

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. ЛОМОНОСОВА
НИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

На правах рукописи

АСТАХОВА АЛИНА АНАТОЛЬЕВНА

**ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ АСТРОЦИТОВ ПРИ ИХ ОДНОКРАТНОЙ И
ПОВТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИЯХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ**

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
В.н.с. д.х.н. М.Г. Сергеева

МОСКВА – 2016

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Врожденный иммунитет и воспаление	11
1.1.1. Воспаление в центральной нервной системе	13
1.2. Сигнальные пути воспалительного ответа	16
1.2.1. Сигнальный путь TLR-4.....	17
1.2.2. Терминация сигнального каскада TLR-4.....	22
1.2.3. Сигнальные каскады MAP киназ.....	25
1.2.4. Подходы к исследованию каскада MAP киназ в клеточных моделях...	27
1.2.5. Особенности сигнального пути TLR-4 в астроцитах.....	31
1.3. Регуляция скорости деградации мРНК в ходе воспаления.....	33
1.3.1. Участие HUR и TTP в регуляции стабильности мРНК.....	35
1.3.2. ARE-связывающие белки в астроцитах.....	39
1.4. Воспалительный ответ на повторные стимуляции.....	40
1.4.1. Модели изучения ответа на повторные стимуляции.....	43
1.4.2. Механизмы регуляции прайминга и эндотоксиновой толерантности ..	46
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	49
2.1.Оборудование и реактивы	49
2.2. Получение первичных культур астроцитов, культуры клеток линии С6 и стимуляции.....	52
2.3. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия	53

2.4. Иммуноблоттинг	54
2.5. Выделение РНК, ОТ и ПЦР в режиме реального времени	55
2.6. Анализ высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ)	57
2.7. Анализ высвобождения TNF α и IL10.....	57
2.8. Анализ жизнеспособности культур с использованием реагента WST-1	57
2.9. Статистическая обработка.....	57
2.10. Биоинформатический анализ данных о полногеномной экспрессии	58
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	59
3.1. Характеристика острого воспалительного ответа в астроцитах	59
3.1.1. Влияние LPS на экспрессию COX-2, IL10 и TNF α	59
3.1.2. Влияние стимуляции LPS на MAP киназы и MKP1	63
3.1.3. Регуляции экспрессии COX-2 и IL10 в условиях острого воспаления .	67
3.2. Экспрессия и регуляция TTP и HUR.....	75
3.2.1. Исследование экспрессии генов врожденного иммунитета методами биоинформатики.....	75
3.2.2. Экспрессия TTP и HUR на уровне мРНК.....	79
3.2.3. Регуляция TTP и HUR на уровне мРНК	81
3.2.4. Регуляция TTP и HUR на уровне белка	85
3.3. Характеристика ответа астроцитов на двукратную стимуляцию LPS	88
3.3.1. Влияние длительной провоспалительной стимуляции на экспрессию и активность COX-2	89

3.3.2. Характеристика культуры астроцитов при двукратной стимуляции LPS	93
3.3.3. Влияние двукратной стимуляции на экспрессию COX-2, TNF α и IL10	95
3.3.4. Регуляция воспалительного ответа при двукратной стимуляции	98
3.3.5. Регуляция экспрессии COX-2 и IL10 при двукратной провоспалительной стимуляции астроглиальных клеток	102
4. ВЫВОДЫ	109
5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

COX-2 – циклооксигеназа 2

DUSP – фосфатазы двойной специфичности (синоним MKP)

FBS – эмбриональная телячья сыворотка

FSBB – буфер с телячьей эмбриональной сывороткой

HBSS – сбалансированный солевой раствор Хэнкса (Hank's Balanced Salt Solution)

HUR – антиген человека R (Human Antigen R)

IL – интерлейкин

LPS – липополисахарид, эндотоксин

MKP – фосфатаза MAP киназ (синоним DUSP)

