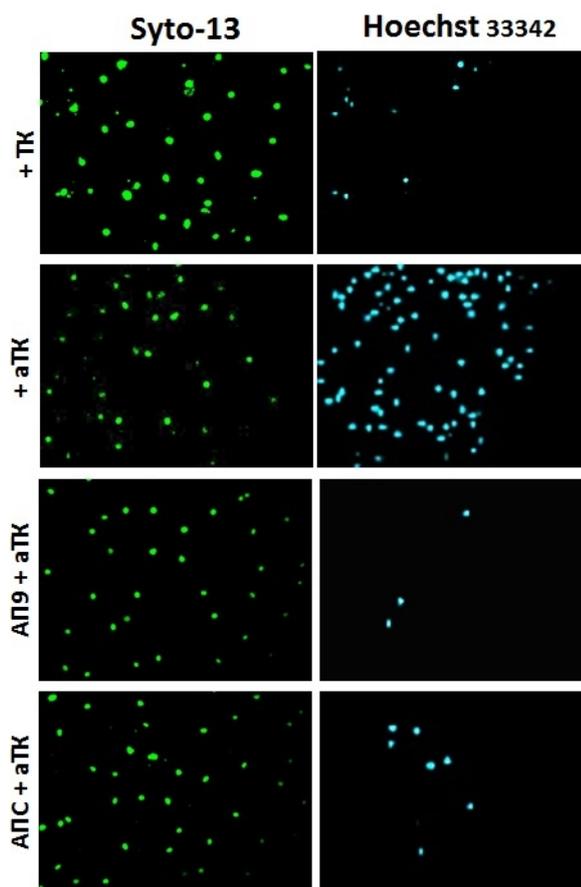


Рисунок 62. Микрофотографии нейронов, окрашенных витальным красителем Syto-13 (зелёная флуоресценция) и ДНК-тропным красителем Hoechst 33342 (апоптоз, синяя флуоресценция). Репрезентативные снимки соответствующих клеточных культур получены с помощью инвертированного микроскопа микоскоп IX71 (Olympus, Япония).

В данной работе нами использован пептид, последовательность которого соответствует 9-ти крайним аминокислотам «привязанного лиганда» ПАР-1, освобождаемого АПС. В ходе анализа действия пептида и АПС на ТК нами установлено, что их эффекты имеют однонаправленный характер, что позволяет говорить об имитации действия АПС пептидом АП9.

Для выяснения роли ПАР-1 в нейропротекторном действии АП9 мы проанализировали действие АП9 в условиях «выключения» ПАР-1. Для этого нами использованы вещества селективно блокирующие ПАР-1: селективный антагонист ПАР-1 – SCH 79797, а также специфические анти-ПАР-1 блокирующие антитела. Показано, что предварительная 30-минутная обработка клеток с SCH79797 в концентрации 50 нМ отменяла протекторное действие АП9 и АПС (Рисунок 63 и 64) и приводила к увеличению доли апоптоза в 1,4 и 2,8 раза, соответственно.

Эффект отмены защитного действия в равной степени наблюдался как при блокаде ПАР-1 ТК, так и нейронов.

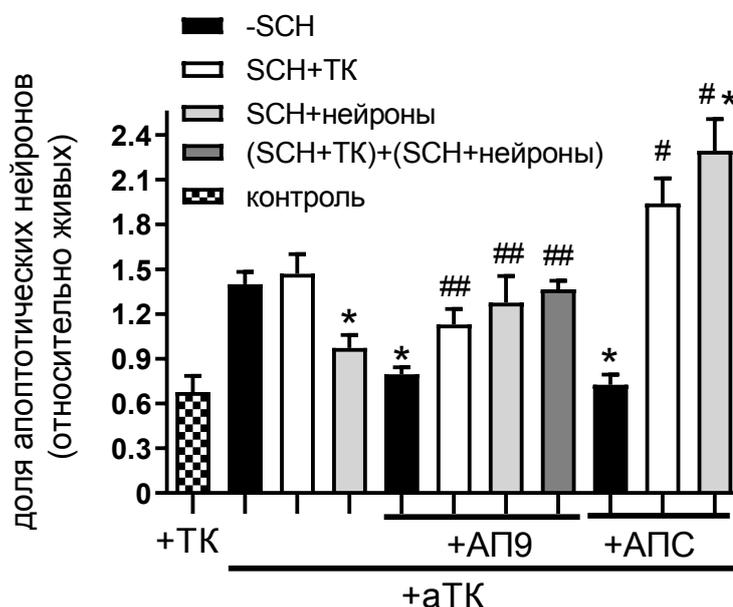


Рисунок 63. Влияние блокады ПАР-1 рецепторов ТК и нейронов на протекторное действие АПС (10 нМ) и пептида АП9 (10 мкМ). Гибель нейронов в культуре определяли морфологическим методом через 24 часа после воздействия.

* $p < 0,05$ – по сравнению с группой, где гиппокампальные нейроны сокультивировали с ЛПС-активированными ТК, не обработанными протекторами и блокатором ПАР-1; # $p < 0,05$ – по сравнению с группой, где нейроны сокультивировали с ЛПС-активированными и предобработанными АПС ТК (АПС+аТК); ## $p < 0,05$ – по сравнению с группой, где нейроны сокультивировали с ЛПС-активированными и предобработанными АП9 ТК (АП9+аТК). $n = 5$.

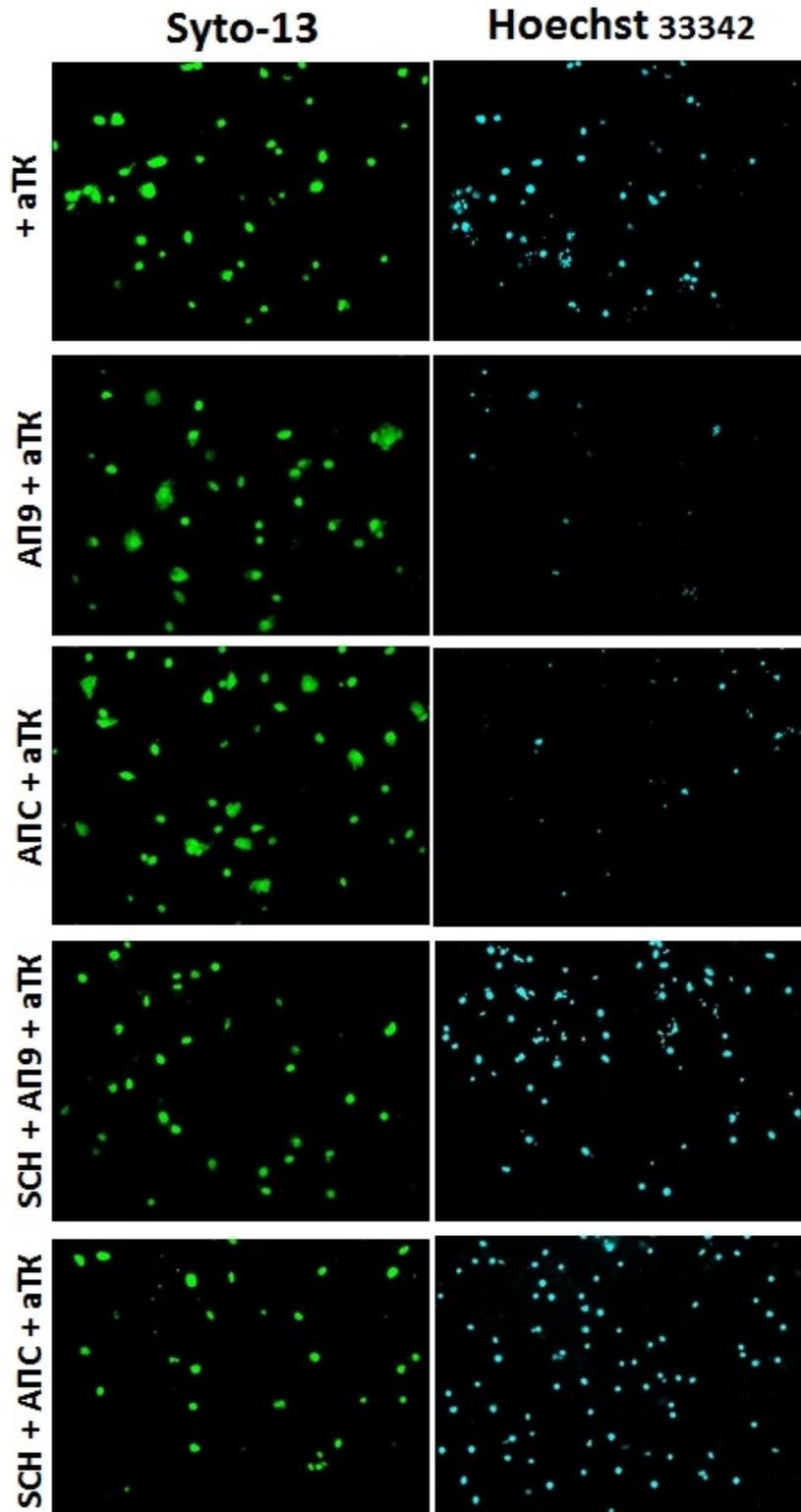


Рисунок 64. Микрофотографии нейронов, окрашенных витальным красителем Syto-13 (зелёная флуоресценция) и ДНК-тропным красителем Hoechst 33342 (апоптоз, синяя флуоресценция). Репрезентативные снимки соответствующих клеточных культур получены с помощью инвертированного микроскопа микоскоп IX71 (Olympus, Япония).

ПАР-1 зависимое действие нового неканонического пептида АП9 подтверждается экспериментами с использованием специфических анти-ПАР-1 антител. Установлено, что блокирование ПАР-1 тучных клеток, также, как и гиппокампальных нейронов, отменяет протекторное действие АП9 (Рисунок 65). При этом наблюдается возрастание числа апоптотических нейронов в 2,75 и в 2,5 раза, соответственно при блокаде рецепторов ТК и при блокировании рецепторов ПАР-1 на обоих типах клеток.

Таким образом, в настоящей работе показано нейропротекторное действие нового пептида агониста ПАР-1 (АП9), который, подобно АПС, защищает нейроны от гибели в условиях нейровоспаления. Установлено, что протекторное действие этого пептида реализуется через ПАР-1 рецепторы как ТК, так и нейронов [Babkina et al., 2016]. Полученные данные могут служить основой разработки новых препаратов противовоспалительного и нейропротекторного действия на основе пептида-агониста ПАР-1 – АП9.

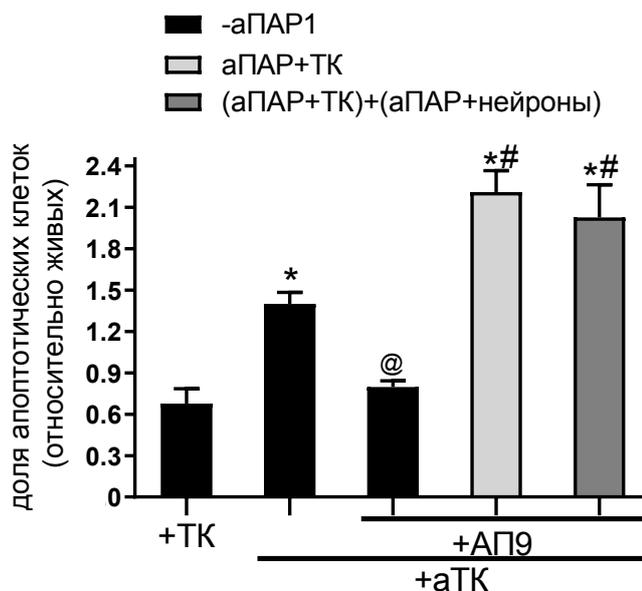


Рисунок 65. Влияние блокады ПАР-1 рецепторов ТК и нейронов с помощью специфических антител к ПАР-1 – АТАР2 на протекторное действие пептида АП9 (10 мкМ). Гибель нейронов в культуре определяли морфологическим методом через 24 часа после добавления ТК. * $p < 0,05$ по сравнению с группой, где гиппокампальные нейроны инкубировали с неактивированными ТК, не обработанными протекторами (+ТК); @ $p < 0,05$ по сравнению с группой, где гиппокампальные нейроны инкубировали с активированными ТК, не обработанными протекторами (+аТК), # $p < 0,05$ по сравнению с группой, где нейроны сокультивировали с активированными, предобработанными АП9 ТК (АП9+аТК). $n \geq 3$.

3.3.2. Взаимодействие тучных клеток и астроцитов в модели нейровоспаления

В мозге млекопитающих ТК преимущественно расположены в дуральных, периваскулярных и паренхиматозных участках, включая сосудистое сплетение, таламус, гипоталамус, обонятельную луковицу, средний мозг и кору головного мозга [Rönnberg et al., 1973; Edvinsson et al., 1977; Goldschmidt et al., 1984; Theoharides, 1990; Silver et al., 1996; Ibrahim, 2008; Dropp, 2009]. Такая локализация ТК мозга помогает им общаться с соседними нейронами, астроцитами, микроглией, внеклеточным матриксом и церебральными кровеносными сосудами [Dong et al., 2014].

Высвобождение ТК TNF α и других цитокинов может усиливать нейровоспаление и образование нейротоксического оксида азота астроцитами [Skaper et al., 2002].

В экспериментах *in vitro* показано, что совместное культивирование тучных клеток и астроцитов приводит к высвобождению нескольких медиаторов, таких как гистамин и лейкотриены, через взаимодействия CD40-CD40L [Kim et al., 2010]. Кроме того, продуцирование цитокинов и хемокинов (например, IL-6, TNF α , MCP-1 и CCL5) индуцируется посредством двунаправленной активации астроцитов и ТК [Kim et al., 2010, 2011]. Известно, что ЛПС приводит к значительному увеличению экспрессии мРНК IL-6, секреции TNF α и IL-6 в астроцитах [Tu et al., 2017; Ma et al., 2018].

В связи с этим, следующим этапом исследования было выяснение особенностей взаимодействия ТК и астроцитов при совместном культивировании. Критерием провоспалительной активации клеток служила доля высвободившегося IL-6. Установлено, что 6-часовое воздействие ЛПС (1 мкг/мл) приводит к значительному увеличению высвобождения IL-6 как изолированными астроцитами, так и клетками линии RBL-2H3. При этом важно отметить, что активация клеток эндотоксином при совместном культивировании приводит к возрастанию уровня секреции IL-6 по сравнению с группами, где активированные клетки выращивались изолированно. Предварительная обработка клеток линии RBL-2H3 синтетическим пептидом АП9 (100 μ M) существенно снижала уровень секреции IL-6 клетками при совместном культивировании астроцитов и RBL-2H3 (Рисунок 66). Полученные данные свидетельствуют об противовоспалительном действии неканонического пептида-агониста ПАР-1 (АП9) на сокультивируемые астроциты и ТК в условии токсического воздействия ЛПС.

