

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Б.И.Игорев

Бабкина Ирина Игоревна

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

Специальность 03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и на кафедре физиологии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный

руководитель: **Горбачева Любовь Руфэлевна**
доктор биологических наук, доцент

**Официальные
оппоненты:**

Кошелев Владимир Борисович
доктор биологических наук, профессор,
МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет
фундаментальной медицины, заведующий кафедрой
физиологии и общей патологии

Степаничев Михаил Юрьевич
доктор биологических наук, ФГБУН «Институт высшей
нервной деятельности и нейрофизиологии» РАН,
лаборатория функциональной биохимии нервной
системы, ведущий научный сотрудник

Сергеева Марина Глебовна
доктор химических наук, МГУ имени М.В. Ломоносова,
Научно-исследовательский институт физико-химической
биологии имени А.Н. Белозерского, отдел биокинетики,
ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится 9 ноября 2020 года в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, ауд. М-1.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «Истина»: <https://istina.msu.ru/dissertations/324210370/>

Автореферат разослан «6» октября 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.03.06.
доктор биологических наук



Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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]. Развитие травматических, ишемических, метаболических, инфекционных, токсических, неопластических и нейродегенеративных повреждений мозга сопряжено с запуском нейровоспаления в центральной нервной системе (ЦНС) [Solleiro-Villavicencio, Rivas-Arancibia, 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].

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. 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).

Тромбин и АПС – основные протеазы гемостаза, выступают эндогенными специфическими агонистами ПАР-1. 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 – ПАР-1 – может быть обусловлено смещённым агонизмом «biased agonism». В результате, внутриклеточная сигнализация, запускаемая АПС и тромбином через ПАР-1, имеет разнонаправленный характер – противовоспалительный в случае АПС и провоспалительный при канонической активации рецептора тромбином.

Таким образом, ключевые протеазы гемостаза и ПАР могут вовлекаться в процессы нейродегенерации как участники нейровоспаления при ишемическом повреждении мозга и при ряде нейропатологий. В связи с этим, исследование механизмов участия агонистов ПАР-1 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 ПАР – 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 ПАР-1 на развитие нейровоспаления *in vitro*.

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

1. Изучить особенности влияния канонических и неканонических агонистов ПАР-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 ПАР-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 ПАР-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 тучных клеток (ТК) на первичную культуру нейронов осуществляли путем их совместного сокультивирования. Исследование взаимного влияния астроцитов и ТК в условиях 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.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 155 страницах и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список цитируемой литературы (содержит 385 источников). Работа иллюстрирована 66 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали самцов беспородных крыс весом 300 – 400 г, новорожденных самцов крыс линии Wistar, линию клеток RBL-2H3 [Eccleston et al., 1973; Kulczycki et al., 1974].

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.

Получение и ведение клеточных культур крыс. Работа проводилась на тучных клетках, полученных из перитонеальной полости крыс [Uvnäs, Thon, 1959; в модификации]; культивируемых аналогов тучных клеток – клетках линии RBL-2H3, предоставленных ККК УНУ ИБР РАН, первичных культурах гиппокампальных нейронов [Gorbacheva et al., 2006] и астроцитов [Ivanova et al., 2014], полученных из мозга новорожденных крыс.

Биохимические методы оценки активации и выживаемости клеток. В качестве критерия активации ТК использовали уровень секреции гистамина и β -гексозаминидазы (БГА) [Shore et al., 1959; в модификации], [Schwartz et al., 1979; в модификации].

Уровень высвобождения IL-6 и TNF α клетками исследовали с помощью ELISA в соответствии с инструкциями производителя (Abcam, Великобритания).

Для оценки выживаемости клеток использованы: МТТ-тест (Molecular Probes, США), WST-1 (Promega, США), а для оценки гибели – ЛДГ-тест (Promega, США). Для морфологической оценки гибели нейронов и клеток линии RBL-2H3 использовали флуоресцентные красители: Hoechst 33342 (апоптоз), SYTO-13 (живые клетки) и гомодимер этидия бромида (некроз).

Иммуноцитохимическое окрашивание. Для оценки F-актина клетки окрашивали фаллоидином с визуализацией ядер SYTO 59 или DAPI. Анализ флуоресценции осуществляли на конфокальном микроскопе LSM 700 (ZEISS, Германия).

Экспрессию ПАР-1 и ЭРПС на клетках оценивали иммуноцитохимически с использованием антител к ПАР-1 (АТАР2), ЭРПС (Р20) и с помощью вестерн иммуно-блоттинга.

[Ca²⁺]_i измеряли методом флуоресцентной микроскопии с помощью высокоаффинных Ca²⁺ индикаторов Fura-2 и Fluo-4 (Molecular Probes, США) [Grynkiiewicz et al., 1985].

Сокультивирование гиппокампальных нейронов и перитонеальных тучных клеток. Суспензию активированных ЛПС (1 мкг/мл) или TNF α (50 нг/мл) 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 ч. 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) за 30 мин до последующей обработки клеток.

Кокультивирование астроцитов и клеток линии RBL-2H3. Кокультивирование осуществляли с помощью системы Transwell. ТК активировали в течение 6 часов в присутствии ЛПС (1 мкг/мл). Далее для анализа содержания IL-6 отбирали супернатант и лизировали клетки в соответствии со стандартным протоколом. Предобработку ТК протектором АП9 (100 мкМ) проводили за 15 мин до активации.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ данных проводился в программе GraphPad Prism 8 с помощью One-way ANOVA. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднего \pm стандартной ошибки среднего, n – число независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. ВЛИЯНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА КЛЕТКИ-УЧАСТНИКИ ВОСПАЛЕНИЯ: ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ, АСТРОЦИТЫ И НЕЙРОНЫ

На первом этапе работы мы использовали специфические (TNF α , ЛПС) и неспецифические (A23198+PMA) индукторы для провоспалительной активации ТК. Эта активация ТК сопровождалась увеличением секреции, дезорганизацией кальциевого гомеостаза и актинового цитоскелета и снижением выживаемости. Провоспалительная активация астроцитов ЛПС повышала их пролиферативную активность. Известно, что 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. В экспериментах с первичной культурой астроцитов аппликация высоких концентраций АТФ (10 мМ) вызывала клеточную гибель, низкие концентрации АТФ (0,1 и 1 мМ) повышали клеточную пролиферацию. Основной медиатор ТК – гистамин – способствовал росту внутриклеточной концентрации кальция в астроцитах. Высокие концентрации АТФ и глутамата, регистрируемые во внеклеточном пространстве мозга при травмах, ишемии и нейродегенеративных заболеваниях, вызывали гибель культивируемых нейронов. Подобно астроцитам, активация нейронов гистамином вызывала транзиторный рост внутриклеточного кальция.

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

2.1. Особенности влияния агонистов ПАР-1 на тучные клетки

Воспаление является одним из ключевых процессов в организме, сопровождающих разного рода повреждения и патологии, поэтому терапия

заболеваний и травматических повреждений требует включения противовоспалительных компонентов. В последнее время накоплено существенное количество фактов, указывающих на ПАР-1 опосредованные противовоспалительные свойства сериновой протеазы гемостаза – АПС [Esmon, 2004; Howard, Cohen, 2016]. Активация ПАР может осуществляться и посредством пептидов-агонистов, аналогичных неканоническому «привязанному» лиганду, освобождаемому АПС [Mosnier et al., 2007]. В связи с этим, 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.

Нами впервые показана экспрессия ПАР-1 и эндотелиального рецептора протеина С (ЭРПС) на клетках линии RBL-2H3 (Рис. 1) и подтверждена их экспрессия на первичных культурах астроцитов и нейронов. Это свидетельствует о возможности запуска ПАР-1 и ЭРПС-зависимых клеточных каскадов, активируемых АПС и АП9.