PBS – фосфатно солевой буфер

PPAR – рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами

TBS – трисовый солевой буфер

TGF β – фактор роста бета

TLR-4 – Толл подобный рецептор 4

TNF α – фактор некроза опухолей альфа

TTP – тристетрапролин

MAP, MAPK – митоген активируемые белковые киназы

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ОТ – обратная транскрипция

ЭТ – эндотоксиновая толерантность

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительный ответ является частью системы врожденного иммунитета и представляет собой фундаментальный механизм защиты организма от нарушения гомеостаза, вызванного механическими травмами или инвазией патогенов. Однако активация воспаления неизбежно приводит к неспецифическим повреждениям собственных структур организма. Этот факт объясняет взаимосвязь между воспалением и разнообразными хроническими патологиями: активированное в результате исходного повреждения воспаление может приводить к новым повреждениям в организме, если происходит сбой в протекании процесса ответа. Подобные нарушения протекания воспалительного процесса были показаны для многих заболеваний мозга: рассеянного склероза, вторичных травм, болезней Альцгеймера, Паркинсона и других патологий. В связи с этим актуальной задачей современных исследований становится выявление механизмов, регулирующих запуск, развитие и завершение врожденного иммунного ответа.

Важную роль в регуляции воспаления в ЦНС играют глиальные клетки - астроциты и микроглия. Важно учитывать, что эти клеточные популяции обладают иммунной компетентностью различной природы. Микроглиальные клетки происходят из клеток гематопозитического ряда (как и клетки иммунной системы), в то время как астроглия берет начало в эктодермальном зачатке. В связи с этим, иммунным свойствам астроцитов длительное время внимания не было уделено, их рассматривали только в качестве вспомогательных клеток центральной нервной системы, вовлеченных в метаболизм нейронов и формирование гематоэнцефалического барьера. Накопленные к настоящему времени данные позволяют утверждать, что врожденная иммунная защита является не менее значимой функцией астроглии. Астроциты активно вовлечены в воспалительный ответ и при нарушении его регуляции могут вносить существенный вклад в повреждение нервной ткани в ходе нейродегенеративных состояний. Эти данные обуславливают интерес к астроцитам, как к клеткам, участвующим в процессах

врожденного иммунитета и ставят вопрос о возможности направленной регуляции их иммунных свойств.

На уровне организма (*in vivo*), а также для клеток иммунной системы в опытах *in vitro* показано изменение характера протекания ответа на действие провоспалительного стимула при повторных стимуляциях. Показано как явление увеличения чувствительности к действию агониста (прайминг), так и снижение чувствительности (толерантность).

В данной работе был поставлен вопрос о том, как соотносятся процессы развития воспалительного ответа (провоспалительные процессы) и процессы завершения воспаления в астроглиальных клетках в условиях однократной провоспалительной стимуляции и повторных провоспалительных обработок. Для ответа на вопрос мы использовали первичные культуры клеток астроцитов мозга крыс. Воспалительный ответ моделировали с использованием LPS, который, как было показано ранее, на астроцитах активирует Толл-подобный рецептор 4 и соответствующий клеточный воспалительный ответ. Для выяснения молекулярных механизмов регуляции выбраны гены-маркёры воспаления: циклооксигеназа 2 (COX-2), TNF α – гены, стимулирующие развитие воспалительного ответа, а также IL10 – ген, отвечающий за активацию противовоспалительного ответа, который важен для поддержания гомеостаза.