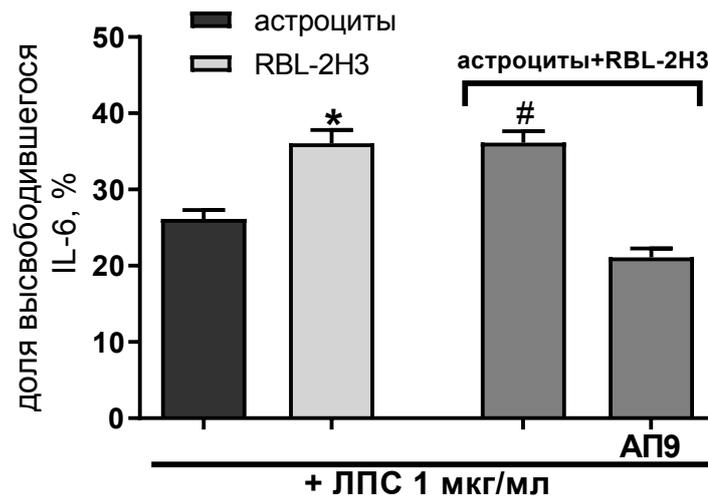


Рисунок 66. Влияние АП9 (100 мкМ) на изменение уровня высвобождения IL-6 астроцитами и клетками линии RBL-2H3 при их сокультивировании (с помощью traswells) в условии токсического действия ЛПС (1 мкг/мл). $n \geq 3$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейровоспаление, развивающееся в ЦНС при ишемическом повреждении мозга, а также при ряде нейродегенеративных заболеваниях, усугубляет течение и исход патологического процесса, потенцируя гибель клеток мозга и увеличивая размер поврежденной области. Поэтому особо значение для разработки подходов предотвращения и лечения нейродегенерации, вызванной воспалительным процессом, имеет понимание механизма его протекания и возможных путей его регулирования. В настоящей работе исследована возможность регуляции нейровоспаления через ПАР-1 зависимую стабилизацию функций тучных клеток, астроцитов и нейронов – основных участников воспаления в мозговой ткани.

Нейровоспаление определяется как воспалительный ответ центральной нервной системы на воздействия, нарушающие гомеостаз. Основными участниками воспалительного ответа в мозге являются ТК и глия.

Нами показано, что активация ТК специфическими провоспалительными агентами (TNF α , ЛПС и др.) сопровождается повышением уровня дегрануляции, что, вероятно, опосредуется через регуляцию уровня цитозольного кальция. Кроме того, отмечено, что провоспалительная активация ТК сопряжена с перестройкой актинового цитоскелета, характерного для экзоцитоза.

Используемая нами провоспалительная активация первичной культуры астроцитов также вызвала функциональные изменения. Показано, что активация клеток широко используемым индуктором воспаления – ЛПС – индуцирует пролиферацию астроцитов. Интересно, что действие АТФ на культивируемые астроциты имеет дозозависимый характер. Высокие концентрации АТФ (10мМ) оказывают токсическое действие на астроциты, вызывая их гибель. В то время как более низкие концентрации АТФ (0,1 и 1 мМ) способствовали повышению их пролиферации. Известно, что взаимодействие иммунокомпетентных клеток, например, тучных с другими типами клеток может быть опосредовано через медиаторы воспаления. Обнаружено, что ключевой медиатора ТК – гистамин – вызывает транзитное изменение внутриклеточного кальция в астроцитах, что может быть причиной наблюдаемых в них при нейровоспалении изменениях, характеризующихся как астроглиоз.

Следующий участник нейровоспаления и «мишень» иммунокомпетентных клеток мозга – нейроны. Ведущим повреждающим фактором при ишемических повреждениях, травмах, ряде нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся воспалением,

выступает эксайтотоксичность. Сопоставление повреждающих эффектов глутамата и эндотоксина на нейроны, показало, что глутамат оказывает более выраженное повреждающее действие на клетки, чем ЛПС. Вместе с тем, выраженное токсическое действие АТФ в высоких концентрация выявлено нами на первичной культуре нейронов. Интересно, что токсическое действие как глутамата, так и основного медиатора ТК гистамина, на нейронах подобно астроцитам опосредовано изменением уровня цитозольного кальция. Дизрегуляция кальциевого ответа на гиппокампальных нейронах выявлена как при действии гистамин, так при активации ионотропных рецепторов глутамата – NMDA.

Таким образом, используемые в работе стимулы обладают провоспалительным, токсическим действием на тучные клетки, астроциты и нейроны, которое опосредуется изменением кальциевого гомеостаза, и ведет к повышению секреции, гибели клеток и изменению пролиферации.

Возможность участия агонистов ПАР-1 в регуляции провоспалительной активации исследуемых клеток, обеспечивается наличием экспрессии этих рецепторов (ПАР-1), а также эндотелиального рецептора протеина С – ЭРПС. С помощью иммуноцитохимии и вестерн блота экспрессия этих рецепторов подтверждена на нейронах и астроцитах и впервые продемонстрирована нами на клетках RBL-2H3. Результаты экспериментов с использованием специфических блокаторов ПАР-1, указывают на рецептор-зависимый характер обнаруженных эффектов используемых в работе агонистов.

Анализ эффектов синтетического пептида АП9, АПС и тромбина 10 нМ, демонстрирует противовоспалительное и цитопротекторное их действие на активированные ТК. Что проявляется в снижение дегрануляции и повышении выживаемости клеток. Рост $[Ca^{2+}]_i$, индуцированный тромбином, существенно превышает увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызванное ЛПС. Кроме того, вызванное ЛПС изменение внутриклеточного кальция отменяется предварительной инкубацией клеток с тромбином (10 нМ), что может указывать на общность запускаемых ЛПС и тромбином сигнальных каскадов. В свою очередь Ca^{2+} -ответ на тромбин в высокой концентрации (50 нМ) был снижен предварительным воздействием на клетки RBL-2H3 АП9. Более того, неканоническая активация ПАР-1 АП9, АПС, а также тромбином в низких концентрациях (10 нМ) перед ЛПС и А23187 способствовала стабилизации цитоскелета клеток, а тромбин (50 нМ), напротив, потенцировал эффекты ЛПС на актин ТК, что позволяет рассматривать эту протеазу в высокой концентрации в качестве канонического агониста ПАР-1.

Подтверждение провоспалительного характера воздействия тромбина в высокой концентрации нами было получено и на астроцитах, где в отличие от тромбина в низкой

концентрации (10 нМ), протеаза повышала уровень пролиферативной активности клеток. Предварительная аппликация АПС (10 нМ), но не тромбина (10 нМ), за 15 минут до воздействия АТФ повышала выживаемость клеток в первичной культуре астроцитов. АПС и АП9 способствовали снижению секреции TNF α из активированных тромбином в высокой концентрации астроцитов. Кроме того, 10-минутная инкубация астроцитов с АП9 оказывает противовоспалительное действие, приводя к уменьшению амплитуды Ca²⁺-ответа на гистамин и смене двухфазного профиля клеточного ответа на однофазный. Итак, АПС и АП9 на астроцитах демонстрируют более стойкий и выраженный противовоспалительный эффект по сравнению с тромбином.

Антивоспалительный и цитопротекторный характер действия АП9 и АПС обнаружены и на первичной культуре гиппокампальных нейронов. Оба агониста ПАР-1 повышают выживаемость нейронов в условиях токсичности, вызванной АТФ. Протекторное действие АП9 и АПС сохраняется и в условиях эксайтотоксичности, вызванной как глутаматом, так и NMDA. АП9 снижал дизрегуляцию кальция, вызванную и NMDA, и гистамином, что свидетельствует об Ca-зависимом протекторном и антивоспалительном действии пептида.

Исследование взаимного влияния клеток-участников нейровоспаления и возможности его регуляции с помощью агонистов ПАР-1 были использованы сокультуры ТК-нейроны и ТК-астроциты.

Сокультивирование активированных ТК с нейронами приводит к гибели последних, что, вероятно, опосредуется набором факторов, высвобождаемых ТК. Интересно, что стабилизация ТК пептидом или АПС предотвращает гибель нейронов, при этом, защитное действие реализуется через ПАР-1 рецепторы как ТК, так и нейронов.

Сокультивирование ТК и астроцитов показано, что воздействие ЛПС приводит к значительному увеличению эндотоксин-вызванному высвобождению IL-6 клетками в сравнении с его изолированным действием на астроциты и RBL-3H3. Предварительная инкубация клеток линии RBL-2H3 с АП9 существенно снижала уровень секреции IL-6 клетками в сокультуре астроцитов и RBL-2H3.

Необходимо отметить, что не смотря на сопоставимость эффектов тромбина в низких концентрациях, АПС и синтетического пептида АП9 в качестве цитопротекторных препаратов в перспективе клинического применения АП9 имеет несомненно преимущество перед другими агонистами ПАР-1. Использование АП9 более перспективно, т.к. он не оказывает негативных эффектов в используемой концентрации, в то время как тромбин, что также показано в нашей лаборатории, с изменением условий

(например при высокой глюкозе) может в одной и той же концентрации демонстрировать разные эффекты, даже в концентрации 10 нм.

Данные результаты подчеркивают уникальность ПАР-опосредованного сигналинга, как эндогенного «переключателя» эффектов сериновых протеаз, в зависимости от их типа, типа клеток и их функционального состояния. Таким образом, агонисты ПАР-1 – АП9, АПС и тромбин в низких концентрациях могут стать новым инструментом для снижения гибели нейронов и облегчения последствий как нейровоспаления, так и нейродегенерации.

ВЫВОДЫ

1. Синтетический пептид АП9, АПС и тромбин (10 нМ), выступая неканоническими агонистами ПАР-1, оказывают цитопротекторное и противовоспалительное действие на тучные клетки, астроциты и нейроны крыс при их стимуляции провоспалительными факторами.

2. АП9, подобно АПС, защищает нейроны от гибели в условиях токсичности, вызванной глутаматом, через ПАР-1 опосредованный механизм.

3. Протекторное действие АП9 и АПС в модели нейровоспаления, вызванного токсическим действием активированных ТК на нейроны, реализуется через ПАР-1 как ТК, так и нейронов.

4. Неканонический пептид-агонист ПАР-1 – АП9 – снижает секрецию IL-6 тучными клетками и астроцитами при их совместном культивировании на фоне действия эндотоксина.

5. Неканоническая активация ПАР-1 новым синтетическим пептидом АП9 является фактором, защищающим все клетки мозга на фоне их провоспалительной активации, при этом определяющим событием является стабилизация тучных клеток, которые, наряду с астроглией, активно вовлекаются и потенцируют развитие воспаления в мозге. АП9, демонстрируя более стойкое противовоспалительное действие в сопоставлении с другими агонистами ПАР-1 – АПС и тромбином в низких концентрациях – может стать новым инструментом снижения гибели нейронов и патологических последствий как нейровоспаления, так и нейродегенерации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АП9 – пептид-агонист ПАР-1
- АПС – активированный протеин С
- АТФ – аденозинтрифосфат
- БГА – β -гексозаминидаза
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ММР – матриксная металлопротеиназа
- ЛПС – липополисахарид
- ПАР – рецептор, активируемый протеазой
- ПАР-1-АР – пептид-агонист ПАР-1 рецептора
- ПС – протеин С
- ТМ – тромбомодулин
- фактор Ха – фактор X активированный
- ТК – тучные клетки
- ТФ – тканевой фактор
- ЦНС – центральная нервная система
- ЭРПС – эндотелиальный рецептор протеина С
- AMPA рецептор – рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- BDNF – нейротрофический фактор мозга
- С3а – компонента С3а системы комплемента
- ССL – СС-хемокин
- СGRP – кальцитонин-ген-связанный пептид
- СОХ-2 – циклооксигеназа-2
- DAG – диацилглицерол
- eNOS – эндотелиальная NO-синтаза
- EGF – эпидермальный фактор роста

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

FcεRI – высокоаффинный рецептор IgE

GAPDH – анти-глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа антитела

GEF – факторы обмена Rho-гуаниновых нуклеотидов

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

GLT-1 – транспортер глутамата

H1R – рецептор гистамина

ICAM – молекулы межклеточной адгезии 1-го типа

IgE – иммуноглобулин E

IL-1α – интерлейкин 1α

IL-1β – интерлейкин-1β

IL-6 – интерлейкин-6

IL-8 – интерлейкин-8

IL-13 – интерлейкин-13

IL-33 – интерлейкин-33

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

INF-γ – интерферон γ

INF-β – интерферон β

IP3 – инозитол-3,4,5-трифосфат

IQGAP1 – актин-связывающий каркасный белок

MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа

MCP-1 – хемоаттрактантный белок 1 моноцитов

NF-κB – ядерный фактор каппа B

NGF – фактор роста нервов

NMDA рецептор – рецептор N-метил-D-аспартата

NO – оксид азота

P2X7 – пуринергические рецепторы

PAI – ингибитор активатора плазминогена

PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные шаблоны

PGE2 – простагландин E2

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа

PKC – протеинкиназа C

PMA – форболовый эфир

ROS – активные формы кислорода

SCF – фактор стволовых клеток

SOCs – депо-управляемые каналы

TAFI – ингибитор фибринолиза, активируемый тромбином

TLR – toll-подобные рецепторы

TNF α – фактора некроза опухоли- α

TrkB – тропомиозин рецепторная киназа B

VCAM-1 – молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горбачева Л.Р., Пинелис В.Г., Ишивата С., Струкова С.М. 2006. Модуляция тромбином и фактором Ха выживаемости гиппокампальных нейронов // Биохимия – Т. 71. – № 10. – С. 1338–1346.
2. Горбачева Л.Р., Сторожевых Т.П., Пинелис В.Г., Давыдова О.Н., Ишивата С., Струкова С.М. 2008. Активированный протеин С через рецептор PAR1 регулирует выживаемость нейронов при глутаматной эксайтотоксичности // Биохимия – Т. 73. – № 6. – С. 893–902.
3. Дугина Т.Н., Киселева Е.В., Частов И.В. 2002. Рецепторы семейства PAR — связующее звено процессов свертывания крови и воспаления // Биохимия – Т. 67. – № 1. – С. 77–87.
4. Иванова А.Е., Горбачёва Л.Р., Струкова С.М., Пинелис В.Г., Райзер Г. 2013. Участие активированного протеина С и тромбина в регуляции функций астроцитов // Биологические Мембраны – Т. 30. – № 5–6. – С. 387–397.
5. Колодзейская М.В., Соколовская Л.И. и Волков Г.Л. 2008. Роль А-цепи в функционировании активного центра α -тромбина человека // Биохимия – Т. 73. – № 3. – С. 293–302.
6. Макарова А.М., Русанова А.В., Горбачева Л.Р., Умарова Б.А., Струкова С.М. 2006. Влияние активированного протеина С на секреторную активность перитонеальных тучных клеток крысы // Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины – Т. 142. – № 10. – С. 382–385.
7. Русанова А.В., Васильева Т.В., Смирнов М.Д., Струкова С.М. 2009. Тучные клетки как мишень противовоспалительного действия активированного протеина С // Цитокины и Воспаление – Т. 8. – № 3. – С. 48–53.
8. Струкова С.М. 2004. Роль тромбоцитов и сериновых протеиназ в сопряжении свертывания крови и воспаления // Биохимия – Т. 69. – № 10. – С. 1314–1331.
9. Струкова С.М. 2013. Основы Физиологии Гемостаза. Москва: Издательство МГУ
10. Умарова Б.А., Дугина Т.Н., Шестакова Е.В., Глуза Э., Струкова С.М. 2000. Активация тучных клеток крысы при стимуляции рецептора, активируемого протеазой (PAR-1) // Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины – Т. 29. – № 4. – С. 370–373.
11. Acharjee S., Zhu Y., Maingat F., Pardo C., Ballanyi K., Hollenberg M.D., Power C. 2011. Proteinase-activated receptor-1 mediates dorsal root ganglion neuronal degeneration in HIV/AIDS // Brain – V. 134. – № 11. – P. 3209–3221.