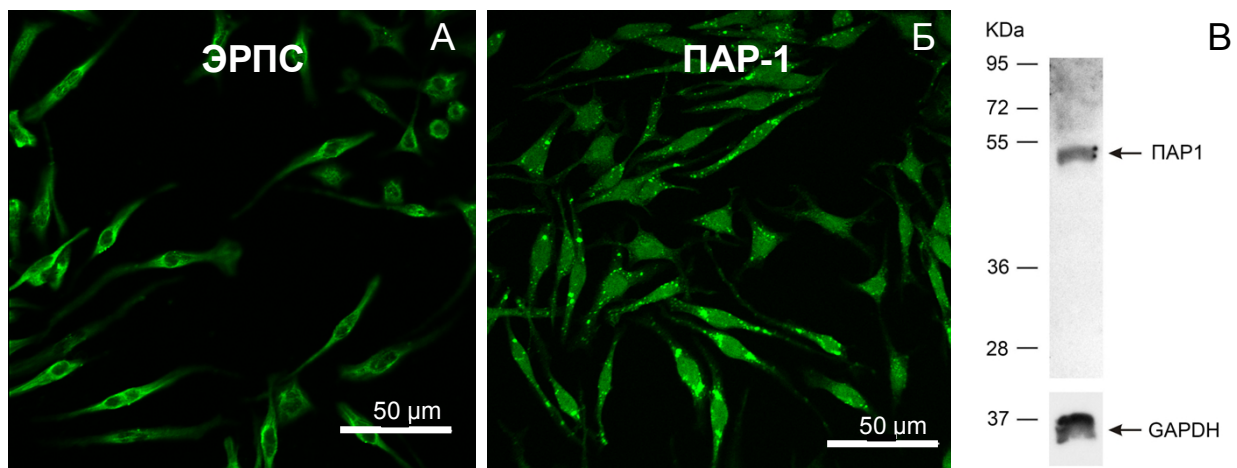


Рисунок 1. Экспрессия ЭРПС и ПАР-1 в клетках линии RBL-2H3. Репрезентативные данные иммуоцитохимического окрашивания (А, Б) и вестерн-блоттинга (В). ПАР-1 (АТАР2), ЭРПС (Р20), GAPDH – анти-глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа антитела.

2.1.1. Влияние агонистов ПАР-1 на секрецию тучных клеток

Активация ТК иммунными и неиммунными активаторами, ведет к высвобождению как предварительно сформированных, так и синтезированных *de novo* медиаторов, включая цитокины и другие воспалительные медиаторы, активирующие факторы транскрипции. Предварительная 15-минутная инкубация ТК с неканоническими агонистами ПАР-1 [АПС (10нМ) и АП9 (10мкМ)] достоверно снижает секрецию гистамина, вызванную активацией TNF α и ЛПС (Рис. 2А).

Антивоспалительные эффекты АПС ранее были продемонстрированы в

нашей лаборатории при исследовании секреторной активности перитонеальных ТК, активированных острым воспалением, кроме того, АПС ускорял репаративные процессы при заживлении экспериментальной язвы желудка у крыс (*in vivo*) [Макарова и др, 2006; Русанова и др, 2009].

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 *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; Strigrow et al., 2000; Jiang et al., 2002; Горбачева и др., 2006].

Нами показано, что тромбин в концентрации 10 нМ, в отличие от 50 нМ, подобно синтетическому пептиду АП9, снижал высвобождение β -гексозаминидазы (БГА) в клетках, активированных кальциевым ионофором А23187 (Рис. 2Б).

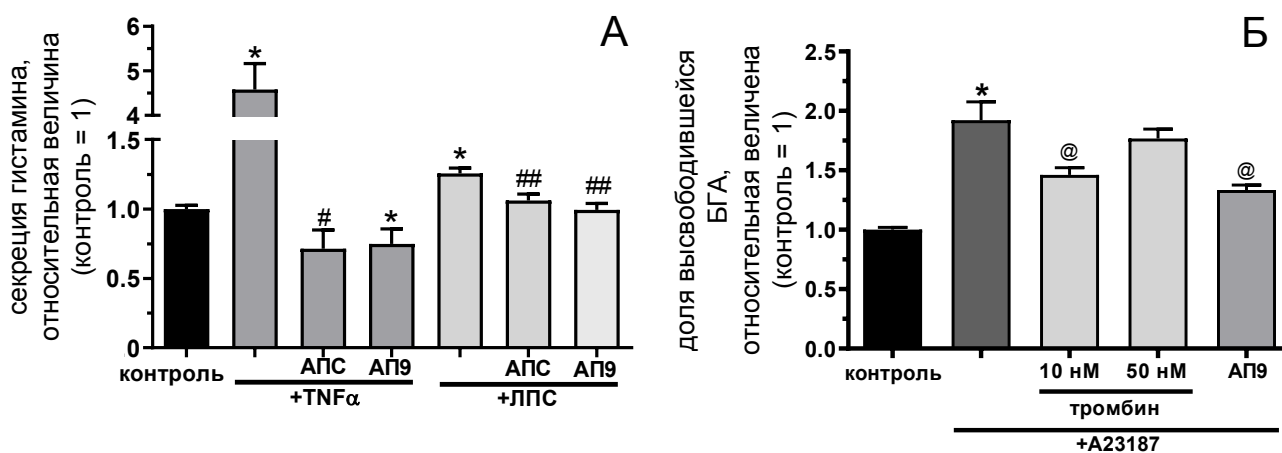


Рисунок 2. Влияние неканонических [АПС (10 нМ) и АП9 (10 мкМ)] и канонического [тромбин (10 и 50 нМ)] агонистов ПАР-1 на секрецию гистамина (А) и β -гексозаминидазы (БГА) (Б) тучными клетками крыс, активированными провоспалительными факторами, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с группой TNF α (50 нг/мл), ## $p < 0,1$ по сравнению с группой ЛПС (1 мкг/мл), @ $p < 0,05$ по сравнению с группой А23187 (50 нМ).

2.1.2. Влияние агонистов ПАР-1 на выживаемость тучных клеток

Высокая степень дегрануляции ТК может приводить к их гибели. В данной работе предварительная аппликация и АПС, и АП9 на культивируемые ТК повышала число живых клеток, активированных токсином ЛПС, приближая данный показатель к контрольным значениям (Рис. 3А).

Совместное воздействие кальциевого ионофора А23187 и форболового

эфира (РМА) – активатора протеинкиназы С 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. При этом тромбин не защищал клетки от действия А23187 и РМА (Рис. 3Б).

Полученные нами данные согласуются с ранее опубликованными данными о том, что ПАР-1-опосредованное действие АПС запускает внутриклеточные сигналы по механизму «смещенного агонизма» неканоническим путем через β -аррестины [Russo et al., 2009; Mosnier et al., 2012]. В нашей лаборатории также ранее продемонстрировано участие ПАР-1 в защитном действии АПС на ТК [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].