Для клеток иммунной системы, в первую очередь макрофагов, наиболее охарактеризованными на молекулярном уровне являются следующие регуляторные элементы сигнальных путей: 1) MAP киназы (в первую очередь p38 MAPK) и фактор транскрипции NF- κ B, которые активно участвуют в регуляции экспрессии провоспалительных генов; 2) MKP-1, антагонист p38, участник регуляторного цикла «киназа-фосфатаза»; 3) система посттранскрипционной регуляции экспрессии генов через контроль стабильности мРНК, ключевыми факторами которой является пара белков TTP и HUR, из которых TTP ускоряет, а HUR – замедляет деградацию мРНК генов, вовлеченных в развитие воспалительного ответа. На астроцитах относительно хорошо были

охарактеризованы изменение сигнального пути TLR-4, регуляция p38 MAPK и фактора NF-κB, однако изменения воспалительного ответа при повторных стимуляциях исследовано не было. Кроме того, возможность регуляции воспалительного ответа на астроцитах с участием цикла киназа-фосфатаза p38-MKP-1 и регуляция через деградацию мРНК с помощью пары TTP-HUR ранее не исследовали.

Цель и задачи исследования:

Цель данной работы – выявить молекулярные механизмы ответов астроцитов, развивающихся при однократной и повторной стимуляциях липополисахаридом.

Задачи включали:

1. Охарактеризовать влияние однократной стимуляции LPS на высвобождение маркеров воспаления (TNFα, COX-2) и маркера противовоспалительных процессов IL10;
2. Проанализировать участие фосфатазы MKP1 в регуляции MAP киназы p38 при однократной стимуляции LPS.
3. Охарактеризовать влияние однократной стимуляции LPS на экспрессию мРНК и белков TTP и HUR и выявить механизмы их регуляции в астроцитах;
4. Охарактеризовать влияние двукратной стимуляции LPS на воспалительный ответ астроцитов и выявить молекулярные механизмы регуляции экспрессии COX-2 и IL10 в этих условиях.

.Положения, выносимые на защиту:

1. В условиях однократной стимуляции LPS регуляцию экспрессии провоспалительного гена COX-2 и противовоспалительного гена IL10 на ранних этапах воспалительного ответа обуславливают одинаковые механизмы, в частности: каскад MAP киназ и фактор транскрипции NF-κB.
2. Регуляция воспалительного ответа астроцитов имеет принципиальные отличия от регуляции воспаления в классических иммунокомпетентных клетках – клетках миелоидного и лимфоидного происхождения: 1) фосфатаза MKP1 не

активируется в ответ на воздействие LPS, т.е. не формируется классическая регуляторная связь между MAP кинами p38 и JNK и фосфатазой MKP1; 2) под воздействием LPS не происходит изменение экспрессии на уровне белка ARE-связывающих факторов TTP и HUR, хотя при этом в астроцитах, как и в других исследованных клетках наблюдается выход белка HUR из ядра и увеличение экспрессия TTP на уровне мРНК.

3. Повторные стимуляции LPS приводят к изменению интенсивности ответа генов COX-2 и IL10 на провоспалительные воздействия и разобщению механизмов регуляции экспрессии рассматриваемых генов. В частности, NF-κB сохраняет роль отрицательного регулятора для экспрессии IL10 в условиях повторных стимуляций клеток LPS, однако для COX-2 приобретает функции отрицательного регулятора экспрессии.

Результаты проведенных исследований являются для науки новыми, имеют теоретическую и практическую значимость. Полученные данные указывают на механизмы регуляции IL10 – важного молекулярного посредника в разрешении воспаления. Представляется значимым, что эти механизмы проанализированы не самостоятельно, а при одновременном сопоставлении с регуляцией провоспалительного гена COX-2. Полученные данные показывают на общность путей про- и противовоспалительной регуляции, роль которых изменяется для про- и противовоспалительных путей в зависимости от рассматриваемой фазы воспалительного ответа. Данные могут быть использованы для разработки более эффективных подходов в лечении состояний, связанных с воспалением в центральной нервной системе. Полученные результаты могут быть также использованы при составлении лекций или семинарских занятий, посвященных междисциплинарным вопросам на стыке нейробиологии и иммунологии.