12. Adams M.N., Ramachandran R., Yau M.K., Suen J.Y., Fairlie D.P., Hollenberg M.D., Hooper J.D. 2011. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors // *Pharmacol. Ther.* – V. 130. – № 3. – P. 248–282.
13. Aguirre A., Maturana C.J., Harcha P.A., Sáez J.C. 2013. Possible involvement of TLRs and hemichannels in stress-induced CNS dysfunction via mastocytes, and glia activation // *Mediators Inflamm.* – 2013.
14. Akiyama H., Ikeda K., Kondo H., McGeer P.L. 1992. Thrombin accumulation in brains of patients with Alzheimer's disease // *Neurosci. Lett.* – V. 146. – № 2. – P. 152–154.
15. Almonte A.G., Qadri L.H., Sultan F.A., Watson J.A., Mount D.J., Rumbaugh G., Sweatt J.D. 2013. Protease-activated receptor-1 modulates hippocampal memory formation and synaptic plasticity // *J. Neurochem.* – V. 124. – № 1. – P. 109–212.
16. Angiolillo D.J., Capodanno D., Goto S. 2010. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis // *Eur. Heart J.* – V. 31. – № 1. – P. 17–28.
17. Arai T., Miklossy J., Klegeris A., Quo J.P., McGeer P.L. 2006. Thrombin and prothrombin are expressed by neurons and glial cells and accumulate in neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – V. 65. – № 1. – P. 19–25.
18. Arbeloa J., Pérez-Samartín A., Gottlieb M., Matute C. 2012. P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia // *Neurobiol. Dis.* – V. 45. – № 3. – P. 954–961.
19. Babkina I.I., Strukova S.M., Pinelis V.G., Reiser G., Gorbacheva L.R. 2016. New synthetic peptide protects neurons from death induced by toxic influence of activated mast cells via protease-activated receptor // *Biochemistry, Supplemental Series A.* – V. 10(2). – P. 126-134.
20. Bae J.S., Rezaie A.R. 2008. Protease activated receptor 1 (PAR-1) activation by thrombin is protective in human pulmonary artery endothelial cells if endothelial protein C receptor is occupied by its natural ligand // *Thromb. Haemost.* – V. 100. – № 1. – P. 101–109.
21. Bae J.S., Rezaie A.R. 2009. Thrombin inhibits nuclear factor κ B and RhoA pathways in cytokine stimulated vascular endothelial cells when EPCR is occupied by protein C // *Thromb. Haemost.* – V. 101. – № 3. – P. 513–520.
22. Bae J.S., Yang L., Manithody C., Rezaie A.R. 2007. The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells // *Blood* – V. 110. – № 12. – P. 3909–3916.
23. Bakunina N., Pariante C.M., Zunszain P.A. 2015. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression // *Immunology* – V. 144. – № 3. – P. 365-373.

24. Balazs A.B., Fabian A.J., Esmon C.T., Mulligan R.C. 2006. Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow // *Blood* – V. 107. – № 6. – P. 2317–2321.
25. Bano D., Nicotera P. 2007. Ca^{2+} signals and neuronal death in brain ischemia // *Stroke* – V. 38. – № 2. – P. 674–676.
26. Bañuelos-Cabrera I., Valle-Dorado M.G., Aldana B.I., Orozco-Suárez S.A., Rocha L. 2014. Role of histaminergic system in blood-brain barrier dysfunction associated with neurological disorders // *Arch. Med. Res.* – V. 45. – № 8. – P. 677–686.
27. Beaven M.A. 2009. Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now // *Eur. J. Immunol.* – V. 39. – № 1. – P. 11–25.
28. Bekkers J.M. 1993. Enhancement by histamine of NMDA-mediated synaptic transmission in the hippocampus // *Science.* – V. 261. – № 5117. – P. 104–106.
29. Bell A., Althaus M., Diener M. 2015. Communication between mast cells and rat submucosal neurons // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* – V. 467. – № 8. – P. 1809–1823.
30. Benveniste E.N., Sparacio S.M., Gavin Norris J., Grennett H.E., Fuller G.M. 1990. Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes // *J. Neuroimmunol.* – V. 30. – № 2–3. – P. 201–212.
31. Berliocchi L., Bano D., Nicotera P. 2005. Ca^{2+} signals and death programmes in neurons // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* – V. 360. – № 1464. – P. 2255–2258.
32. Biran V., Cochois V., Karroubi A., Arrang J.M., Charriaut-Marlangue C., Héron A. 2008. Stroke induces histamine accumulation and mast cell degranulation in the neonatal rat brain // *Brain Pathol.* – V. 18. – № 1. – P. 1–9.
33. Blank U., Rivera J. 2004. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis // *Trends Immunol.* – V. 25. – № 5. – P. 266–273.
34. Bock P.E., Panizzi P., Verhamme M.A. 2007. Exosites in the substrate specificity of blood coagulation reactions // *J. Thromb. Haemost.* – V. 5. – № 1. – P. 81–94.
35. Borsini A., Zunszain P.A., Thuret S., Pariante C.M. 2015. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis // *Trends Neurosci.* – V. 38. – № 3. – P. 145–157.
36. Bouwens E.A.M., Stavenuiter F., Mosnier L.O. 2013. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway // *J. Thromb. Haemost.* – V. 11. – P. 242–253.
37. Boven L.A., Vergnolle N., Henry S.D., Silva C., Imai Y., Holden J., Warren K., Hollenberg M.D., Power C. 2003. Up-regulation of proteinase-activated receptor 1 expression in astrocytes during HIV encephalitis // *J. Immunol.* – V. 170. – № 5. – P. 2638–2646.
38. Brailoiu E., Shipy M.M., Yan G., Abood M.E., Brailoiu G.C. 2017. Mechanisms of modulation of brain microvascular endothelial cells function by thrombin // *Brain Res.* –

V. 1657. – P. 167–175.

39. Brown M.A., Hatfield J.K. 2012. Mast cells are important modifiers of autoimmune disease: With so much evidence, why is there still controversy? // *Front. Immunol.* – V. 3. – P. 147.

40. Brzezińska-Baszczyk E., Pietrzak A., Wierzbicki M., Wiktorska M. 2011. Surface TLR2 and TLR4 expression on mature rat mast cells can be affected by some bacterial components and proinflammatory cytokines // *Mediators Inflamm.* – V. 2011. – P. 11.

41. Bulanova E., Bulfone-Paus S. 2010. P2 receptor-mediated signaling in mast cell biology // *Purinergic Signal.* – V. 6. – № 1. – P. 3–17.

42. Burda J.E., Bernstein A.M., Sofroniew M. V. 2016. Astrocyte roles in traumatic brain injury // *Exp. Neurol.* – V. 275. – P. 305–315.

43. Burda J.E., Radulovic M., Yoon H., Scarisbrick I.A. 2013. Critical role for PAR1 in kallikrein 6-mediated oligodendroglial pathology // *Glia* – V. 61. – № 9. – P. 1456–1470.

44. Burnstock G. 1996. Purinoceptors: Ontogeny and phylogeny // *Drug Dev. Res.* – V. 39. – № 3–4. – P. 204–242.

45. Burnstock G. 2004. Cotransmission // *Curr. Opin. Pharmacol.* – V. 4. – № 1. – P. 47–52.

46. Burnstock G. 2016. P2X ion channel receptors and inflammation // *Purinergic Signal.* – V. 12. – № 1. – P. 59–67.

47. Camerer E., Huang W., Coughlin S.R. 2000. Tissue factor-, factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – V. 97. – № 10. – P. 5255–5260.

48. Cannon J.R., Keep R.F., Hua Y., Richardson R.J., Schallert T., Xi G. 2005. Thrombin preconditioning provides protection in a 6-hydroxydopamine Parkinson's disease model // *Neurosci. Lett.* – V. 373. – № 3. – P. 189–194.

49. Cannon J.R., Keep R.F., Schallert T., Hua Y., Richardson R.J., Xi G. 2006. Protease-activated receptor-1 mediates protection elicited by thrombin preconditioning in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease // *Brain Res.* – V. 1116. – № 1. – P. 177–186.

50. Carrasquero L.M.G., Delicado E.G., Bustillo D., Gutiérrez-Martín Y., Artalejo A.R., Miras-Portugal M.T. 2009. P2X7 and P2Y13 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes // *J. Neurochem.* – V. 110. – № 3. – P. 879–889.

51. Di Cera E., Page M.J., Bah A., Bush-Pelc L.A., Garvey L.C. 2007. Thrombin allostery // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – V. 9. – № 11. – P. 1292–1306.

52. Chapman J. 2013. Coagulation in inflammatory diseases of the central nervous system // *Semin. Thromb. Hemost.* – V. 39. – № 8. – P. 876–880.

53. Chelini G., Pantazopoulos H., Durning P., Berretta S. 2018. The tetrapartite synapse: a

key concept in the pathophysiology of schizophrenia // *Eur. Psychiatry* – V. 50. – P. 60–69.

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

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

56. Cheng T., Liu D., Griffin J.H., Fernández J.A., Castellino F., Rosen E.D., Fukudome K., Zlokovic B.V. 2003. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective // *Nat. Med.* – V. 9. – № 3. – P. 338–342.

57. Cheng T., Petraglia A.L., Li Z., Thiyagarajan M., Zhong Z., Wu Z., Liu D., Maggirwar S.B., Deane R., Fernández J.A., LaRue B., Griffin J.H., Chopp M., Zlokovic B.V. 2006. Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage // *Nat. Med.* – V. 12. – № 11. – P. 1278–1285.

58. Chiang C.Y., Veckman V., Limmer K., David M. 2012. Phospholipase C γ -2 and intracellular calcium are required for lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and interferon regulatory factor 3 (IRF3) activation // *J. Biol. Chem.* – V. 287. – № 6. – P. 3704–3709.

59. Choi H.B., Gordon G.R.J., Zhou N., Tai C., Rungta R.L., Martinez J., Milner T.A., Ryu J.K., McLarnon J.G., Tresguerres M., Levin L.R., Buck J., MacVicar B.A. 2012. Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase // *Neuron* – V. 75. – № 6. – P. 1094–1104.

60. Choi S., Kim S.U., Jin B.K. 2005. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons // *Digestion* – V. 25. – № 16. – P. 4082–4090.

61. Choi S.H., Lee D.Y., Ryu J.K., Kim J., Joe E.H., Jin B.K. 2003. Thrombin induces nigral dopaminergic neurodegeneration *in vivo* by altering expression of death-related proteins // *Neurobiol. Dis.* – V. 14. – № 2. – P. 181–193.

62. Cirino G., Napoli C., Bucci M., Cicala C. 2000. Inflammation-coagulation network: Are serine protease receptors the knot? // *Trends Pharmacol. Sci.* – V. 21. – № 5. – P. 170–172.

63. Citron B.A., Smirnova I. V., Arnold P.M., Festoff B.W. 2000. Upregulation of neurotoxic serine proteases, prothrombin, and protease-activated receptor 1 early after spinal cord injury // *J. Neurotrauma* – V. 17. – № 12. – P. 1191–1203.

64. Corrigan F., Mander K.A., Leonard A. V., Vink R. 2016. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation // *J. Neuroinflammation* – V. 13. – № 1. – P. 264.

65. Coughlin S.R. 1999. How the protease thrombin talks to cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* –

V. 96. – № 20. – P. 11023–11027.

66. Coughlin S.R. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors // *Nature* – V. 407. – № 6801. – P. 258–264.

67. Coughlin S.R. 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology // *J. Thromb. Haemost.* – V. 3. – № 8. – P. 1800–1814.

68. Cunningham D.D. 1997. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities // *J. Neurosci.* – V. 17. – № 14. – P. 5316–5326.

69. Dahlbäck B. 1995. The protein C anticoagulant system: Inherited defects as basis for venous thrombosis // *Thromb. Res.* – V. 77. – № 1. – P. 1–43.

70. Dahlbäck B., Villoutreix B.O. 2005. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: Novel insights into structure-function relationships and molecular recognition // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – V. 25. – № 7. – P. 1311–1320.

71. Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J. V., Zuo Y., Jung S., Littman D.R., Dustin M.L., Gan W.B. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo* // *Nat. Neurosci.* – V. 8. – № 6. – P. 752–58.

72. Deane R., LaRue B., Sagare A.P., Castellino F.J., Zhong Z., Zlokovic B. V. 2009. Endothelial protein C receptor-assisted transport of activated protein C across the mouse blood-brain barrier // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – V. 29. – № 1. – P. 25–33.

73. Delekate A., Füchtmeier M., Schumacher T., Ulbrich C., Foddiss M., Petzold G.C. 2014. Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity *in vivo* in an Alzheimer's disease mouse model // *Nat. Commun.* – V. 5. – P. 5422.

74. Deng Z., Zink T., Chen H.Y., Walters D., Liu F.T., Liu G.Y. 2009. Impact of actin rearrangement and degranulation on the membrane structure of primary mast cells: A combined atomic force and laser scanning confocal microscopy investigation // *Biophys. J.* – V. 96. – № 4. – P. 1629–39.

75. Díaz-Hernandez M., del Puerto A., Díaz-Hernandez J.I., Diez-Zaera M., Lucas J.J., Garrido J.J., Miras-Portugal M.T. 2008. Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons // *J. Cell Sci.* – V. 121. – № 22. – P. 3717–28.

76. DiSabato D.J., Quan N., Godbout J.P. 2016. Neuroinflammation: the devil is in the details // *J. Neurochem.* – V. 139. – P. 136–53.

77. Dong H., Wang Y., Zhang Xiaojun, Zhang Xiang, Qian Y., Ding H., Zhang S. 2019. Stabilization of brain mast cells alleviates LPS-induced neuroinflammation by inhibiting microglia activation and migration // *Front. Cell. Neurosci.* – V. 13. – P. 191.