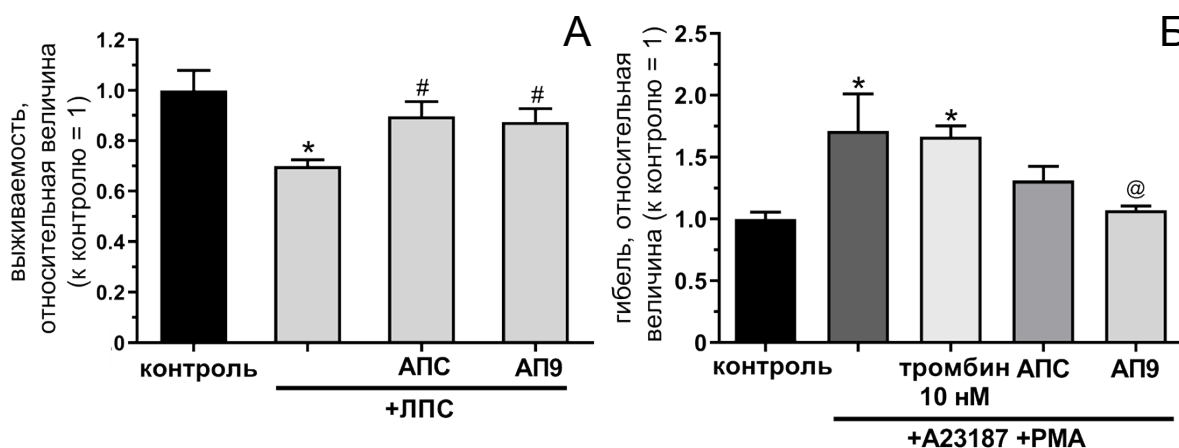


Рисунок 3. Влияние неканонических [АПС (10 нМ) и АП9 (10 мкМ)] и канонического [тромбин (10 нМ)] агонистов ПАР-1 на выживаемость (МТТ-тест) (А) и гибель (высвобождение лактатдегидрогеназы) (Б) тучных клеток крысы, активированных провоспалительными факторами, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с группой ЛПС (1 мкг/мл), @ $p < 0,05$ по сравнению с группой А23187 (50 нМ) + РМА (50 нМ).

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

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

В данной работе ЛПС и тромбин вызывали транзиторное возрастание свободного цитозольного Ca^{2+} в RBL-2H3. На рисунке 4 видно, что вызванное ЛПС изменения внутриклеточного кальция отменяется предварительной инкубацией клеток с тромбином. Вероятно, это связано с трансдукцией

сигнальных путей, запускаемых тромбином и активируемых ЛПС (Рис. 4, 5).

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 (Рис. 6). 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].

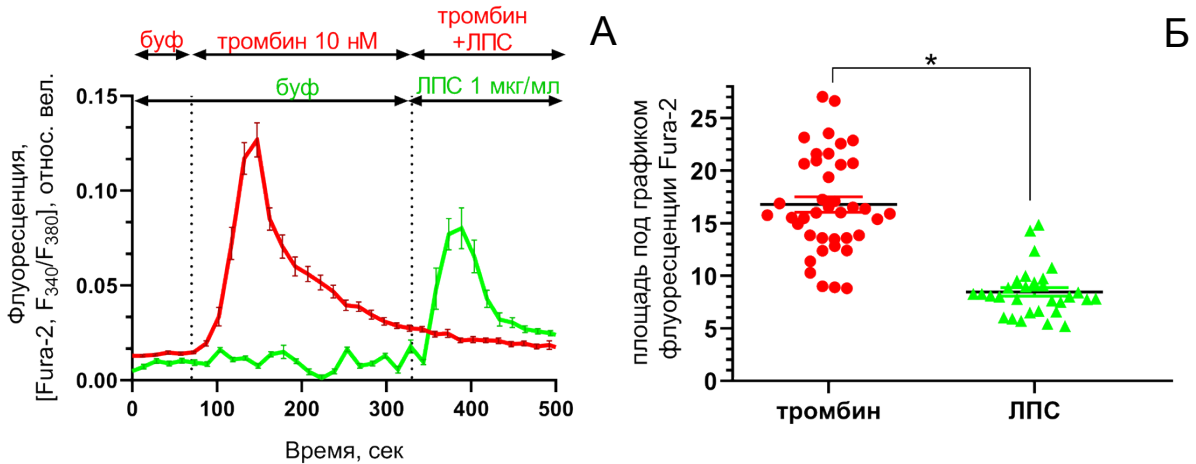


Рисунок 4. Влияние тромбина (10 нМ) и ЛПС (1 мкг/мл) на изменение внутриклеточной концентрации кальция в культуре клеток линии RBL-2H3 (А). Площадь под графиком Ca^{2+} -зависимой флуоресценции Fura-2 на клетках линии RBL-2H3 (Б). * $p < 0,05$ по сравнению с тромбином.

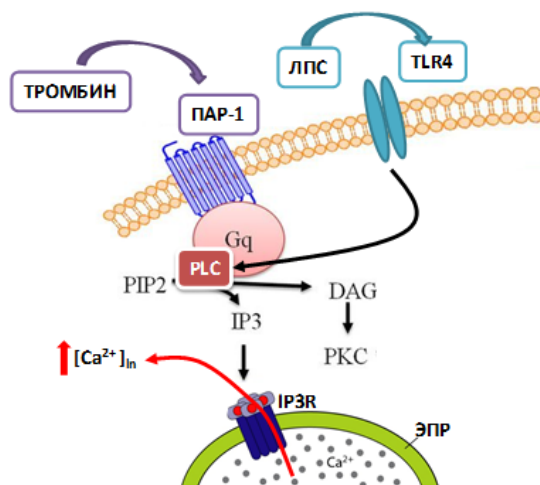


Рисунок 5. Схема трансдукции сигнальных путей, запускаемых тромбином и ЛПС.

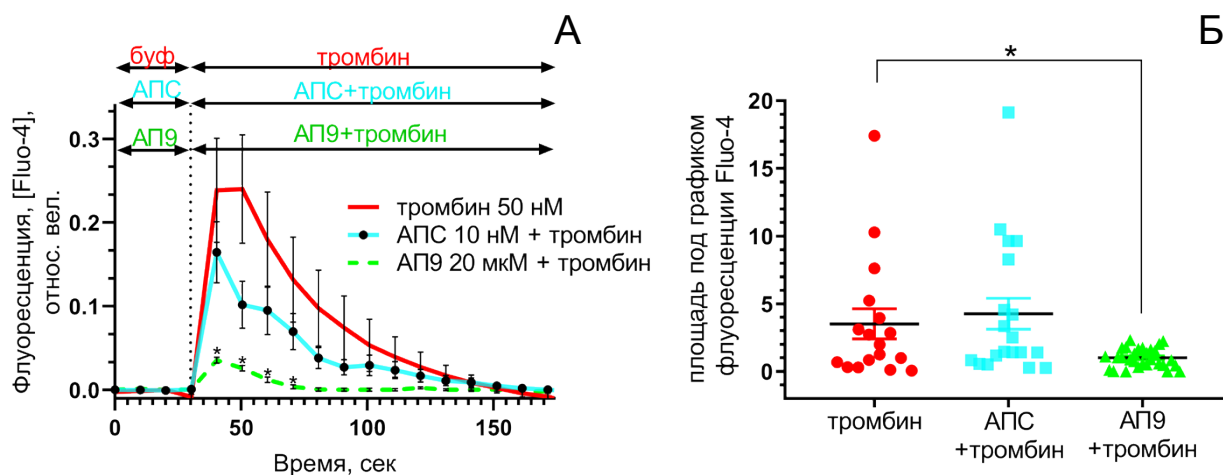


Рисунок 6. Влияние АПС (10 нМ) и АП9 (20 мкМ) на изменение внутриклеточной концентрации кальция в культуре клеток линии RBL-2H3, при активации их тромбином (50 нМ) (А). Площадь под графиком Ca^{2+} -зависимой флуоресценции Fluo-4 на клетках линии RBL-2H3 (Б). * $p < 0,05$ по сравнению с тромбином.

2.1.4. 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].

Установлено, что предобработка клеток АП9, АПС, а также тромбином (10 нМ) перед их активацией ЛПС стабилизировала цитоскелет клеток до уровня контрольной группы (Рис. 7) Ранее феномен стабилизации цитоскелета, индуцируемый АПС, был описан в активированных эндотелиальных клетках [Komarova et al., 2007]. Возможный механизм подобного эффекта показан Мознером с коллегами: АПС запускает активацию Ras1 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 (Рис. 7).

2.2. Особенности влияния агонистов ПАР-1 на астроциты

2.2.1. Влияние агонистов ПАР-1 на выживаемость астроцитов при их активации провоспалительными факторами

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.