Методология диссертационного исследования включала классические подходы и методы клеточной и молекулярной биологии, в том числе: получение первичных культур глиальных клеток из мозговых тканей неонатальных крыс; моделирование воспалительного ответа в условиях *in vitro*; анализ экспрессии

мРНК и белков методами ПЦР в режиме реального времени; иммуноблоттинга; ИФА; лазерной сканирующей микроскопии; спектрофотометрические подходы для определения уровня жизнеспособности культур, а также биоинформатический анализ дифференциальной экспрессии генов в массивах данных транскриптомного анализа в образцах опухолевых тканей.

Материалы диссертации были представлены на международных конференциях «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» в г. Пущино в 2015 и 2013 г.; «Nuclear receptors: Linking molecules, genomes & physiology» в г. Сорренто (Италия) в 2013 г.; «3rd European lipidomics meeting», Пардубице (Чехия), 2013 г.; «Alternative Strategies against Cancer and Inflammation» Бангкок (Тайланд). 2012. По результатам работы было опубликовано 8 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых международных и отечественных журналах, входящих в перечень ВАК РФ и 5 материалов отечественных и международных конференций. Публикации в рецензируемых журналах подтверждают достоверность полученных результатов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Врожденный иммунитет и воспаление

Иммунную защиту у позвоночных осуществляют системы врожденного (неспецифического) и приобретенного (специфического) иммунитета. Ключевыми компонентами системы приобретенного иммунитета являются специализированные клетки крови лимфоидного ряда – Т и В лимфоциты. Их активация зависит от контакта с антигенами – структурами патогенов, которые в норме не встречаются в организме. В результате активации лимфоциты вырабатывают особые молекулы – высокоселективные антитела, способные запускать ряд процессов в рамках иммунного ответа, специфически направленные на уничтожение конкретных инфекционных агентов (Murphy, 2011; Owen et al., 2013).

Понятие врожденного иммунитета дается гораздо менее строго. Неспецифический иммунитет понимают как комплекс механизмов, препятствующих проникновению инфекции внутрь организма (Murphy, 2011; Owen et al., 2013). В широком понимании в рамки такого определения вписываются физико-химические барьеры, препятствующие инвазии патогенов (кожные покровы; слизистые покровы пищеварительного тракта); поведенческие механизмы избегания потенциальных источников инфекции (реакция отвращения, вызываемая несвежестью пищи или продуктами метаболизма, рвотный рефлекс при отравлении и т.д.) (Medzhitov et al., 2012); а также клеточные и молекулярные механизмы распознавания и уничтожения инфекционных возбудителей. В более узкой трактовке врожденный иммунитет включает только специализированные клеточные и молекулярные механизмы (Murphy, 2011; Owen et al., 2013). Одним из ключевых молекулярно-клеточных механизмов врожденного иммунитета является процесс воспаления.

Понятие «воспаление» было введено А. Цельсусом (30 г. до н.э. – 38 г. н.э.) для описания состояния на уровне организма, органа или ткани. Известно пять классических характеристик воспаления, четыре из них были даны самим Цельсусом (*dolor* – боль, *rubor* – покраснение, *calor* – повышение температуры, *tumor* – опухание), а последнее (*functia laesa* – утрата работоспособности) было добавлено позднее Галеном. По мере развития клеточной/молекулярной биологии и иммунологии стали известны специфические клеточные и молекулярные процессы, лежащие в основе проявления каждого из признаков воспаления. Например, к покраснению и появлению припухлости приводит усиление притока крови и инвазия нейтрофилов, моноцитов и других клеточных элементов в ткани поврежденного участка. Процесс направления потока крови и миграции клеток обеспечивается синтезом в местах повреждения особых молекул – цитокинов и хемокинов. За появление боли и жара ответственно комплексное взаимодействие между молекулами, например, простагландинами, синтезируемыми клетками поврежденных участков и рецепторами сенсорных нейронов (Murphy, 2011; Owen et al., 2013). Как оказалось, эти механизмы работают и в случае повреждения внутренних структур организма, для которых бывает затруднительным или даже невозможным выявление всех пяти классических признаков воспалительного ответа. Как следствие, термин «воспаление» стал использоваться для описания любых процессов активации врожденного иммунитета в организме и был расширен до уровня отдельно взятых клеток или даже отдельно взятых сигнальных каскадов. В настоящее время понятия «сигнальные пути воспаления» и «сигнальные пути врожденного иммунитета» в научной литературе часто используются в качестве синонимов для обозначения любых каскадов, вовлеченных в распознавание и ответ на сигналы воспалительной природы (сигналы, способные вызвать воспаление) (Kaminska, 2005; Newton and Dixit, 2012). Следует, однако, отметить, что термины все-таки не являются равнозначными. Воспаление представляет собой механизм врожденного иммунного ответа, то есть, является понятием меньшего порядка. В рамках данной работы под системой врожденного иммунитета будут пониматься