78. Dong H., Zhang W., Zeng X., Hu G., Zhang H., He S., Zhang S. 2014. Histamine induces upregulated expression of histamine receptors and increases release of inflammatory mediators from microglia // *Mol. Neurobiol.* – V. 49. – № 3. – P. 1487–1500.
79. Dong H., Zhang X., Qian Y. 2014. Mast cells and neuroinflammation // *Med. Sci. Monit. Basic Res.* – V. 20. – P. 200–206.
80. Dráber P., Sulimenko V., Dráberová E. 2012. Cytoskeleton in mast cell signaling // *Front. Immunol.* – V. 3. – P. 130.
81. Dropp J.J. 2009. Mast cells in mammalian brain // *Cells Tissues Organs* – V. 94. – № 1. – P. 1–21.
82. Duan S., Anderson C.M., Keung E.C., Chen Yongmei, Chen Yiren, Swanson R.A. 2003. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes // *J. Neurosci.* – V. 23. – № 4. – P. 1320–28.
83. Dugina T.N., Kiseleva E. V., Glusa E., Strukova S.M. 2003. Activation of mast cells induced by agonists of proteinase-activated receptors under normal conditions and during acute inflammation in rats // *Eur. J. Pharmacol.* – V. 471. – № 2. – P. 141–47.
84. Eccleston E., Leonard B.J., Lowe J.S., Welford H.J. 1973. Basophilic leukaemia in the albino rat and a demonstration of the basopoietin // *Nat. New Biol.* – V. 244. – № 133. – P. 73-76.
85. Edvinsson L., Cervós-Navarro J., Larsson L.I., Owman C.H., Rönnberg A.L. 1977. Regional distribution of mast cells containing histamine, dopamine, or 5-hydroxytryptamine in the mammalian brain // *Neurology* – V. 27. – № 9. – P. 878–83.
86. Enoksson M., Ejendal K.F.K., McAlpine S., Nilsson G., Lunderius-Andersson C. 2011. Human cord blood-derived mast cells are activated by the Nod1 agonist M-TriDAP to release pro-inflammatory cytokines and chemokines // *J. Innate Immun.* – V. 3. – № 2. – P. 142–49.
87. Esmon C.T. 2004. The impact of the inflammatory response on coagulation // *Thromb. Res.* – V. 114. – № 5–6. – P. 321–27.
88. Esmon C.T. 2005. Is APC activation of endothelial cell PAR1 important in severe sepsis?: No // *J. Thromb. Haemost.* – V. 3. – № 9. – P. 1910–11.
89. Fan Y., Zhang W., Mulholland M. 2005. Thrombin and PAR-1-AP increase proinflammatory cytokine expression in C6 cells // *J. Surg. Res.* – V. 129. – № 2. – P. 196–201.
90. Fang Q., Hu W.W., Wang X.F., Yang Y., Lou G.D., Jin M.M., Yan H.J., Zeng W.Z., Shen Y., Zhang S.H., Xu T. Le, Chen Z. 2014. Histamine up-regulates astrocytic glutamate transporter 1 and protects neurons against ischemic injury // *Neuropharmacology* – V. 77. – P. 156–66.
91. Feistritzer C., Riewald M. 2005. Endothelial barrier protection by activated protein C

- through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation // *Blood* – V. 105. – № 8. – P. 3178–84.
92. Fenton II J. 1995. Thrombin functions and antithrombotic intervention // *Thromb. Haemost.* – V. 73. – № 1. – P. 493–98.
93. Ferrari D., Pizzirani C., Adinolfi E., Lemoli R.M., Curti A., Idzko M., Panther E., Di Virgilio F. 2007. The P2X 7 receptor: a key player in IL-1 processing and release // *J. Immunol.* – V. 176. – № 7. – P. 3877–83.
94. Festoff B.W., D'Andrea M.R., Citron B.A., Salcedo R.M., Smirnova I. V., Andrade-Gordon P. 2000. Motor neuron cell death in wobbler mutant mice follows overexpression of the G-protein-coupled, protease-activated receptor for thrombin. // *Mol. Med.* – V. 6. – № 5. – P. 410–29.
95. Fields R.D., Stevens B. 2000. ATP: An extracellular signaling molecule between neurons and glia // *Trends Neurosci.* – V. 23. – № 12. – P. 625–33.
96. Finigan J.H., Dudek S.M., Singleton P.A., Chiang E.T., Jacobson J.E., Camp S.M., Ye S.Q., Garcia J.G.N. 2005. Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: Role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation // *J. Biol. Chem.* – V. 280. – № 17. – P. 17286–93.
97. Flores J.A., Ramírez-Ponce M.P., Montes M.Á., Balseiro-Gómez S., Acosta J., Álvarez De Toledo G., Alés E. 2019. Proteoglycans involved in bidirectional communication between mast cells and hippocampal neurons // *J. Neuroinflammation* – V. 16. – № 1. – P. 1–13.
98. Fogal B., Hewett S.J. 2008. Interleukin-1 β : A bridge between inflammation and excitotoxicity? // *J. Neurochem.* – V. 106. – № 1. – P. 1–23.
99. Franceschini A., Capece M., Chiozzi P., Falzoni S., Sanz J.M., Sarti A.C., Bonora M., Pinton P., Di Virgilio F. 2015. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein // *FASEB J.* – V. 29. – № 6. – P. 2450–61.
100. Franke H., Grummich B., Härtig W., Grosche J., Regenthal R., Edwards R.H., Illes P., Krügel U. 2006. Changes in purinergic signaling after cerebral injury – Involvement of glutamatergic mechanisms? // *Int. J. Dev. Neurosci.* – V. 24. – № 2–3. – P. 123–32.
101. Franke H., Krügel U., Schmidt R., Grosche J., Reichenbach A., Illes P. 2001. P2 receptor-types involved in astrogliosis *in vivo* // *Br. J. Pharmacol.* – V. 134. – № 6. – P. 1180–89.
102. Frenguelli B.G., Wigmore G., Llaudet E., Dale N. 2007. Temporal and mechanistic dissociation of ATP and adenosine release during ischaemia in the mammalian hippocampus // *J. Neurochem.* – V. 101. – № 5. – P. 1400–1413.
103. Friedmann I., Hauben E., Yoles E., Kardash L., Schwartz M. 2001. T cell-mediated neuroprotection involves antithrombin activity // *J. Neuroimmunol.* – V. 121. – № 1–2. –

P. 12-21.

104. Frigeri L., Apgar J.R. 1999. The role of actin microfilaments in the down-regulation of the degranulation response in RBL-2H3 mast cells // *J. Immunol.* – V. 162. – № 4. – P. 2243–50.

105. Fukudome K., Esmon C.T. 1994. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor // *J. Biol. Chem.* – V. 269. – № 42. – P. 26486–91.

106. Gadani S.P., Walsh J.T., Smirnov I., Zheng J., Kipnis J. 2015. The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury // *Neuron* – V. 85. – № 4. – P. 703–9.

107. Gale A.J., Tsavaler A., Griffin J.H. 2002. Molecular characterization of an extended binding site for coagulation factor Va in the positive exosite of activated protein C // *J. Biol. Chem.* – V. 277. – № 32. – P. 28836–40.

108. Galli S.J., Kalesnikoff J., Grimbaldston M.A., Piliponsky A.M., Williams C.M.M., Tsai M. 2005. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances // *Annu. Rev. Immunol.* – V. 23. – № 1. – P. 749–86.

109. García P.S., Ciavatta V.T., Fidler J.A., Woodbury A., Levy J.H., Tyor W.R. 2015. Concentration-dependent dual role of thrombin in protection of cultured rat cortical neurons // *Neurochem. Res.* – V. 40. – № 11. – P. 2220–29.

110. Gera O., Shavit-Stein E., Bushi D., Harnof S., Shimon M. Ben, Weiss R., Golderman V., Dori A., Maggio N., Finegold K., Chapman J. 2016. Thrombin and protein C pathway in peripheral nerve Schwann cells // *Neuroscience* – V. 339. – P. 587–98.

111. Gilfillan A.M., Austin S.J., Metcalfe D.D. 2011. Mast cell biology: Introduction and overview // *Adv. Exp. Med. Biol.* – V. 716. – P. 2–12.

112. Gingrich M.B., Junge C.E., Lyuboslavsky P., Traynelis S.F. 2000. Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin // *J. Neurosci.* – V. 20. – № 12. – P. 4582–95.

113. Goldschmidt R.C., Hough L.B., Glick S.D. 1985. Rat brain mast cells: contribution to brain histamine levels // *J. Neurochem.* – V. 44. – № 6. – P. 1943–47.

114. Goldschmidt R.C., Hough L.B., Glick S.D., Padawer J. 1984. Mast cells in rat thalamus: Nuclear localization, sex difference and left-right asymmetry // *Brain Res.* – V. 323. – № 2. – P. 209–217.

115. Gorbacheva L., Davidova O., Sokolova E., Ishiwata S., Pinelis V., Strukova S., Reiser G. 2009. Endothelial protein C receptor is expressed in rat cortical and hippocampal neurons and is necessary for protective effect of activated protein C at glutamate excitotoxicity // *J. Neurochem.* – V. 111. – № 4. – P. 967–75.

116. Gorbacheva L., Pinelis V., Ishiwata S., Strukova S., Reiser G. 2010. Activated protein C

prevents glutamate- and thrombin-induced activation of nuclear factor- κ B in cultured hippocampal neurons // *Neuroscience* – V. 165. – № 4. – P. 1138–46.

117. Gorbacheva L.R., Storozhevykh T.P., Pinelis V.G., Davydova O.N., Ishiwata S., Strukova S.M. 2008. Activated protein C via PAR1 receptor regulates survival of neurons under conditions of glutamate excitotoxicity // *Biochem.* – V. 73. – № 6. – P. 717–24.

118. Gorbacheva L.R., Storozhevykh T.P., Pinelis V.G., Ishiwata S., Strukova S.M. 2006. Modulation of hippocampal neuron survival by thrombin and factor Xa // *Biochemistry (Mosc.)*. – V. 71. – P. 1082–1089.

119. Grammas P. 2011. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease // *J. Neuroinflammation* – V. 8. – № 1. – P. 26.

120. Grammas P., Martinez J.M. 2014. Targeting thrombin: An inflammatory neurotoxin in alzheimer's disease // *J. Alzheimer's Dis.* – V. 42. – № 4. – P. 537–44.

121. Grammas P., Ottman T., Reimann-Philipp U., Larabee J., Weigel P.H. 2004. Injured brain endothelial cells release neurotoxic thrombin // *J. Alzheimer's Dis.* – V. 6. – № 3. – P. 275–81.

122. Griffin J.H., Fernández J.A., Mosnier L.O., Liu D., Cheng T., Guo H., Zlokovic B. V. 2006. The promise of protein C // *Blood Cells, Mol. Dis.* – V. 36. – № 2. – P. 211–16.

123. Griffin J.H., Mosnier L.O., Zlokovic B. V. 2012. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways // *Int. J. Hematol.* – V. 95. – № 4. – P. 333–45.

124. Griffin J.H., Zlokovic B. V., Mosnier L.O. 2018. Activated protein C, protease activated receptor 1, and neuroprotection // *Blood* – V. 132. – № 2. – P. 159–69.

125. Griffin J.H., Zlokovic B.V., Mosnier L.O. 2015. Activated protein C: biased for translation // *Blood* – V. 125. – № 19. – P. 2898–2907.

126. Grigoriadis N., Grigoriadis S., Polyzoidou E., Milonas I., Karussis D. 2006. Neuroinflammation in multiple sclerosis: Evidence for autoimmune dysregulation, not simple autoimmune reaction // *Clin. Neurol. Neurosurg.* – V. 108. – № 3. – P. 241–44.

127. Grimsey N.J., Aguilar B., Smith T.H., Le P., Soohoo A.L., Puthenveedu M.A., Nizet V., Trejo J.A. 2015. Ubiquitin plays an atypical role in GPCR-induced p38 MAP kinase activation on endosomes // *J. Cell Biol.* – V. 210. – № 7. – P. 1117–31.

128. Grimsey N.J., Trejo J.A. 2016. Integration of endothelial protease-activated receptor-1 inflammatory signaling by ubiquitin // *Curr. Opin. Hematol.* – V. 23. – № 3. – P. 274–79.

129. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* – V. 260. – № 6. – P. 3440–50.

130. Guo H., Liu D., Gelbard H., Cheng T., Insalaco R., Fernández J.A., Griffin J.H., Zlokovic

B. V. 2004. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3 // *Neuron* – V. 41. – № 4. – P. 563–72.

131. Guo H., Singh I., Wang Y., Deane R., Barrett T., Fernández J.A., Chow N., Griffin J.H., Zlokovic B. V. 2009. Neuroprotective activities of activated protein C mutant with reduced anticoagulant activity // *Eur. J. Neurosci.* – V. 29. – № 6. – P. 1119–30.

132. Guo H., Wang Y., Singh I., Liu D., Fernández J.A., Griffin J.H., Chow N., Zlokovic B. V. 2009. Species-dependent neuroprotection by activated protein C mutants with reduced anticoagulant activity // *J. Neurochem.* – V. 109. – № 1. – P. 116–24.

133. Guo H., Zhao Z., Yang Q., Wang M., Bell R.D., Wang S., Chow N., Davis T.P., Griffin J.H., Goldman S.A., Zlokovic B. V. 2013. An activated protein C analog stimulates neuronal production by human neural progenitor cells via a PAR1-PAR3-S1PR1-Akt pathway // *J. Neurosci.* – V. 33. – № 14. – P. 6181–90.

134. Hagiwara M., Furuno T., Hosokawa Y., Iino T., Ito T., Inoue T., Nakanishi M., Murakami Y., Ito A. 2011. Enhanced nerve–mast cell interaction by a neuronal short isoform of cell adhesion molecule-1 // *J. Immunol.* – V. 186. – № 10. – P. 5983–92.

135. Hallgren J., Gurish M.F. 2007. Pathways of murine mast cell development and trafficking: Tracking the roots and routes of the mast cell // *Immunol. Rev.* – V. 217. – № 1. – P. 8–18.

136. Hammes S.R., Shapiro M.J., Coughlin S.R. 1999. Shutoff and agonist-triggered internalization of protease-activated receptor 1 can be separated by mutation of putative phosphorylation sites in the cytoplasmic tail // *Biochemistry* – V. 38. – № 29. – P. 9308–16.

137. Hendriksen E., van Bergeijk D., Oosting R.S., Redegeld F.A. 2017. Mast cells in neuroinflammation and brain disorders // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – V. 79. – P. 119–33.

138. Hendrix S., Kramer P., Pehl D., Warnke K., Boato F., Nelissen S., Lemmens E., Pejler G., Metz M., Siebenhaar F., Maurer M. 2013. Mast cells protect from post-traumatic brain inflammation by the mast cell-specific chymase mouse mast cell protease-4 // *FASEB J.* – V. 27. – № 3. – P. 920–29.