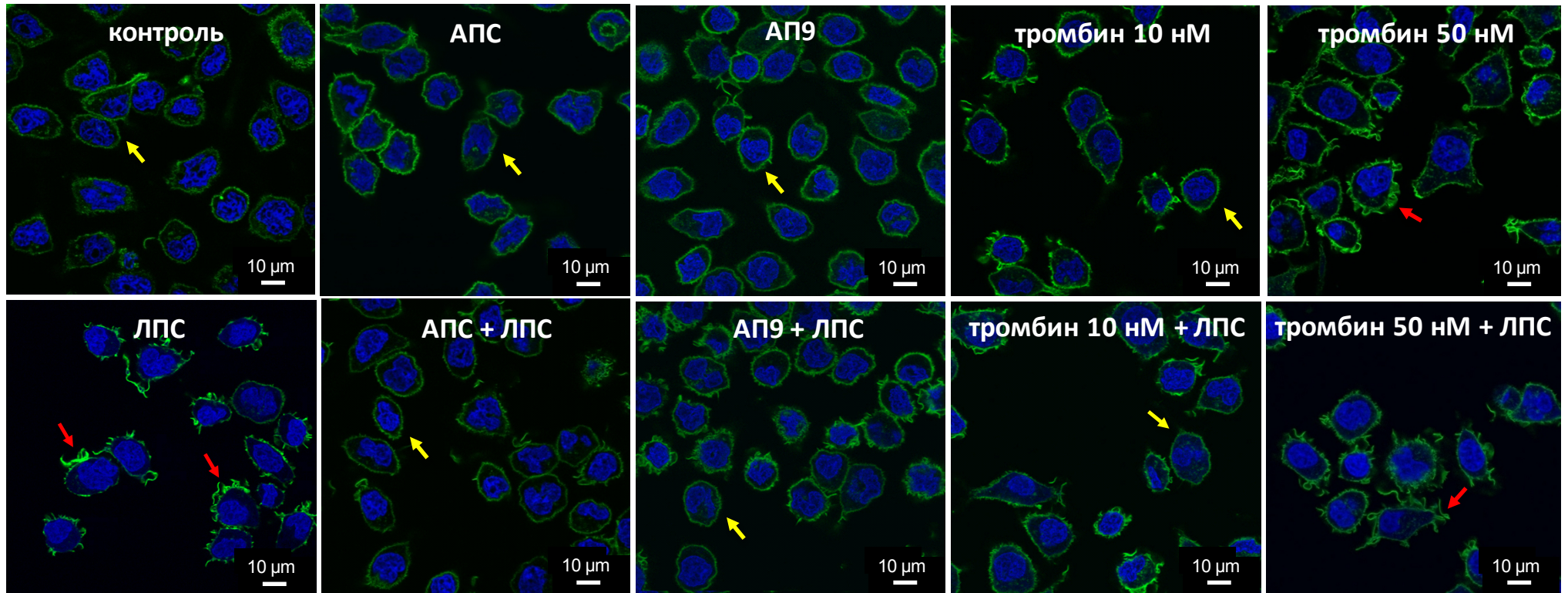


Рисунок 7. Влияние агонистов ПАР-1 на изменение актинового цитоскелета клеток линии RBL-2H3, активированных ЛПС. Детекцию F-актина осуществляли с использованием фаллоидина (зелёная флуоресценция). Синяя флуоресценция – DAPI – ДНК-тропный краситель.

Внеклеточный АТФ играет важную роль в координации активности астроцитов и нейронов, а aberrantная сигнализация связана с нейродегенеративными заболеваниями [Muller, Taylor, 2017].

На первичной культуре астроцитов нами показано, что 48-часовое воздействие бензоилАТФ в концентрации 100 и 300 μM не влияло, а в концентрации 500 μM снижало выживаемость астроцитов по сравнению с контрольной группой. Предварительная аппликация АПС (10 нМ), но не тромбин (10 нМ), за 15 минут до воздействия АТФ повышала выживаемость клеток в первичной культуре астроцитов (Рис. 8).

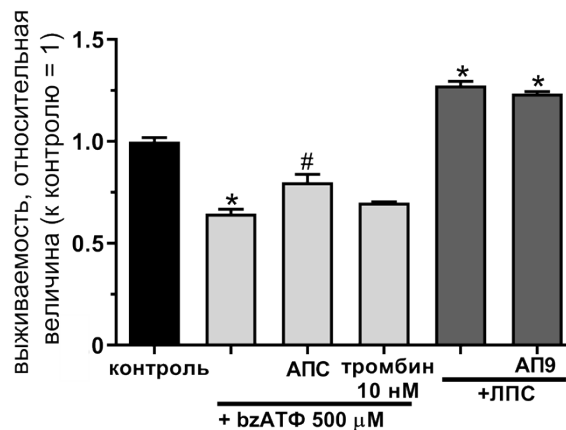


Рисунок 8. Влияние агонистов ПАР-1 на выживаемость бензоилАТФ (bzATФ) активированных астроцитов. * $p < 0,05$ – по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ – по сравнению с группой bzATФ 500 μM .

2.2.2. Влияние агонистов ПАР-1 на секреторную активность астроцитов в условии их активации провоспалительными факторами

В последние годы тромбин все чаще рассматривается как провоспалительный агент, стимулирующий высвобождение провоспалительных медиаторов клетками. 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 также модулируя выживаемость как нейронов, так и глии [Penkowa et al., 2003; Kucher, Neary, 2005; Mosnier et al., 2014].

Активация астроцитов сопровождается секрецией цитокинов, таких как TNF α , IL-1 β и IL-6 [Ponath et al., 2018]. В данной работе было установлено, что тромбин 50 нМ повышал в 2 раза высвобождение TNF α и IL-6. В тоже время предварительная инкубация клеток с АПС или АП9 способствовала снижению секреции провоспалительного цитокина TNF α . Однако, АП9 не купировал тромбин-вызванную активацию секреции IL-6 астроцитами (Рис. 9).

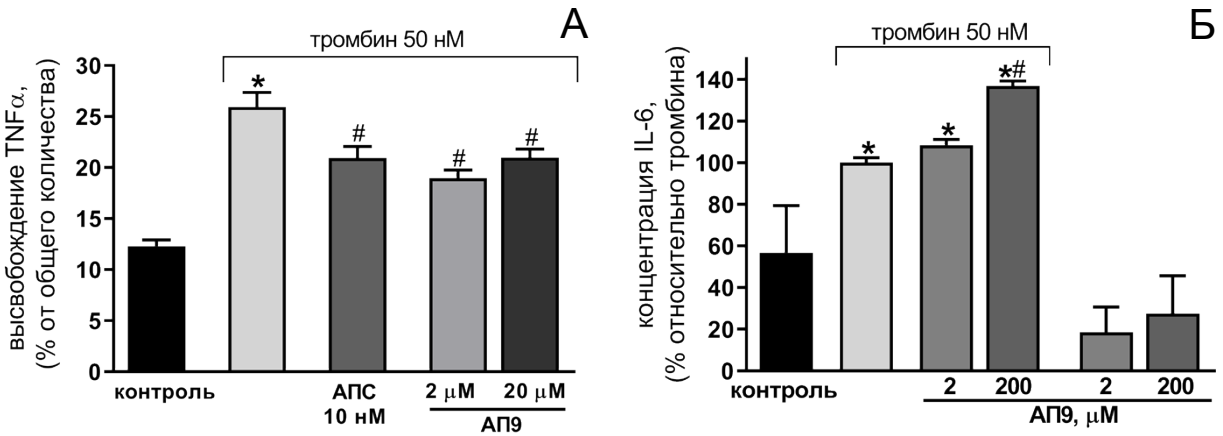


Рисунок 9. Влияние АПС и АП9 на тромбин-вызванное высвобождение TNF α астроцитами крыс через 24 часа после воздействия (А); влияние АП9 на высвобождение IL-6 астроцитами крыс, вызванного тромбином, через 12 часа после воздействия (Б). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с тромбином 50 нМ

2.2.3. Влияние агонистов ПАР-1 на кальциевый гомеостаз астроцитов при их активации провоспалительными факторами

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

Ca²⁺-ответ астроцитов на гистамин, так же как и нейронов, имеет дозозависимый характер [Patel et al., 2016] и двухфазный профиль. 10-минутная инкубация астроцитов с АП9 приводит к изменению кальциевого ответа астроцитов: наблюдается уменьшение амплитуды Ca²⁺-ответа на гистамин и смена двухфазного профиля ответа на однофазный (Рис. 10).