139. Hendrix S., Warnke K., Siebenhaar F., Peters E.M.J., Nitsch R., Maurer M. 2006. The majority of brain mast cells in B10.PL mice is present in the hippocampal formation // *Neurosci. Lett.* – V. 392. – № 3. – P. 174–77.

140. Hernández M., Bayón Y., Sánchez Crespo M., Nieto M.L. 1997. Thrombin produces phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 by a mitogen-activated protein kinase kinase-independent mechanism in the human astrocytoma cell line 1321N1 // *Biochem. J.* – V. 328. – № 1. – P. 263–69.

141. Ho G.J., Smirnova I. V., Akaaboune M., Hantaï D., Festoff B.W. 1994. Serine proteases

and their serpin inhibitors in Alzheimer's disease // *Biomed. Pharmacother.* – V. 48. – № 7. – P. 296–304.

142. Hollenberg M.D., Houle S. 2005. Proteinases as hormone-like signal messengers. // *Swiss Med. Wkly.* – V. 135. – № 29–30. – P. 425–32.

143. Holm Nielsen E., Braun K., Johansen T. 1989. Reorganization of the subplasmalemmal cytoskeleton in association with exocytosis in rat mast cells // *Histol. Histopathol.* – V. 4. – № 4. – P. 473–77.

144. Hösl L., Hösl E., Schneider U., Wiget W. 1984. Evidence for the existence of histamine H1- and H2-receptors on astrocytes of cultured rat central nervous system // *Neurosci. Lett.* – V. 48. – № 3. – P. 287–91.

145. Howard B.M., Cohen M.J. 2016. Activated Protein C // *Trauma Induc. Coagulopathy* – V. 5. – P. 91–114.

146. Hoxie J.A., Ahuja M., Belmonte E., Pizarro S., Parton R., Brass L.F. 1993. Internalization and recycling of activated thrombin receptors // *J. Biol. Chem.* – V. 268. – № 18. – P. 13756–63.

147. Hua Y., Keep R.F., Hoff J.T., Xi G. 2007. Brain injury after intracerebral hemorrhage: The role of thrombin and iron // *Stroke* – V. 38. – № 2 PART 2. – P. 759–62.

148. Huang J., Zhang T., Han S., Cao J., Chen Q., Wang S. 2014. The inhibitory effect of piperine from *Fructus piperis* extract on the degranulation of RBL-2H3 cells // *Fitoterapia* – V. 99. – № 1. – P. 218–26.

149. Huntington J.A. 2005. Molecular recognition mechanisms of thrombin // *J. Thromb. Haemost.* – V. 3. – № 8. – P. 1861–72.

150. Ibrahim M.Z.M. 2008. The mast cells of the mammalian central nervous system // *Cells Tissues Organs* – V. 124. – № 3–4. – P. 149–58.

151. Iikura M., Suto H., Kajiwara N., Oboki K., Ohno T., Okayama Y., Saito H., Galli S.J., Nakae S. 2007. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells // *Lab. Investig.* – V. 87. – № 10. – P. 971–78.

152. Ishida Y., Nagai A., Kobayashi S., Kim S.U. 2006. Upregulation of protease-activated receptor-1 in astrocytes in Parkinson disease: Astrocyte-mediated neuroprotection through increased levels of glutathione peroxidase // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – V. 65. – № 1. – P. 66–77.

153. Ivanova A.E., Gorbacheva L.R., Strukova S.M., Pinelis V.G., Reiser G. 2014. Activated protein C and thrombin participate in the regulation of astrocyte functions // *Biochem.* – V. 8. – P. 50–59.

154. Jackson M.T., Smith M.M., Smith S.M., Jackson C.J., Xue M., Little C.B. 2009.

Activation of cartilage matrix metalloproteinases by activated protein C // *Arthritis Rheum.* – V. 60. – № 3. – P. 780–91.

155. Jiang Y., Wu J., Hua Y., Keep R.F., Xiang J., Hoff J.T., Xi G. 2002. Thrombin-receptor activation and thrombin-induced brain tolerance // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – V. 22. – № 4. – P. 404–10.

156. Jin Y., Silverman A.J., Vannucci S.J. 2009. Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain. // *Stroke.* – V. 40. – № 9. – P. 3107–12.

157. Johnson D., Krenger W. 1992. Interactions of mast cells with the nervous system – Recent advances // *Neurochem. Res.* – V. 17. – № 9. – P. 939–51.

158. Joyce D.E., Gelbert L., Ciaccia A., DeHoff B., Grinnell B.W. 2001. Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis // *J. Biol. Chem.* – V. 276. – № 14. – P. 11199–203.

159. Joyce D.E., Grinnell B.W. 2002. Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor- κ B // *Crit. Care Med.* – V. 30. – № 5. – P. 288–93.

160. Jun D., Kim K. 2004. ATP-mediated necrotic volume increase (NVI) in substantia nigra pars compacta dopaminergic neuron. In *Itinerary Planner*. Washington: Society for Neuroscience.

161. Jung S., Pfeiffer F., Deitmer J.W. 2000. Histamine-induced calcium entry in rat cerebellar astrocytes: evidence for capacitative and non-capacitative mechanisms // *J. Physiol.* – V. 527. – № 3. – P. 549–61.

162. Junge C.E., Lee C.J., Hubbard K.B., Zhang Z., Olson J.J., Hepler J.R., Brat D.J., Traynelis S.F. 2004. Protease-activated receptor-1 in human brain: Localization and functional expression in astrocytes // *Exp. Neurol.* – V. 188. – № 1. – P. 94–103.

163. Kahsai A.W., Wisler J.W., Lee J., Ahn S., Cahill T.J., Dennison S.M., Staus D.P., Thomsen A.R.B., Anasti K.M., Pani B., Wingler L.M., Desai H., Bompiani K.M., Strachan R.T., Qin X., Alam S.M., Sullenger B.A., Lefkowitz R.J. 2016. Conformationally selective RNA aptamers allosterically modulate the β 2-Adrenoceptor // *Nat. Chem. Biol.* – V. 12. – № 9. – P. 709–16.

164. Kaneider N.C., Leger A.J., Agarwal A., Nguyen N., Perides G., Derian C., Covic L., Kuliopulos A. 2007. "Role reversal" for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage // *Nat. Immunol.* – V. 8. – № 12. – P. 1303–12.

165. Karmakar M., Katsnelson M.A., Dubyak G.R., Pearlman E. 2016. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP // *Nat. Commun.* – V. 7. – P. 10555.

166. Kempuraj D., Thangavel R., Selvakumar G.P., Zaheer S., Ahmed M.E., Raikwar S.P., Zahoor H., Saeed D., Natteru P.A., Iyer S., Zaheer A. 2017. Brain and peripheral atypical inflammatory mediators potentiate neuroinflammation and neurodegeneration // *Front. Cell. Neurosci.* – V. 11.
167. Kerschen E.J., Fernandez J.A., Cooley B.C., Yang X. V., Sood R., Mosnier L.O., Castellino F.J., Mackman N., Griffin J.H., Weiler H. 2007. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant-activated protein C // *J. Exp. Med.* – V. 204. – № 10. – P. 2439–48.
168. Khalil M., Ronda J., Weintraub M., Jain K., Silver R., Silverman A.J. 2007. Brain mast cell relationship to neurovasculature during development // *Brain Res.* – V. 1171. – № 1. – P. 18–29.
169. Khan H.A., Ahmad M.Z., Khan J.A., Arshad M.I. 2017. Crosstalk of liver immune cells and cell death mechanisms in different murine models of liver injury and its clinical relevance // *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* – V. 16. – № 3. – P. 245–56.
170. Kim C.F., Moalem-Taylor G. 2011. Detailed characterization of neuro-immune responses following neuropathic injury in mice // *Brain Res.* – V. 1405. – P. 95–108.
171. Kim D.Y., Hong G.U., Ro J.Y. 2011. Signal pathways in astrocytes activated by cross-talk between of astrocytes and mast cells through CD40-CD40L // *J. Neuroinflammation* – V. 8. – № 1. – P. 25.
172. Kim D.Y., Jeoung D., Ro J.Y. 2010. Signaling pathways in the activation of mast cells cocultured with astrocytes and colocalization of both cells in experimental allergic encephalomyelitis // *J. Immunol.* – V. 185. – № 1. – P. 273–83.
173. Kiseleva E. V., Storozhevykh T.P., Pinelis V.G., Gluza E., Strukova S.M. 2004. Role of thrombin in activation of neurons in rat hippocampus // *Bull. Exp. Biol. Med.* – V. 137. – № 5. – P. 453–56.
174. Komarova Y., Malik A.B. 2010. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways // *Annu. Rev. Physiol.* – V. 72. – № 1. – P. 463–93.
175. Komarova Y.A., Mehta D., Malik A.B. 2007. Dual regulation of endothelial junctional permeability // *Sci. STKE* – V. 2007. – № 412.
176. Konanki R., Gulati S., Saxena R., Gupta A.K., Seith A., Kumar A., Saxena A., Kabra M., Kalra V., Lakshmy R. 2014. Profile of prothrombotic factors in Indian children with ischemic stroke // *J. Clin. Neurosci.* – V. 21. – № 8. – P. 1315–18.
177. Kondreddy V., Wang J., Keshava S., Esmon C.T., Vijaya Mohan Rao L., Pendurthi U.R. 2018. Factor VIIa induces anti-inflammatory signaling via EPCR and PAR1 // *Blood* – V. 131. – № 21. – P. 2379–92.

178. Korhonen H., Fisslthaler B., Moers A., Wirth A., Habermehl D., Wieland T., Schütz G., Wetschreck N., Fleming I., Offermanns S. 2009. Anaphylactic shock depends on endothelial Gq/G11 // *J. Exp. Med.* – V. 206. – № 2. – P. 411–20.
179. Kowalski M.L., Kaliner M.A. 1988. Neurogenic inflammation, vascular permeability, and mast cells // *J. Immunol.* – V. 140. – № 11. – P. 3905–11.
180. Kucher B.M., Neary J.T. 2005. Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes // *J. Neurochem.* – V. 92. – № 3. – P. 525–35.
181. Kulczycki A., Isersky C., Metzger H. 1974. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells: I. Evidence for specific binding of IgE // *J. Exp. Med.* – V. 139. – № 3. – P. 600–616.
182. Kulka M., Befus A.D. 2003. The dynamic and complex role of mast cells in allergic disease // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* – V. 51. – № 2. – P. 111–20.
183. Kulka M., Fukuishi N., Metcalfe D.D. 2009. Human mast cells synthesize and release angiogenin, a member of the ribonuclease A (RNase A) superfamily // *J. Leukoc. Biol.* – V. 86. – № 5. – P. 1217–26.
184. Lämmer A., Günther A., Beck A., Krügel U., Kittner H., Schneider D., Illes P., Franke H. 2006. Neuroprotective effects of the P2 receptor antagonist PPADS on focal cerebral ischaemia-induced injury in rats // *Eur. J. Neurosci.* – V. 23. – № 10. – P. 2824–28.
185. Lee C.J., Mannaioni G., Yuan H., Woo D.H., Gingrich M.B., Traynelis S.F. 2007. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors // *J. Physiol.* – V. 581. – № 3. – P. 1057–81.
186. Lee K.P., Yuan J.P., Hong H., So I., Worley P.F., Muallem S. 2010. An endoplasmic reticulum/plasma membrane junction: STIM1/Orai1/TRPCs // *FEBS Lett.* – V. 584. – № 10. – P. 2022–27.
187. Lee P.R., Johnson T.P., Gnanapavan S., Giovannoni G., Wang T., Steiner J.P., Medynets M., Vaal M.J., Gartner V., Nath A. 2017. Protease-activated receptor-1 activation by granzyme B causes neurotoxicity that is augmented by interleukin-1 β // *J. Neuroinflammation* – V. 14. – № 1. – P. 1–18.
188. Lehnardt S. 2010. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in toll-like receptor-mediated neuronal injury // *Glia* – V. 58. – № 3. – P. 253–63.
189. Li M., Chang T.H., Silberberg S.D., Swartz K.J. 2008. Gating the pore of P2X receptor channels // *Nat. Neurosci.* – V. 11. – № 8. – P. 883–87.
190. Libby P., Sukhova G., Lee R.T., Liao J.K. 1997. Molecular biology of atherosclerosis // *Int. J. Cardiol.* – V. 62. – P. S23–29.
191. Limbrick D.D., Churn S.B., Sombati S., DeLorenzo R.J. 1995. Inability to restore resting

intracellular calcium levels as an early indicator of delayed neuronal cell death // *Brain Res.* – V. 690. – № 2. – P. 145–56.

192. Linde C.I., Baryshnikov S.G., Mazzocco-Spezia A., Golovina V.A. 2011. Dysregulation of Ca²⁺ signaling in astrocytes from mice lacking amyloid precursor protein // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* – V. 300. – № 6. – P. 1502–12.

193. Lindsberg P.J., Strbian D., Karjalainen-Lindsberg M.L. 2010. Mast cells as early responders in the regulation of acute blood-brain barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – V. 30. – № 4. – P. 689–702.

194. Liu D., Cheng T., Guo H., Fernández J.A., Griffin J.H., Song X., Zlokovic B. V. 2004. Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C // *Nat. Med.* – V. 10. – № 12. – P. 1379–83.

195. Liu D.Z., Ander B.P., Xu H., Shen Y., Kaur P., Deng W., Sharp F.R. 2010. Blood-brain barrier breakdown and repair by Src after thrombin-induced injury // *Ann. Neurol.* – V. 67. – № 4. – P. 526–33.

196. Liu S.J., Zukin R.S. 2007. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death // *Trends Neurosci.* – V. 30. – № 3. – P. 126–34.

197. Ludeman M.J., Kataoka H., Srinivasan Y., Esmon N.L., Esmon C.T., Coughlin S.R. 2005. PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin // *J. Biol. Chem.* – V. 280. – № 13. – P. 13122–28.

198. Luo W., Wang Y., Reiser G. 2009. The role of thrombin and thrombin receptors in the brain. In *Thrombin: Physiology and Disease*, edited by M. E. Maragoudakis and N. Tsopanoglou. New York: Springer

199. Lyman M., Lloyd D.G., Ji X., Vizcaychipi M.P., Ma D. 2014. Neuroinflammation: The role and consequences // *Neurosci. Res.* – V. 79. – № 1. – P. 1–12.

200. Ma J., Zhang F.L., Zhou G., Bao Y.X., Shen Y., Qian Z.M. 2018. Different characteristics of hepcidin expression in IL-6^{+/+} and IL-6^{-/-} neurons and astrocytes treated with lipopolysaccharides // *Neurochem. Res.* – V. 43. – № 8. – P. 1624–30.

201. Madani R., Hulo S., Toni N., Madani H., Steimer T., Muller D., Vassalli J.D. 1999. Enhanced hippocampal long-term potentiation, learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice // *EMBO J.* – V. 18. – № 11. – P. 3007–12.