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.

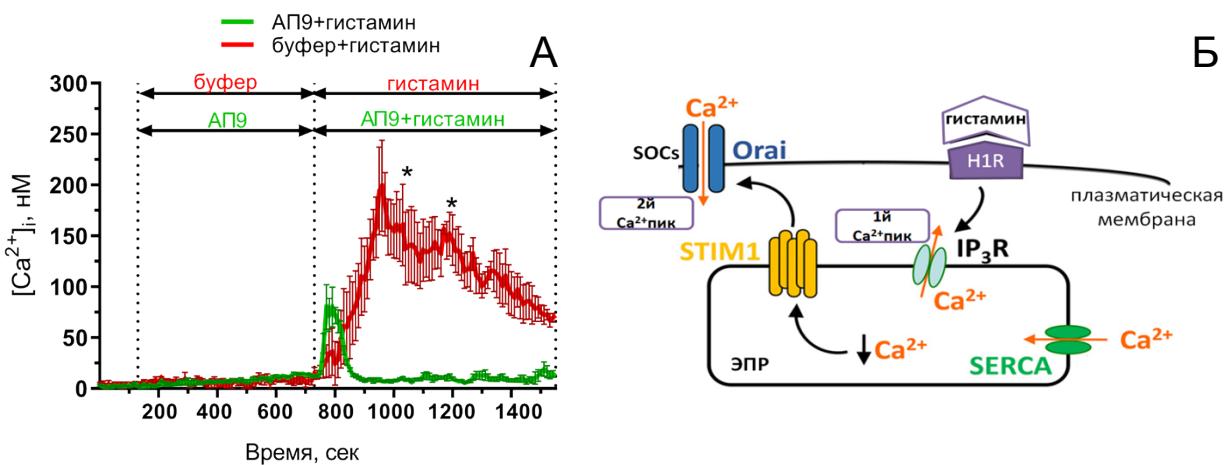


Рисунок 10. Влияние АП9 (100 мкМ) на вызванное гистамином (100 мкМ) изменение внутриклеточной концентрации кальция ([Ca²⁺]_i) в культуре астроцитов (А). Сигнальный каскад, приводящий к росту внутриклеточной концентрации кальция (Б). * $p < 0,05$ по сравнению с группой, где клетки не предобработывали АП9.

2.3. Особенности влияния агонистов ПАР-1 на нейроны

2.3.1. Влияние агонистов ПАР-1 на выживаемость нейронов при их активации провоспалительными факторами

Известно, что чрезмерная активация нейронов может приводить к кальциевой перегрузке и развитию глутаматной эксайтотоксичности. Нами установлено, что предварительная аппликация пептида АП9 и АПС достоверно повышает число живых клеток в условии токсичности, вызванной глутаматом (Рис. 11).

Для исследования рецепторного механизма протекторного действия агонистов ПАР-1 – АПС и АП9 нами использован блокатор ПАР-1 – SCH79797. Установлено, что блокада ПАР-1 отменяет протекторное действие АПС и АП9 при глутаматной эксайтотоксичности (Рис. 11).

Токсический эффект глутамата опосредуется через 2 основных класса ионотропных рецепторов – NMDA и AMPA. Каков вклад NMDA рецепторов в глутамат-опосредованную кальциевую дизрегуляцию мы исследовали с помощью селективного агониста NMDA-рецепторов – N-метил-D-аспарагиновой кислоты (300 μ M). Данная концентрация NMDA вызывала развитие устойчивого Ca^{2+} -ответа у нейронов. При добавлении бескальциевого раствора к клеткам с течением времени происходило восстановление базального уровня кальция. Использование специфического антагониста NMDA рецепторов МК-801 показало, что блокада этого типа рецепторов снижает гибель нейронов при глутаматной токсичности.

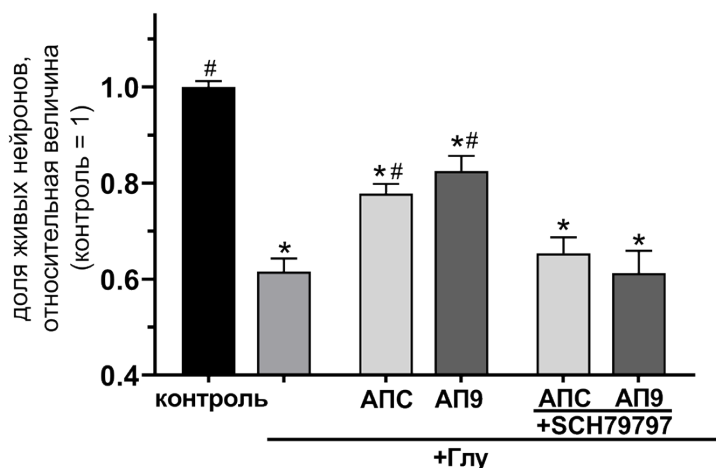


Рисунок 11. Влияние АП9 (20 μ M) и АПС (10 нM) на выживаемость нейронов при глутаматной эксайтотоксичности (Глу) (100 μ M). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с глутаматом.

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 (Рис. 12 и 13).

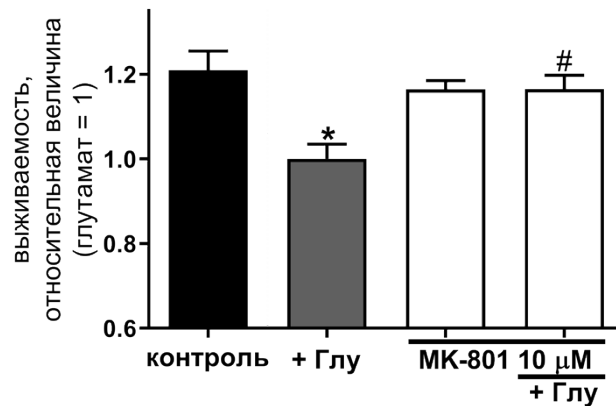


Рисунок 12. Влияние глутамата (100 мкМ) (Глу) на фоне действия специфического антагониста NMDA рецепторов (МК-801) на выживаемость нейронов. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем. # $p < 0,05$ по сравнению с глутаматом.