202. Makarova A.M., Gorbacheva L.R., Zamolodchikova T.S., Rumsh L.D., Bespalova Z.D., Strukova S.M. 2008. Various effects of serine proteinases, activated protein C and duodenase, on mast cells // *Biomed. Khim.* – V. 54. – № 6. – P. 649–58.

203. Marchese A., Paing M.M., Temple B.R.S., Trejo J. 2008. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – V. 48. – № 1. –

P. 601–29.

204. Masada T., Xi G., Hua Y., Keep R.F. 2000. The effects of thrombin preconditioning on focal cerebral ischemia in rats // *Brain Res.* – V. 867. – № 1–2. – P. 173–79.

205. Maslinska D., Laure-Kamionowska M., Maslinski K.T., Gujski M., Maslinski S. 2007. Distribution of tryptase-containing mast cells and metallothionein reactive astrocytes in human brains with amyloid deposits // *Inflamm. Res.* – V. 56. – P. 17–18.

206. Mattila O.S., Strbian D., Saksi J., Pikkarainen T.O., Rantanen V., Tatlisumak T., Lindsberg P.J. 2011. Cerebral mast cells mediate blood-brain barrier disruption in acute experimental ischemic stroke through perivascular gelatinase activation // *Stroke* – V. 42. – № 12. – P. 3600–3605.

207. McKelvey K., Jackson C.J., Xue M. 2014. Activated protein C: A regulator of human skin epidermal keratinocyte function // *World J. Biol. Chem.* – V. 5. – № 2. – P. 169.

208. McKittrick C.M., Lawrence C.E., Carswell H.V.O. 2015. Mast cells promote blood brain barrier breakdown and neutrophil infiltration in a mouse model of focal cerebral ischemia // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – V. 35. – P. 638–47.

209. McNeil B.D., Pundir P., Meeker S., Han L., Udem B.J., Kulka M., Dong X. 2015. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions // *Nature* – V. 519. – № 7542. – P. 237–41.

210. Mehta D., Rahman A., Malik A.B. 2001. Protein kinase C- α signals rho-uanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function // *J. Biol. Chem.* – V. 276. – № 25. – P. 22614–20.

211. Melani A., Turchi D., Vannucchi M.G., Cipriani S., Gianfriddo M., Pedata F. 2005. ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during *in vivo* ischemia // *Neurochem. Int.* – V. 47. – № 6. – P. 442–48.

212. Mele T., Jurič D.M. 2013. Identification and pharmacological characterization of the histamine H3 receptor in cultured rat astrocytes // *Eur. J. Pharmacol.* – V. 720. – № 1–3. – P. 198–204.

213. Meli R., Raso G.M., Cicala C., Esposito E., Fiorino F., Cirino G. 2001. Thrombin and PAR-1 activating peptide increase iNOS expression in cytokine-stimulated C6 glioma cells // *J. Neurochem.* – V. 79. – № 3. – P. 556–63.

214. Mhatre M., Nguyen A., Kashani S., Pham T., Adesina A., Grammas P. 2004. Thrombin, a mediator of neurotoxicity and memory impairment // *Neurobiol. Aging* – V. 25. – № 6. – P. 783–93.

215. Mina Y., Rinkevich-Shop S., Konen E., Goitein O., Kushnir T., Epstein F.H., Feinberg M.S., Leor J., Landa-Rouben N. 2013. Mast cell inhibition attenuates myocardial damage,

adverse remodeling, and dysfunction during fulminant myocarditis in the rat // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – V. 18. – № 2. – P. 152–61.

216. Minhas N., Xue M., Fukudome K., Jackson C.J. 2010. Activated protein C utilizes the angiopoietin/Tie2 axis to promote endothelial barrier function // *FASEB J.* – V. 24. – № 3. – P. 873–81.

217. Mitrokhin V., Kalsin V., Kamkina O., Babkina I., Zotov A., Troitskiy V.A., Mladenov M.I., Kamkin G.A. Participation of PKG and PKA-related pathways in the IFN- γ induced modulation of the BKca channel activity in human cardiac fibroblasts // *J. of Pharmacological Sciences.* – 2019. – V. 141. – P. 25–31.

218. Mitrokhin V., Mladenov M., Gorbacheva L., Babkina I., Lovchikova I., Kazanski V., Kamkin A. 2018. Influence of NO and $[Ca^{2+}]_o$ on $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis in rat ventricular cardiomyocytes // *Biotechnology and Biotechnological Equipment.* – V. 32. – P. 1338–1343.

219. Molina-Hernández A., Velasco I. 2008. Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors // *J. Neurochem.* – V. 106. – № 2. – P. 706–17.

220. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods* – V. 65. – № 1–2. – P. 55–63.

221. Mosnier L.O., Gale A.J., Yegneswaran S., Griffin J.H. 2004. Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity // *Blood* – V. 104. – № 6. – P. 1740–44.

222. Mosnier L.O., Sinha R.K., Burnier L., Bouwens E.A., Griffin J.H. 2012. Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by noncanonical cleavage at Arg46 // *Blood* – V. 120. – № 26. – P. 5237–46.

223. Mosnier L.O., Zlokovic B. V., Griffin J.H. 2007. The cytoprotective protein C pathway // *Blood* – V. 109. – № 8. – P. 3161–72.

224. Mosnier L.O., Zlokovic B. V., Griffin J.H. 2014. Cytoprotective-selective activated protein C therapy for ischaemic stroke // *Thromb. Haemost.* – V. 112. – № 5. – P. 883–92.

225. Moulin D., Donzé O., Talabot-Ayer D., Mézin F., Palmer G., Gabay C. 2007. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells // *Cytokine* – V. 40. – № 3. – P. 216–25.

226. Mulder S.D., Veerhuis R., Blankenstein M.A., Nielsen H.M. 2012. The effect of amyloid associated proteins on the expression of genes involved in amyloid- β clearance by adult human astrocytes // *Exp. Neurol.* – V. 233. – № 1. – P. 373–79.

227. Muller M.S., Taylor C.W. 2017. ATP evokes Ca^{2+} signals in cultured foetal human cortical astrocytes entirely through G protein-coupled P2Y receptors // *J. Neurochem.* – V. 142.

– № 6. – P. 876–85.

228. Narasimhan V., Holowka D., Baird B. 1990. Microfilaments regulate the rate of exocytosis in rat basophilic leukemia cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – V. 171. – № 1. – P. 222–29.

229. Nautiyal K.M., Dailey C.A., Jahn J.L., Rodriguez E., Son N.H., Sweedler J. V., Silver R. 2012. Serotonin of mast cell origin contributes to hippocampal function // *Eur. J. Neurosci.* – V. 36. – № 3. – P. 2347–59.

230. Nautiyal K.M., Liu C., Dong X., Silver R. 2011. Blood-borne donor mast cell precursors migrate to mast cell-rich brain regions in the adult mouse // *J. Neuroimmunol.* – V. 240–241. – P. 142–46.

231. Nedergaard M., Ransom B., Goldman S.A. 2003. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain // *Trends Neurosci.* – V. 26. – № 10. – P. 523–30.

232. Nelissen S., Lemmens E., Geurts N., Kramer P., Maurer M., Hendriks J., Hendrix S. 2013. The role of mast cells in neuroinflammation // *Acta Neuropathol.* – V. 125. – № 5. – P. 637–50.

233. Nicole O., Goldshmidt A., Hamill C.E., Sorensen S.D., Sastre A., Lyuboslavsky P., Hepler J.R., McKeon R.J., Traynelis S.F. 2005. Activation of protease-activated receptor-1 triggers astrogliosis after brain injury // *J. Neurosci.* – V. 25. – № 17. – P. 4319–29.

234. Niessen F., Schaffner F., Furlan-Freguia C., Pawlinski R., Bhattacharjee G., Chun J., Derian C.K., Andrade-Gordon P., Rosen H., Ruf W. 2008. Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation // *Nature* – V. 452. – № 7187. – P. 654–58.

235. Ning C., Wang H.M.D., Gao R., Chang Y.C., Hu F., Meng X., Huang S.Y. 2018. Marine-derived protein kinase inhibitors for neuroinflammatory diseases // *Biomed. Eng. Online* – V. 17. – № 1. – P. 46.

236. Nishino A., Suzuki M., Ohtani H., Motohashi O., Umezawa K., Nagura H., Yoshimoto T. 1993. Thrombin may contribute to the pathophysiology of central nervous system injury // *J. Neurotrauma* – V. 10. – № 2. – P. 167–79.

237. Nishizuka Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C, its implications for cellular regulation // *Nature* – V. 334. – № 6184. – P. 661–65.

238. Nizamutdinova I.T., Dusio G.F., Gasheva O.Y., Skoog H., Tobin R., Peddaboina C., Meininger C.J., Zawieja D.C., Newell-Rogers M.K., Gashev A.A. 2016. Mast cells and histamine are triggering the NF- κ B-mediated reactions of adult and aged perilymphatic mesenteric tissues to acute inflammation // *Aging* – V. 8. – № 11. – P. 3065–90.

239. Nörenberg W., Schunk J., Fischer W., Sobottka H., Riedel T., Oliveira J., Franke H., Illes P. 2010. Electrophysiological classification of P2X7 receptors in rat cultured neocortical

astroglia // *Br. J. Pharmacol.* – V. 160. – № 8. – P. 1941–52.

240. Noworyta-Sokołowska K., Górská A., Gołembowska K. 2013. LPS-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat striatum // *Pharmacol. Reports* – V. 65. – № 4. – P. 863–69.

241. Ocak U., Ocak P.E., Wang A., Zhang J.H., Boling W., Wu P., Mo J., Zhang T., Huang L. 2018. Targeting mast cell as a neuroprotective strategy // *Brain Inj.* – V. 33. – № 6. – P. 723-733.

242. Oganessian V., Oganessian N., Terzyan S., Qu D., Dauter Z., Esmon N.L., Esmon C.T. 2002. The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid // *J. Biol. Chem.* – V. 277. – № 28. – P. 24851–54.

243. Ogura A., Nishida T. 1988. The Uterine Vascular System of the Golden Hamster and Its Changes during the Oestrous Cycle // *J. Anat.* – V. 158. – P. 43.

244. Oka T., Hori M., Tanaka A., Matsuda H., Karaki H., Ozaki H. 2004. IgE alone-induced actin assembly modifies calcium signaling and degranulation in RBL-2H3 mast cells // *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.* – V. 286. – № 2. – P. 256–63.

245. Okada S., Nakamura M., Mikami Y., Shimazaki T., Mihara M., Ohsugi Y., Iwamoto Y., Yoshizaki K., Kishimoto T., Toyama Y., Okano H. 2004. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury // *J. Neurosci. Res.* – V. 76. – № 2. – P. 265–76.

246. Okayama Y., Kawakami T. 2006. Development, migration, and survival of mast cells // *Immunol. Res.* – V. 34. – № 2. – P. 97–115.

247. Olianás M.C., Dedoni S., Onali P. 2007. Proteinase-activated receptors 1 and 2 in rat olfactory system: Layer-specific regulation of multiple signaling pathways in the main olfactory bulb and induction of neurite retraction in olfactory sensory neurons // *Neuroscience* – V. 146. – № 3. – P. 1289–1301.

248. Oliveira J.F., Riedel T., Leichsenring A., Heine C., Franke H., Krügel U., Nörenberg W., Illes P. 2011. Rodent cortical astroglia express in situ functional P2X₇ receptors sensing pathologically high ATP concentrations // *Cereb. Cortex* – V. 21. – № 4. – P. 806–20.

249. Olmos G., Lladó J. 2014. Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity // *Mediators Inflamm.* – V. 2014.

250. Olson E.E., Lyuboslavsky P., Traynelis S.F., McKeon R.J. 2004. PAR-1 deficiency protects against neuronal damage and neurologic deficits after unilateral cerebral hypoxia/ischemia // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – V. 24. – № 9. – P. 964–71.

251. Osipchuk Y., Cahalan M. 1992. Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells // *Nature* – V. 359. – № 6392. – P. 241–44.

252. Ott B.R., Jones R.N., Daiello L.A., de la Monte S.M., Stopa E.G., Johanson C.E., Denby

C., Grammas P. 2018. Blood-cerebrospinal fluid barrier gradients in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Relationship to inflammatory cytokines and chemokines // *Front. Aging Neurosci.* – V. 10. – P. 245.

253. Pannicke T., Fischer W., Biedermann B., Schädlich H., Grosche J., Faude F., Wiedemann P., Allgaier C., Illes P., Burnstock G., Reichenbach A. 2000. P2X7 receptors in Muller glial cells from the human retina // *J. Neurosci.* – V. 20. – № 16. – P. 5965–72.

254. Park S.H., Choi H.J., Lee S.Y., Han J.S. 2015. TLR4-mediated IRAK1 activation induces TNF- α expression via JNK-dependent NF- κ B activation in human bronchial epithelial cells // *Eur. J. Inflamm.* – V. 13. – № 3. – P. 183–95.

255. Parpura V., Basarsky T.A., Liu F., Jęftinija K., Jęftinija S., Haydon P.G. 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling // *Nature* – V. 369. – № 6483. – P. 744–47.

256. Pascual O., Casper K.B., Kubera C., Zhang J., Revilla-Sanchez R., Sul J.Y., Takano H., Moss S.J., McCarthy K., Haydon P.G. 2005. Neurobiology: Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks // *Science.* – V. 310. – № 5745. – P. 113–16.

257. Patel A., Vasanthan V., Fu W., Fahlman R.P., MacTavish D., Jhamandas J.H. 2016. Histamine induces the production of matrix metalloproteinase-9 in human astrocytic cultures via H1-receptor subtype // *Brain Struct. Funct.* – V. 221. – № 4. – P. 1845–60.

258. Pelvig D.P., Pakkenberg H., Stark A.K., Pakkenberg B. 2008. Neocortical glial cell numbers in human brains // *Neurobiol. Aging* – V. 29. – № 11. – P. 1754–62.

259. Penkowa M., Giralt M., Lago N., Camats J., Carrasco J., Hernández J., Molinero A., Campbell I.L., Hidalgo J. 2003. Astrocyte-targeted expression of IL-6 protects the CNS against a focal brain injury // *Exp. Neurol.* – V. 181. – № 2. – P. 130–48.

260. Pickering M., Cumiskey D., O'Connor J.J. 2005. Actions of TNF- α on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system // *Exp. Physiol.* – V. 90. – № 5. – P. 663–70.

261. Pike C.J., Vaughan P.J., Cunningham D.D., Cotman C.W. 1996. Thrombin attenuates neuronal cell death and modulates astrocyte reactivity induced by β -amyloid *in vitro* // *J. Neurochem.* – V. 66. – № 4. – P. 1374–82.

262. van der Poll T., Levi M. 2012. Crosstalk between inflammation and coagulation: the lessons of sepsis // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – V. 10. – № 5. – P. 632–38.

263. Ponath G., Park C., Pitt D. 2018. The role of astrocytes in multiple sclerosis // *Front. Immunol.* – V. 9. – P. 217.

264. Preston R.J.S., Ajzner E., Razzari C., Karageorgi S., Dua S., Dahlbäck B., Lane D.A. 2006. Multifunctional specificity of the protein C/activated protein C Gla domain // *J. Biol. Chem.* – V. 281. – № 39. – P. 28850–57.

265. Psatha M., Koffer A., Erent M., Moss S.E., Bolsover S. 2004. Calmodulin spatial

dynamics in RBL-2H3 mast cells // *Cell Calcium* – V. 36. – № 1. – P. 51–59.

266. Psatha M.I., Razi M., Koffer A., Moss S.E., Sacks D.B., Bolsover S.R. 2007. Targeting of calcium:calmodulin signals to the cytoskeleton by IQGAP1 // *Cell Calcium* – V. 41. – № 6. – P. 593–605.

267. Putney J.W. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry // *Cell Calcium* – V. 7. – № 1. – P. 1–12.

268. Radulovic M., Yoon H., Wu J., Mustafa K., Scarisbrick I.A. 2016. Targeting the thrombin receptor modulates inflammation and astrogliosis to improve recovery after spinal cord injury // *Neurobiol. Dis.* – V. 93. – P. 226–42.

269. Rajagopal S., Rajagopal K., Lefkowitz R.J. 2010. Teaching old receptors new tricks: Biasing seven-transmembrane receptors // *Nat. Rev. Drug Discov.* – V. 9. – № 5. – P. 373–86.

270. Ramachandran R., Noorbakhsh F., Defea K., Hollenberg M.D. 2012. Targeting proteinase-activated receptors: Therapeutic potential and challenges // *Nat. Rev. Drug Discov.* – V. 11. – № 1. – P. 69–86.

271. Ramos-Mandujano G., Vázquez-Juárez E., Hernández-Benítez R., Pasantes-Morales H. 2007. Thrombin potently enhances swelling-sensitive glutamate efflux from cultured astrocytes // *Glia* – V. 55. – № 9. – P. 917–25.

272. Randall R.D., Thayer S.A. 1992. Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons // *J. Neurosci.* – V. 12. – № 5. – P. 1882–95.

273. Redegeld F.A., Yu Y., Kumari S., Charles N., Blank U. 2018. Non-IgE mediated mast cell activation // *Immunol. Rev.* – V. 282. – № 1. – P. 87–113.

274. Rezaie A.R. 2010. Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways // *Curr. Med. Chem.* – V. 17. – № 19. – P. 2059–69.

275. Rezaie A.R. 2011. The occupancy of endothelial protein C receptor by its ligand modulates the par-1 dependent signaling specificity of coagulation proteases // *IUBMB Life* – V. 63. – № 6. – P. 390–96.

276. Riek-Burchardt M., Striggow F., Henrich-Noack P., Reiser G., Reymann K.G. 2002. Increase of prothrombin-mRNA after global cerebral ischemia in rats, with constant expression of protease nexin-1, protease-activated receptors // *Neurosci. Lett.* – V. 329. – № 2. – P. 181–84.

277. Riewald M., Petrovan R.J., Donner A., Mueller B.M., Ruf W. 2002. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway // *Science* – V. 296. – № 5574. – P. 1880–82.

278. Rivera J., Fierro N.A., Olivera A., Suzuki R. 2008. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE1 // *Adv. Immunol.* – V. 98. – P. 85–120.

279. Rodrigues M.C.O., Sanberg P.R., Cruz L.E., Garbuzova-Davis S. 2014. The innate and adaptive immunological aspects in neurodegenerative diseases // *J. Neuroimmunol.* – V. 269. – № 1–2. – P. 1–8.
280. Rohatgi T., Sedehizade F., Reymann K.G., Reiser G. 2004. Protease-activated receptors in neuronal development, neurodegeneration, and neuroprotection: Thrombin as signaling molecule in the brain // *Neuroscientist* – V. 10. – № 6. – P. 501–12.
281. Rönnerberg A.L., Edvinsson L., Larsson L.I., Nielsen K.C., Owman C. 1973. Regional variation in the presence of mast cells in the mammalian brain // *Agents Actions* – V. 3. – № 3. – P. 191.
282. Roy R.V., Ardeshirylajimi A., Dinarvand P., Yang L., Rezaie A.R., Doisy E.A. 2016. Occupancy of human EPCR by protein C induces b-arrestin-2 biased PAR1 signaling by both APC and thrombin // *Blood* – V. 128. – № 14. – P. 1884–93.
283. Ruf W., Dorfleutner A., Riewald M. 2003. Specificity of coagulation factor signaling // *J. Thromb. Haemost.* – V. 1. – № 7. – P. 1495–1503.
284. Rusanova A.V., Vasileva T.V., Smirnov M.D., Strukova S.M. 2009. Mast cells as a target for anti inflammatory effects induced by activated protein C // *Tsitokiny Vospal.* – V. 8. – P. 48–53.
285. Russo A., Soh U.J.K., Paing M.M., Arora P., Trejo J. 2009. Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – V. 106. – № 15. – P. 6393–97.
286. Rzigalinski B.A., Liang S., McKinney J.S., Willoughby K.A., Ellis E.F. 1997. Effect of Ca^{2+} on *in vitro* astrocyte injury // *J. Neurochem.* – V. 68. – № 1. – P. 289–96.
287. Saluja R., Khan M., Church M.K., Maurer M. 2015. The role of IL-33 and mast cells in allergy and inflammation // *Clin. Transl. Allergy* – V. 5. – № 1. – P. 33.
288. Scarisbrick I.A., Isackson P.J., Ciric B., Windebank A.J., Rodriguez M. 2001. MSP, a trypsin-like serine protease, is abundantly expressed in the human nervous system // *J. Comp. Neurol.* – V. 431. – № 3. – P. 347–61.
289. Scheffer G.L., Flens M.J., Hageman S., Izquierdo M.A., Shoemaker R.H., Scheper R.J. 2002. Expression of the vascular endothelial cell protein C receptor in epithelial tumour cells // *Eur. J. Cancer* – V. 38. – № 11. – P. 1535–42.
290. Schoergenhofer C., Schwameis M., Gelbenegger G., Buchtele N., Thaler B., Mussbacher M., Schabbauer G., Wojta J., Jilma-Stohlawetz P., Jilma B. 2018. Inhibition of protease-activated receptor (PAR1) reduces activation of the endothelium, coagulation, fibrinolysis and inflammation during human endotoxemia // *Thromb. Haemost.* – V. 118. – № 7. – P. 1176–84.
291. Schuepbach R.A., Feistritzer C., Brass L.F., Riewald M. 2008. Activated protein

C-cleaved protease activated receptor-1 is retained on the endothelial cell surface even in the presence of thrombin // *Blood* – V. 111. – № 5. – P. 2667–73.

292. Schulte G., Shenoy S.K. 2011. β -Arrestin and dishevelled coordinate biased signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – V. 108. – № 50. – P. 19839–40.

293. Schwartz L.B., Austen K.F., Wasserman S.I. 1979. Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. // *J. Immunol.* – V. 123. – № 4. – P. 1445–50.

294. Shenoy S.K., Lefkowitz R.J. 2011. B-arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction // *Trends Pharmacol. Sci.* – V. 32. – № 9. – P. 521–33.

295. Shibata M., Kumar S.R., Amar A., Fernandez J.A., Hofman F., John H., Zlokovic B. V. 2001. Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke // *Circulation* – V. 103. – № 13. – P. 1799–1805.

296. Shore P.A., Burkhalter A., Cohn V.H. 1959. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – V. 127. – № 3. – P. 182–86.

297. Silver R., Curley J.P. 2013. Mast cells on the mind: New insights and opportunities // *Trends Neurosci.* – V. 36. – № 9. – P. 513–21.

298. Silver R., Silverman A.J., Vitković L., Lederhendler I.I. 1996. Mast cells in the brain: Evidence and functional significance // *Trends Neurosci.* – V. 19. – № 1. – P. 25–31.

299. Silverman A.J., Sutherland A.K., Wilhelm M., Silver R. 2000. Mast cells migrate from blood to brain // *J. Neurosci.* – V. 20. – № 1. – P. 401–8.

300. Skaper S.D., Facci L., Giusti P. 2014. Mast cells, glia and neuroinflammation: Partners in crime? // *Immunology* – V. 141. – № 3. – P. 314–27.

301. Skaper S.D., Facci L., Kee W.J., Strijbos P.J.L.M. 2001. Potentiation by histamine of synaptically mediated excitotoxicity in cultured hippocampal neurones: a possible role for mast cells // *J. Neurochem.* – V. 76. – P. 47–55.

302. Skaper S.D., Facci L., Romanello S., Leon A. 2002. Mast cell activation causes delayed neurodegeneration in mixed hippocampal cultures via the nitric oxide pathway // *J. Neurochem.* – V. 66. – № 3. – P. 1157–66.

303. Skaper S.D., Facci L., Zusso M., Giusti P. 2017. Neuroinflammation, mast cells, and glia: dangerous liaisons // *Neuroscientist* – V. 23. – № 5. – P. 478–98.

304. Skaper S.D., Giusti P., Facci L. 2012. Microglia and mast cells: Two tracks on the road to neuroinflammation // *FASEB J.* – V. 26. – № 8. – P. 3103–17.

305. Smirnova I. V., Zhang S.X., Citron B.A., Arnold P.M., Festoff B.W. 1998. Thrombin is an extracellular signal that activates intracellular death protease pathways inducing apoptosis in model motor neurons // *J. Neurobiol.* – V. 36. – № 1. – P. 64–80.

306. Smith-Swintosky V.L., Zimmer S., Fenton J.W., Mattson M.P. 1995. Protease nexin-1 and thrombin modulate neuronal Ca²⁺ homeostasis and sensitivity to glucose deprivation-induced injury // *J. Neurosci.* – V. 15. – № 8. – P. 5840–50.
307. Sofroniew M. V., Vinters H. V. 2010. Astrocytes: Biology and pathology // *Acta Neuropathol.* – V. 119. – № 1. – P. 7–35.
308. Soh U.J., Dores M.R., Chen B., Trejo J. 2010. Signal transduction by protease-activated receptors // *Br. J. Pharmacol.* – V. 160. – № 2. – P. 191–203.
309. Soh U.J.K., Trejo J. 2011. Activated protein C promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through β -arrestin and dishevelled-2 scaffolds // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – V. 108. – № 50. – P. 1372–80.
310. Solleiro-Villavicencio H., Rivas-Arancibia S. 2018. Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4⁺ T cells in neurodegenerative diseases // *Front. Cell. Neurosci.* – V. 12. – P. 114.
311. Sorensen S.D., Nicole O., Peavy R.D., Montoya L.M., Lee C.J., Murphy T.J., Traynelis S.F., Hepler J.R. 2003. Common signaling pathways link activation of murine PAR-1 LPA₁, S1P receptors to proliferation of astrocytes // *Mol. Pharmacol.* – V. 64. – № 5. – P. 1199–1209.
312. Sperlágh B., Illes P. 2014. P2X7 receptor: An emerging target in central nervous system diseases // *Trends Pharmacol. Sci.* – V. 35. – № 10. – P. 537–47.
313. Sperlágh B., Vizi E.S., Wirkner K., Illes P. 2006. P2X7 receptors in the nervous system // *Prog. Neurobiol.* – V. 78. – № 6. – P. 327–46.
314. Stanika R.I., Pivovarova N.B., Brantner C.A., Watts C.A., Winters C.A., Andrews S.B. 2009. Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – V. 106. – № 24. – P. 9854–59.
315. Stead R.H., Dixon M.F., Bramwell N.H., Riddell R.H., Bienenstock J. 1989. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa // *Gastroenterology* – V. 97. – № 3. – P. 575–85.
316. Steinhoff M., Buddenkotte J., Shpacovitch V., Rattenholl A., Moormann C., Vergnolle N., Luger T.A., Hollenberg M.D. 2005. Proteinase-activated receptors: Transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response // *Endocr. Rev.* – V. 26. – № 1. – P. 1–43.
317. Stout C.E., Costantin J.L., Naus C.C.G., Charles A.C. 2002. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels // *J. Biol. Chem.* – V. 277. – № 12. – P. 10482–88.
318. Strbian D., Kovanen P.T., Karjalainen-Lindsberg M.L., Tatlisumak T., Lindsberg P.J. 2009. An emerging role of mast cells in cerebral ischemia and hemorrhage // *Ann. Med.* – V. 41.

– № 6. – P. 438–50.

319. Striggow F., Riek-Burchardt M., Kiesel A., Schmidt W., Henrich-Noack P., Breder J., Krug M., Reymann K.G., Reiser G. 2002. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia // *Eur. J. Neurosci.* – V. 14. – № 4. – P. 595–608.

320. Striggow F., Riek M., Breder J., Henrich-Noack P., Reymann K.G., Reiser G. 2000. The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – V. 97. – № 5. – P. 2264–69.

321. Strokin M., Sergeeva M., Reiser G. 2003. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A 2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca^{2+} // *Br. J. Pharmacol.* – V. 139. – № 5. – P. 1014–22.

322. Strukova S. 2006. Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis // *Front. Biosci.* – V. 11. – P. 59–80.

323. Strukova S., Piskunov A., Rusanova A., Gorbacheva L., Ono F., Ishiwata S. 2011. Activated protein C modulates mast cell functions and survival at inflammation // *J. Thromb. Haemost.* – V. 9. – № 1. – P. 598–598.

324. Strukova S.M. 2001. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues // *Biochem.* – V. 66. – № 1. – P. 8–18.

325. Strukova S.M., Dugina T.N., Chistov I. V., Lange M., Markvicheva E.A., Kuptsova S., Zubov V.P., Glusa E. 2001. Immobilized thrombin receptor agonist peptide accelerates wound healing in mice // *Clin. Appl. Thromb.* – V. 7. – № 4. – P. 325–29.

326. Strukova S.M., Dugina T.N., Khlgtian S. V., Redkozubov A.E., Redkozubova G.P., Pinelis V.G. 1996. Thrombin-mediated events implicated in mast cell activation // *Semin. Thromb. Hemost.* – V. 22. – № 2. – P. 145–50.

327. Strukova S.M., Gorbacheva L.R., Storozhevykh T.P., Pinelis V.G., Smirnov M.D. 2006. Factor Xa protects cultured hippocampal neurons from glutamate toxicity // *J. Thromb. Haemost.* – V. 4. – P. 1409–10.

328. Strukova S.M., Kogan A.E., Tara A., Aaviksaar A. 1989. Anticoagulant effect of the protease from *Agkistrodon* venom mediated by protein C activation in rats // *Thromb. Res.* – V. 55. – № 1. – P. 149–53.

329. Stubbs M.T., Bode W. 1993. A player of many parts: The spotlight falls on thrombin's structure // *Thromb. Res.* – V. 69. – № 1. – P. 1–58.