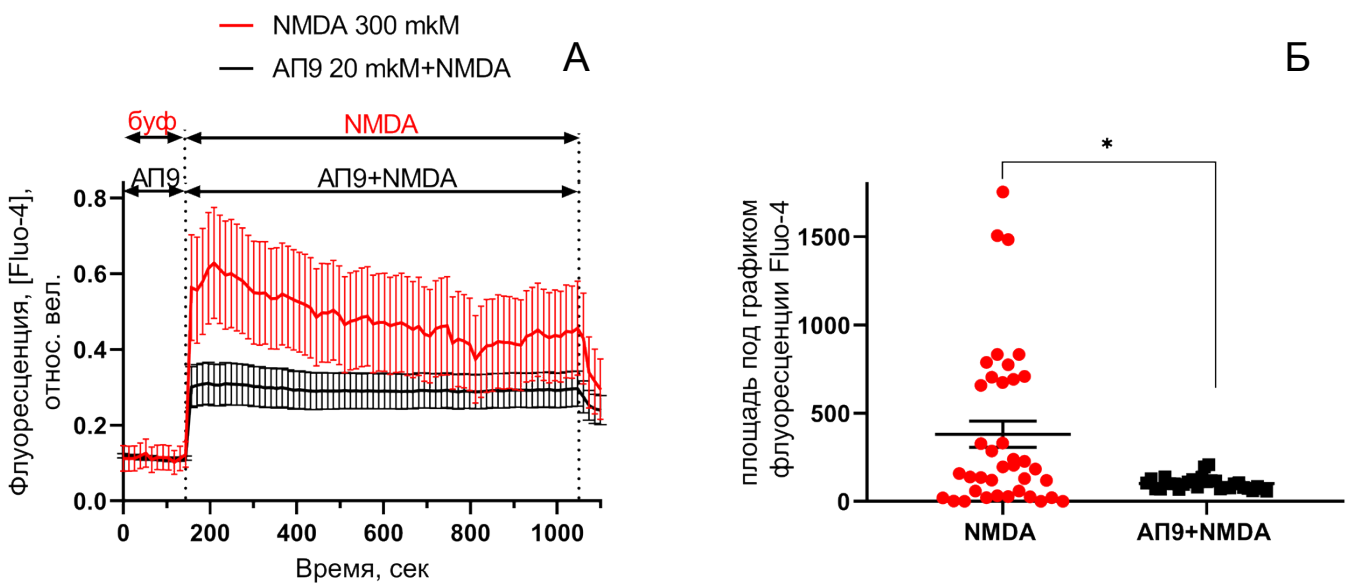


Рисунок 13. Влияние пептида АП9 (20 мкМ) на изменение внутриклеточной концентрации кальция в культуре гиппокампальных нейронов (А). Площадь под графиком Ca^{2+} -зависимой флуоресценции Fluo-4 на культуре гиппокампальных нейронов (Б). * $p < 0,05$ по сравнению с NMDA.

АТФ является трансмисмиттером во многих типах нейронов, что, вероятно, отражает раннее эволюционное появление пуринергической сигнальной системы [Burnstock, 1996; 2004]. 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. Используя морфологический метод оценки выживаемости нейронов в условиях токсичности, вызванной АТФ, было выявлено протекторное действие АП9 на фоне 5 мМ АТФ. Пептид АП9 достоверно снижал долю апоптотических клеток (Рис. 14).

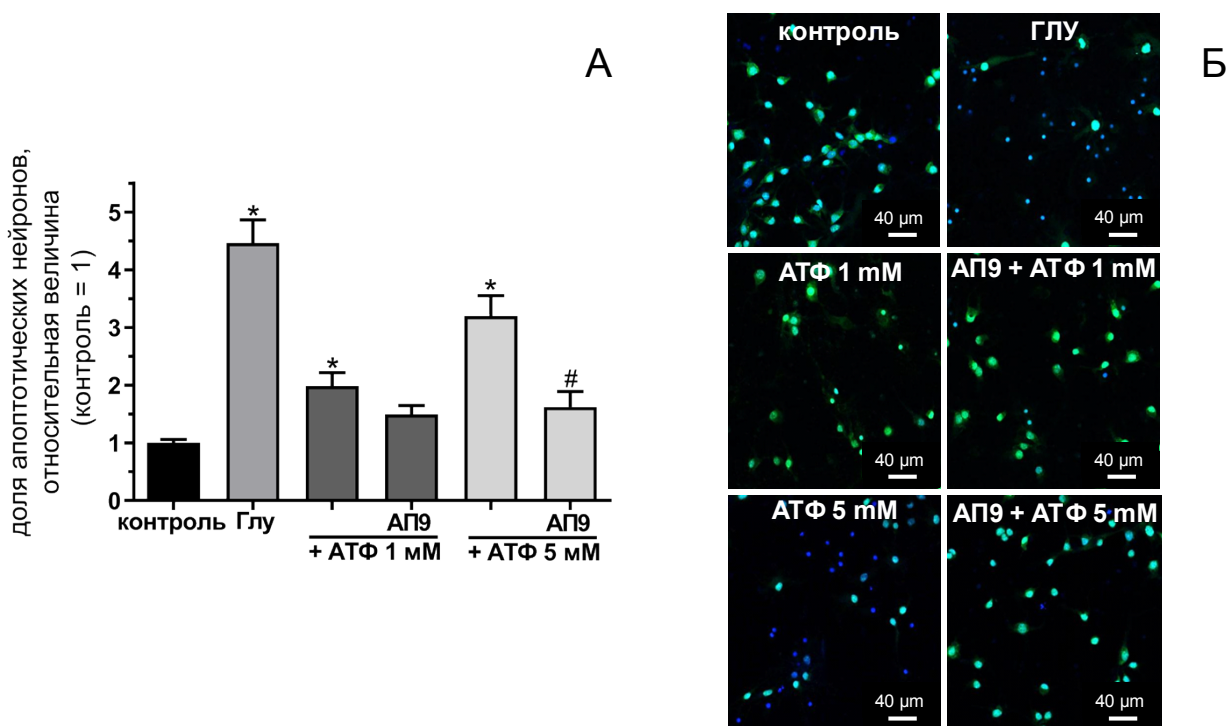


Рисунок 14. Влияние АП9 на выживаемость нейронов, активированных токсическим действием АТФ. Морфологическая оценка выживаемости нейронов (А). * $p < 0,05$ – относительно контроля. # $p < 0,05$ – относительно группы с АТФ 5 мМ. $n \geq 3$. Микрофотографии нейронов, окрашенных Syto-13 (зелёная флуоресценция) и Hoechst 33342 (синяя флуоресценция) (Б).

2.3.2. Влияние агонистов ПАР-1 на кальциевый гомеостаз нейронов при 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 ТК – гистамина. Как видно на рисунке 15, гистамин (100 мкМ) вызывает 2-х фазное изменение $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах. Предобработка гиппокампальных нейронов АП9 в концентрации 100 мкМ за 10 минут до их активации гистамином приводила к сужению профиля Ca^{2+} -ответа и уменьшению амплитуды второго пика (Рис. 15).

3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК ПРИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИИ

Процессы, развивающиеся при повреждениях мозга, характеризуются вовлечением разных типов клеток и 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.

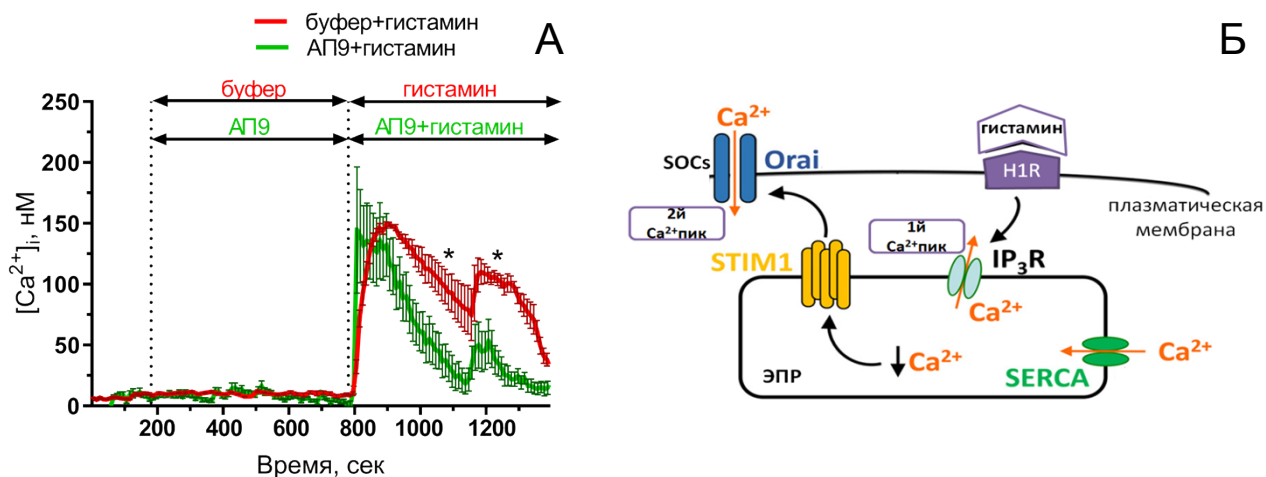


Рисунок 15. Влияние синтетического АП9 (100 мкМ) и гистамина (100 мкМ) на концентрацию внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в гиппокампальных нейронах (А). Сигнальный каскад, приводящий к росту внутриклеточной концентрации кальция (Б). * $p < 0,05$ по сравнению с группой, где клетки не преобразовывали АП9.

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 связи с этим, в следующей серии экспериментов мы оценили влияние активированных эндогенным $TNF\alpha$ и экзогенным ЛПС провоспалительными факторами ТК на культуру гиппокампальных нейронов при их совместном инкубировании. Нами показано, что 30-минутная инкубация нейронов с суспензией активированных ТК приводит к значительной гибели нейронов по сравнению с контрольной группой, где нейроны выдерживали с неактивированными ТК. Далее нами обнаружено, что предобработка ТК перед активацией с АПС (10 нМ) или с АП9 (10 мкМ) приводит к снижению уровня гибели нейронов. Экспериментами по блокированию ПАР-1 как ТК, так и гиппокампальных нейронов, продемонстрировали отмену протекторного действия АП9 (Рис. 16).

3.2. Взаимодействие тучных клеток и астроцитов в модели нейровоспаления

Критерием провоспалительной активации клеток при совместном культивировании RBL-2H3 и астроцитов, служило высвобождение 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. Предварительная обработка клеток линии RBL-2H3 синтетическим пептидом АП9 (100 мкМ) существенно снижала уровень секреции IL-6 клетками при совместном культивировании астроцитов и RBL-2H3 (Рис. 17). Полученные данные свидетельствуют об противовоспалительном действии неканонического пептида-агониста ПАР-1 (АП9) на сокультивируемые астроциты и RBL-2H3 в условии токсического воздействия ЛПС.

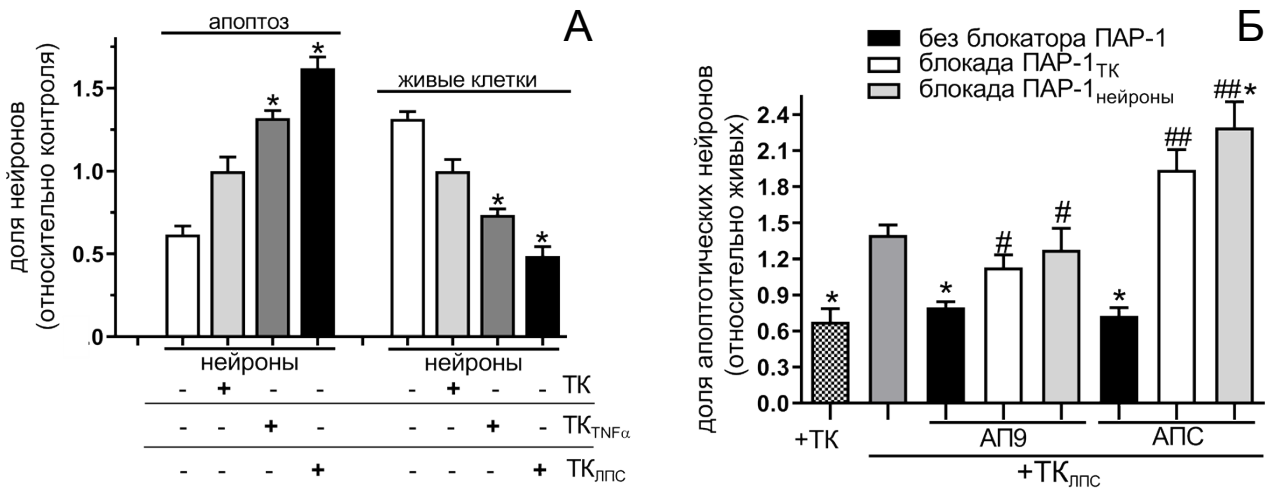


Рисунок 16. Влияние тучных клеток (ТК), активированных $TNF\alpha$ (ТК_{TNFα}) и ЛПС (ТК_{ЛПС}), на выживаемость гиппокампальных нейронов при их совместном культивировании (А). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем (группой, где гиппокампальные нейроны сокультивировали с неактивированными ТК (ТК)). Влияние блокады ПАР-1 рецепторов ТК и нейронов на протекторное действие АПС (10 нМ) и пептида АП9 (10 мкМ) (Б). * $p < 0,05$ – по сравнению с группой, где гиппокампальные нейроны сокультивировали с активированными ТК_{ЛПС}; # $p < 0,05$ – по сравнению с группой, где нейроны сокультивировали с активированными, предобработанными АП9 ТК_{ЛПС}; ## $p < 0,05$ по сравнению с группой, где нейроны сокультивировали с активированными, предобработанными АПС ТК_{ЛПС}.

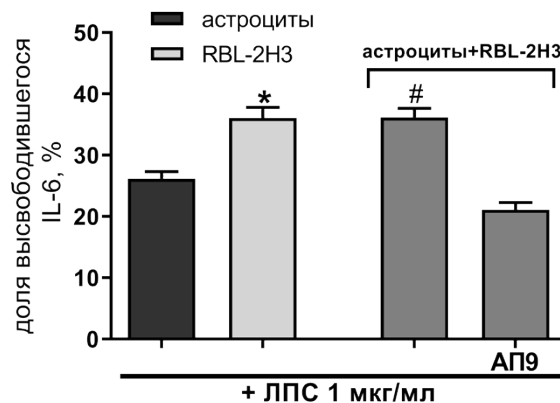


Рисунок 17. Влияние АП9 (100 мкМ) на изменение уровня высвобождения IL-6 астроцитами и клетками линии RBL-2H3 при их сокультивировании в условии токсического действия ЛПС (1 мкг/мл). * $p < 0,05$ по сравнению астроцитами, # $p < 0,05$ по сравнению с предобработанной АП9 группой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Используемые нами 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. 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 снижении 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 $TNF\alpha$ из активированных тромбином в высокой концентрации астроцитов. Кроме того, 10-минутная инкубация астроцитов с АП9 оказывала противовоспалительное действие, приводя к уменьшению амплитуды Ca^{2+} -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^{2+} -зависимом протекторном и противовоспалительном действии пептида.

Для исследования 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 приводило к гибели последних, что, вероятно, опосредуется набором факторов, высвобождаемых ТК. Интересно, что стабилизация ТК пептидом или АПС предотвращала гибель нейронов, при этом, защитное действие реализуется через ПАР-1 рецепторы как ТК, так и нейронов.

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

Необходимо отметить, что несмотря 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 тучных клеток на нейроны, реализуется через ПАР-1 как тучных клеток, 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете

МГУ.03.06 по специальности 03.03.01 – физиология:

1. 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 (Scopus, WoS, IF = 2.439, DOI: 10.1016/j.jphs.2019.08.006).

2. Mitrokhin V., Mladenov M., Gorbacheva L., **Babkina I.**, Lovchikova I., Kazanski V., Kamkin A. Influence of NO and $[Ca^{2+}]_o$ on $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis in rat ventricular cardiomyocytes // Biotechnology and Biotechnological Equipment. – 2018. – V. 32. – P. 1338–1343. (Scopus, WoS, IF = 1.097, DOI: 10.1080/13102818.2018.1488621).