330. Sullivan R., Burnham M., Török K., Koffer A. 2000. Calmodulin regulates the disassembly of cortical F-actin in mast cells but is not required for secretion // *Cell Calcium* –

V. 28. – № 1. – P. 33–46.

331. Suo Z., Wu M., Ameenuddin S., Anderson H.E., Zoloty J.E., Citron B.A., Andrade-Gordon P., Festoff B.W. 2002. Participation of protease-activated receptor-1 in thrombin-induced microglial activation // *J. Neurochem.* – V. 80. – № 4. – P. 655–66.

332. Suo Z., Wu M., Citron B.A., Palazzo R.E., Festoff B.W. 2003. Rapid tau aggregation and delayed hippocampal neuronal death induced by persistent thrombin signaling // *J. Biol. Chem.* – V. 278. – № 39. – P. 37681–89.

333. Suzuki M., Kudo A., Otawara Y., Hirashima Y., Takaku A., Ogawa A. 1999. Extrinsic pathway of blood coagulation and thrombin in the cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage // *Neurosurgery* – V. 44. – № 3. – P. 487–94.

334. Taiwo O.B., Kovács K.J., Larson A.A. 2005. Chronic daily intrathecal injections of a large volume of fluid increase mast cells in the thalamus of mice // *Brain Res.* – V. 1056. – № 1. – P. 76–84.

335. Tamada N., Tojo K., Yazawa T., Goto T. 2019. Necrosis rather than apoptosis is the dominant form of alveolar epithelial cell death in lipopolysaccharide-induced experimental acute respiratory distress syndrome model // *Shock*.

336. Tang F., Chen F., Ling X., Huang Y., Zheng X., Tang Q., Tan X. 2015. Inhibitory effect of methyleugenol on IgE-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 cells // *Mediators Inflamm.* – V. 2015.

337. Taoka Y., Okajima K., Uchiba M., Johno M. 2000. Neuroprotection by recombinant thrombomodulin // *Thromb. Haemost.* – V. 83. – № 3. – P. 462–68.

338. Tauseef M., Knezevic N., Chava K.R., Smith M., Sukriti S., Gianaris N., Obukhov A.G., Vogel S.M., Schraufnager D.E., Dietrich A., Birnbaumer L., Malik A.B., Mehta D. 2012. TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation // *J. Exp. Med.* – V. 209. – № 11. – P. 1953–68.

339. Theoharides T.C. 1990. Mast cells: The immune gate to the brain // *Life Sci.* – V. 46. – № 9. – P. 607–17.

340. Theoharides T.C. 2017. Neuroendocrinology of mast cells: Challenges and controversies // *Exp. Dermatol.* – V. 26. – № 9. – P. 751–59.

341. Tiruppathi C., Ahmed G.U., Vogel S.M., Malik A.B. 2006. Ca²⁺ signaling, TRP channels, and endothelial permeability // *Microcirculation* – V. 13. – № 8. – P. 693–708.

342. Tkaczyk C., Jensen B.M., Iwaki S., Gilfillan A.M. 2006. Adaptive and innate immune reactions regulating mast cell activation: from receptor-mediated signaling to responses // *Immunol. Allergy Clin. North Am.* – V. 26. – № 3. – P. 427–50.

343. Traina G. 2017. Mast cells in the brain - Old cells, new target // *J. Integr. Neurosci.* –

V. 16. – № 1. – P. 69–83.

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

345. Uvnäs B., Thon I.L. 1959. Isolation of "biologically intact" mast cells // *Exp. Cell Res.* – V. 18. – № 3. – P. 512–20.

346. Vandell A.G., Larson N., Laxmikanthan G., Panos M., Blaber S.I., Blaber M., Scarisbrick I.A. 2008. Protease-activated receptor dependent and independent signaling by kallikreins 1 and 6 in CNS neuron and astroglial cell lines // *J. Neurochem.* – V. 107. – № 3. – P. 855–70.

347. Vaughan P.J., Pike C.J., Cotman C.W., Cunningham D.D. 1995. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults // *J. Neurosci.* – V. 15. – № 7. – P. 5389–5401.

348. Vergnolle N. 2000. Review article: Proteinase-activated receptors - Novel signals for gastrointestinal pathophysiology // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – V. 14. – № 3. – P. 257–66.

349. Verkhrasky A., Krishtal O.A., Burnstock G. 2009. Purinoceptors on neuroglia // *Mol. Neurobiol.* – V. 39. – № 3. – P. 190–208.

350. Vianna E.P.M., Ferreira A.T., Naffah-Mazzacoratti M.G., Sanabria E.R.G., Funke M., Cavalheiro E.A., Fernandes M.J.S. 2002. Evidence that ATP participates in the pathophysiology of pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy: a fluorimetric, Immunohistochemical, and western blot studies // *Epilepsia* – V. 43. – P. 227–29.

351. Viviani B., Boraso M., Marchetti N., Marinovich M. 2014. Perspectives on neuroinflammation and excitotoxicity: A neurotoxic conspiracy? // *Neurotoxicology* – V. 43. – P. 10–20.

352. Vogel S.M., Malik A.B. 2012. Cytoskeletal dynamics and lung fluid balance // *Compr. Physiol.* – V. 2. – № 1. – P. 449–78.

353. Vu T.K.H., Hung D.T., Wheaton V.I., Coughlin S.R. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation // *Cell* – V. 64. – № 6. – P. 1057–68.

354. Walker C.T., Marky A.H., Petraglia A.L., Ali T., Chow N., Zlokovic B. V. 2010. Activated protein C analog with reduced anticoagulant activity improves functional recovery and reduces bleeding risk following controlled cortical impact // *Brain Res.* – V. 1347. – P. 125–31.

355. Wang C.M., Chang Y.Y., Kuo J.S., Sun S.H. 2002. Activation of P2X7 receptors induced [3H] GABA release from the RBA-2 type-2 astrocyte cell line through a Cl⁻/HCO³⁻-dependent mechanism // *Glia* – V. 37. – № 1. – P. 8–18.

356. Wang H., Ubl J.J., Stricker R., Reiser G. 2002. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation

in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways // *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.* – V. 283. – № 5. – P. 1351–64.

357. Wang J., Wang H., Zhu R., Liu Q., Fei J., Wang S. 2015. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis // *Biomaterials* – V. 53. – P. 475–83.

358. Wang Y., Richter-Landsberg C., Reiser G. 2004. Expression of protease-activated receptors (PARs) in OLN-93 oligodendroglial cells and mechanism of PAR-1-induced calcium signaling // *Neuroscience* – V. 126. – № 1. – P. 69–82.

359. Wang Y., Thiagarajan M., Chow N., Singh I., Guo H., Davis T.P., Zlokovic B. V. 2009. Differential neuroprotection and risk for bleeding from activated protein C with varying degrees of anticoagulant activity // *Stroke* – V. 40. – № 5. – P. 1864–69.

360. Wang Y., Zhang Z., Chow N., Davis T.P., Griffin J.H., Chopp M., Zlokovic B. V. 2012. An activated protein C analog with reduced anticoagulant activity extends the therapeutic window of tissue plasminogen activator for ischemic stroke in rodents // *Stroke* – V. 43. – № 9. – P. 2444–49.

361. Weinreich D., Udem B.J., Leal-Cardoso J.H. 1992. Functional effects of mast cell activation in sympathetic ganglia // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – V. 664. – № 1. – P. 293–308.

362. Wilhelm M., Silver R., Silverman A.J. 2005. Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation // *Eur. J. Neurosci.* – V. 22. – № 9. – P. 2238–48.

363. Wisler J.W., Xiao K., Thomsen A.R.B., Lefkowitz R.J. 2014. Recent developments in biased agonism // *Curr. Opin. Cell Biol.* – V. 27. – № 1. – P. 18–24.

364. Xanthos D.N., Sandkühler J. 2014. Neurogenic neuroinflammation: Inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity // *Nat. Rev. Neurosci.* – V. 15. – № 1. – P. 43–53.

365. Xi G., Hua Y., Wu J., Keep R.F. 2002. Increase of brain thrombin concentration in cerebral ischemia // *Stroke* – V. 33. – P. 399.

366. Xu J., Chalimoniuk M., Shu Y., Simonyi A., Sun A.Y., Gonzalez F.A., Weisman G.A., Wood W.G., Sun G.Y. 2003. Prostaglandin E₂ production in astrocytes: Regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* – V. 69. – № 6. – P. 437–48.

367. Xue M., Del Bigio M.R. 2001. Acute tissue damage after injections of thrombin and plasmin into rat striatum // *Stroke* – V. 32. – № 9. – P. 2164–69.

368. Xue M., Thompson P., Kelso I., Jackson C. 2004. Activated protein C stimulates proliferation, migration and wound closure, inhibits apoptosis and upregulates MMP-2 activity in cultured human keratinocytes // *Exp. Cell Res.* – V. 299. – № 1. – P. 119–27.

369. Yamashita M., Nakayama T. 2008. Progress in allergy signal research on mast cells:

Regulation of allergic airway inflammation through toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function // *J. Pharmacol. Sci.* – V. 106. – № 3. – P. 332–35.

370. Yan Z., Li S., Liang Z., Tomić M., Stojilkovic S.S. 2008. The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions // *J. Gen. Physiol.* – V. 132. – № 5. – P. 563–73.

371. Yang C., Mo X., Lv J., Liu X., Yuan M., Dong M., Li L., Luo X., Fan X., Jin Z., Liu Z., Liu J. 2012. Lipopolysaccharide enhances FcεRI-mediated mast cell degranulation by increasing Ca²⁺ entry through store-operated Ca²⁺ channels: implications for lipopolysaccharide exacerbating allergic asthma // *Exp. Physiol.* – V. 97. – № 12. – P. 1315–27.

372. Yang X. V., Banerjee Y., Fernández J.A., Deguchi H., Xu X., Mosnier L.O., Urbanus R.T., De Groot P.G., White-Adams T.C., McCarty O.J.T., Griffin J.H. 2009. Activated protein C ligation of ApoER2 (LRP8) causes Dab1-dependent signaling in U937 cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – V. 106. – № 1. – P. 274–79.

373. Yasuoka S., Kawanokuchi J., Parajuli B., Jin S., Doi Y., Noda M., Sonobe Y., Takeuchi H., Mizuno T., Suzumura A. 2011. Production and functions of IL-33 in the central nervous system // *Brain Res.* – V. 1385. – P. 8–17.

374. Yoon H., Radulovic M., Drucker K.L., Wu J., Scarisbrick I.A. 2015. The thrombin receptor is a critical extracellular switch controlling myelination // *Glia* – V. 63. – № 5. – P. 846–59.

375. Yoon H., Radulovic M., Wu J., Blaber S.I., Blaber M., Fehlings M.G., Scarisbrick I.A. 2013. Kallikrein 6 signals through PAR1 and PAR2 to promote neuron injury and exacerbate glutamate neurotoxicity // *J. Neurochem.* – V. 127. – № 2. – P. 283–98.

376. Zhang H., Yang H., Shaoheng H. 2010. TNF increases expression of IL-4 and PARs in mast cells // *Cell. Physiol. Biochem.* – V. 26. – № 3. – P. 327–36.

377. Zhang K., Wu S., Li Z., Zhou J. 2017. MicroRNA-211/BDNF axis regulates LPS-induced proliferation of normal human astrocyte through PI3K/AKT pathway // *Biosci. Rep.* – V. 37. – № 4.

378. Zhang S., Dong H., Zhang X., Li N., Sun J., Qian Y. 2016. Cerebral mast cells contribute to postoperative cognitive dysfunction by promoting blood brain barrier disruption // *Behav. Brain Res.* – V. 298. – P. 158–166.

379. Zhang S., Zeng X., Yang H., Hu G., He S. 2012. Mast cell tryptase induces microglia activation via protease-activated receptor 2 signaling // *Cell. Physiol. Biochem.* – V. 29. – № 5-6. – P. 931–940.

380. Zheng J., Wei C.C., Hase N., Shi K., Killingsworth C.R., Litovsky S.H., Powell P.C., Kobayashi T., Ferrario C.M., Rab A., Aban I., Collawn J.F., Dell'Italia L.J. 2014. Chymase mediates injury and mitochondrial damage in cardiomyocytes during acute ischemia/reperfusion

in the dog // PLoS One – V. 9. – № 4. – P. e94732.

381. Zhong Z., Ilieva H., Hallagan L., Bell R., Singh I., Paquette N., Thiyagarajan M., Deane R., Fernandez J.A., Lane S., Zlokovic A.B., Liu T., Griffin J.H., Chow N., Castellino F.J., Stojanovic K., Cleveland D.W., Zlokovic B. V. 2009. Activated protein C therapy slows ALS-like disease in mice by transcriptionally inhibiting SOD1 in motor neurons and microglia cells // J. Clin. Invest. – V. 119. – № 11. – P. 3437–3449.

382. Zhu W., Zheng H., Shao X., Wang W., Yao Q., Li Z. 2010. Excitotoxicity of TNF α derived from KA activated microglia on hippocampal neurons *in vitro* and *in vivo* // J. Neurochem. – V. 114. – № 2. – P. 386–396.

383. Zlokovic B.V. 2011. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders // Nat. Rev. Neurosci. – V. 12. – № 12. – P. 723.

384. Zlokovic B.V., Griffin J.H. 2011. Cytoprotective protein C pathways and implications for stroke and neurological disorders // Trends Neurosci. – V. 34. – № 4. – P. 198–209.

385. Zou J.Y., Crews F.T. 2005. TNF α potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: Neuroprotection by NF κ B inhibition // Brain Res. – V. 1034. – № 1–2. – P. 11–24.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность д.б.н., доценту кафедры физиологии человека и животных Горбачевой Любови Руфэлевне за чуткое руководство, помощь и поддержку на всех этапах исследования; д.б.н. профессору кафедры физиологии человека и животных Балезиной Ольге Петровне за внимательное прочтение, рецензирование работы и ценные советы и замечания; д.б.н. заведующему лабораторией нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей», Минздрава России Сурина Александру Михайловичу за ценные рекомендации, сделанные в ходе обсуждения результатов.

Автор глубоко благодарен к.б.н., доценту кафедры физиологии человека и животных Гусевой Александре Александровне за помощь в анализе результатов.

Автор выражает глубокую признательность заведующему кафедрой физиологии человека и животных МГУ д.б.н., профессору Каменскому Андрею Александровичу и заведующему кафедрой физиологии РНИМУ д.м.н., профессору Камкину Андрею Глебовичу, а также всем сотрудникам этих кафедр за положительное отношение и всестороннюю поддержку.

Автор выражает благодарность Цурикову Сергею Михайловичу за техническую помощь и поддержку.

Автор сердечно благодарен родным, близким и друзьям, в особенности Бабкиной Ольге Анатольевне, Абрамичевой Полине Александровне и Швецовой Анастасии Алексеевне за психологическую поддержку и терпение.