3. **Babkina I.I.**, Strukova S.M., Pinelis V.G., Reiser G., Gorbacheva L.R. New synthetic peptide protects neurons from death induced by toxic influence of activated mast cells via protease-activated receptor // Biochemistry, Supplemental Series A. – 2016. – V. 10. – № 2. – P. 126–134 (Scopus, WoS, IF = 0.44, DOI: 10.1134/S1990747816010037).

Тезисы докладов в рецензируемых журналах:

1. **Babkina I.**, Strukova S., Sidorova M., Gorbacheva L. PAR1-agonists as regulators of neuroinflammation *in vitro* // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 2019. – V. 39. – P. 516–517 (WoS, Scopus, IF = 6.040).

2. **Бабкина И.И.**, Струкова С.М., Сидорова М.В., Горбачева Л.Р. Участие активированного протеина С и нового синтетического пептида-агониста ПАР1 (АП9) в регуляции воспаления *in vitro* // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2017. –

спецвыпуск. – с. 37–37 (RSCI WoS, РИНЦ, IF РИНЦ = 3.228).

3. **Бабкина И.И.**, Голяко И.А., Сидорова М.В., Струкова С.М., Горбачева Л.Р. Антивоспалительное действие протеаз гемостаза при гипергликемии // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2016. – Т. 67. – № S3. – с. 51–52 (РИНЦ, перечень ВАК, IF РИНЦ = 0.389).

4. Сурин А.М., Бакаева З.В., Красильникова И.А., **Бабкина И.И.**, Лисина О.Ю., Чеботарь И.В., Пинелис В.Г. Исследование совместного действия липополисахарида *E.coli* и эксцитотоксических доз глутамата на нейроны в культуре // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2016. – Т. 1. – с. 159–160 (RSCI WoS, РИНЦ, IF РИНЦ = 3.228).

5. Горбачёва Л.Р., **Бабкина И.И.**, Голяко И.А., Сидорова М.В., Струкова С.М. Модуляция функций рецепторов, активируемых протеазами при гипергликемии // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2016. – Т. 1. – с. 72–73 (RSCI WoS, РИНЦ, IF РИНЦ = 3.228).

6. **Babkina I.**, Sidorova M., Gorbacheva L., Strukova S. Anti-inflammatory effect of non-canonical peptide agonist of PAR-1 on rat mast cells resembles activated protein C action // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2015. – V. 13. – № S2. – P. 613-613 (WoS, Scopus, IF = 4.662).

7. **Babkina I.**, Gorbacheva L., Ishiwata S., Strukova S. Activated protein C protects hippocampal neurons from the death induced by activated mast cells // Thrombosis Research. – 2014. – V. 133. – № S3. – P. 101–101 (WoS, Scopus, IF = 2.779).

Тезисы докладов международных и всероссийских конференций:

1. **Babkina I.**, Gorbacheva L., Strukova S., Pinelis V., Reiser G. Activated protein C (APC) via PAR1 protects neurons from death in the model of neuroinflammation *in vitro* // Research and practice in thrombosis and haemostasis. – 2017. – V. 1. – S1. – P. 486–486.

2. **Бабкина И.И.**, Горбачева Л.Р. Регуляция активированным протеином С и пептидом-агонистом PAR1 провоспалительной активации клеток линии RBL-2H3 // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. – 2019. – Т. 1. – с. 10–14.

3. **Babkina I.**, Sidorova V., Gorbacheva L. New synthetic peptide (AP9) similar to activated protein C demonstrates the neuroprotective effect at the glutamate-induced toxicity // The Book Of Abstracts The Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis 2018 jointly with the 9th Russian Conference on Clinical Hemostasiology and Hemorheology. – 2018. – с. 27–27.

4. Голяко И.А., **Бабкина И.И.**, Горбачева Л.Р. Влияние экспериментального сахарного диабета на действие агонистов рецепторов 1 типа, активируемых протеазами // Сборник тезисов XII Международной (XXI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – 2017. – с. 53–53.

5. Голяко И.А., **Бабкина И.И.**, Горбачева Л.Р. Влияние диабета, вызванного стрептозотоцином, на регулируемую тромбином и активированным протеином С секрецию тучных клеток крыс // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова. – 2017. – с. 2160–2162.

6. Gorbacheva L., **Babkina I.**, Golyako I., Strukova S. Anti-Inflammatory effect of protease-activated receptor-1 agonists on the cell line RBL-2H3 at hyperglycemia // Abstract book of 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop . – 2016. – с. 79–79.

7. **Бабкина И.И.**, Голяко И.А., Сидорова М.В., Струкова С.М., Горбачёва Л.Р. Антивоспалительное действие агонистов рецепторов 1 типа, активируемых протеазами, на клетки линии RBL-2H3 при гипергликемии // Нейронаука для медицины и психологии: 12-й Международный междисциплинарный конгресс. Труды Конгресса. – 2016. – с. 74–76.

8. Егоров В.В., **Бабкина И.И.**, Горбачева Л.Р. Механизмы цитопротекторных эффектов активированного протеина С при остром воспалении // Сборник тезисов XI Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – 2016. – с. 197–198.

9. **Бабкина И.И.**, Горбачёва Л.Р., Сидорова М.В., Струкова С.М. Механизмы цитопротекторного действия АПС-зависимого пептида-агониста PAR1 при остром

воспалении // Сборник «Нейронаука для медицины и психологии». Одиннадцатый международный междисциплинарный конгресс. – 2015. – с. 71-72.

10. **Бабкина И.И.** Неканонический пептид 9 – агонист рецептора, активируемого протеазами, защищает клетки линии RBL-2H3 в модели воспаления // сборник XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015". – 2015. – с. 364–364.

11. **Бабкина И.И.**, Горбачева Л.Р., Сидорова М.В., Струкова С.М. Неканонический пептид-агонист рецептора 1, активируемого протеазами, регулирует секреторную функцию тучных клеток // материалы VII Всероссийской с международным участием конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии. – 2015. – с. 51–52.

12. **Babkina I.**, Sidorova M., Gorbacheva L., Reiser G., Strukova S. Influence of activated protein C and synthetic peptide-agonist on the activation of MC and survival of hippocampal neurons // 22th International congress on Fibrinolysis & Proteolysis. Book of abstracts. – 2014. – P. 11–11.

13. **Бабкина И.И.** Сравнительный анализ цитопротекторного действия APC и нового пептида-агониста PAR1 на активированные тучные клетки и гиппокампальные нейроны при кокультивировании // сборник XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2014". – 2014. – 320–320.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АП9 – пептид-агонист PAR-1
 АПС – активированный протеин С
 АТФ – аденозинтрифосфат
 БГА – β-гексозаминидаза
 Глу – глутамат
 ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
 ЛДГ – лактатдегидрогеназа
 ЛПС – липополисахарид
 PAR-1 – рецептор, активируемый протеазой 1 типа
 ТК – тучные клетки

ЦНС – центральная нервная система
 ЭРПС – эндотелиальный рецептор протеина С
 IL-1β – интерлейкин-1β
 IL-6 – интерлейкин-6
 NF-κB – ядерный фактор каппа В
 NMDA рецептор – рецептор N-метил-D-аспартата
 PMA – форболовый эфир
 TNFα – фактора некроза опухоли-α

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность д.б.н., доценту Горбачевой Любови Руфэльевне за чуткое руководство, помощь и поддержку на всех этапах исследования; д.б.н., профессору Балезиной Ольге Петровне за внимательное прочтение, рецензирование работы и ценные советы и замечания; д.б.н. Сурина Александр Михайловичу за ценные рекомендации, сделанные в ходе обсуждения результатов.

Автор глубоко благодарен к.б.н., доценту 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 за психологическую поддержку и терпение.