клеточные и молекулярные механизмы, связанные с процессом воспаления, а термины «воспаление» и «врожденный иммунный ответ» будут использоваться как эквивалентные.

До недавнего времени считалось, что воспалительный ответ, в противоположность ответу приобретенного иммунитета, является достаточно стереотипным, неселективным и менее комплексным. Однако в дальнейшем представление о стереотипности врожденного иммунного ответа было пересмотрено (Takeda and Akira, 2004). Были открыты многочисленные классы рецепторов (среди них группы Толл-подобных рецепторов, Нод-подобных рецепторов и другие), которые, как оказалось, высоко селективно активируются структурными компонентами инфекционных возбудителей. Действительно, транскриптомный анализ продемонстрировал различия в профилях экспрессии генов, измененных в ходе контакта клеток крови с бактериальными патогенами разных таксономических групп (Boldrick et al., 2002; Ramilo et al., 2007). Врожденный иммунитет также возможно активировать сигналами повреждения тканей, несопровождаемого инвазией патогенов, этот феномен называют «стерильное» воспаление (Kumar et al., 2009; Medzhitov, 2008; Medzhitov and Horng, 2009; Takeda and Akira, 2004). Понимание механизмов регуляции сигнальных путей воспаления имеет огромное значение для поиска новых маркеров заболеваний, определения различий в эффективности лекарственных препаратов и разработки новых терапевтических стратегий. Поэтому данная работа сфокусирована на исследовании особенностей регуляции внутриклеточных процессов в рамках воспалительного ответа.

1.1.1. Воспаление в центральной нервной системе

В настоящее время установлено, что воспаление является важной частью патогенеза многих хронических заболеваний ЦНС, в том числе опухолей мозга и нейродегенеративных состояний (болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона,

множественного склероза и т.д.) (Amor et al., 2014; Amor et al., 2010; Giraudon and Bernard, 2009; Shichita et al., 2012; Starakis et al., 2011a).

Активацию воспаления в ЦНС вызывают многочисленные экзогенные (то есть, неродственные для организма) и эндогенные (то есть, синтезируемые самим организмом) вещества. Несмотря на наличие гематоэнцефалического барьера, ЦНС является мишенью для множества патогенов инфекционной природы, в том числе бактерий *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia pneumonia*; вирусов Эпштейна-Барра, краснухи, ВИЧ и др. (Rock et al., 2004). Примечательно, хронические инфекции вирусной и бактериальной природы зачастую сопровождают нейродегенеративные состояния, такие как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, множественный склероз и др., хотя в настоящее время неясно, является ли инфекция причиной или следствием патологии нервной ткани (Giraudon and Bernard, 2009; Starakis et al., 2011b). Таким образом, изучение молекулярных механизмов регуляции взаимодействия клеток мозга с инфекционными агентами является важным в рамках исследований патологий ЦНС.

Помимо инфекционных агентов, активацию воспаления в мозге запускают сигналы повреждения клеток. Например, известно, что активация иммунного ответа в ЦНС происходит под воздействием тромбина или АТФ (Gourine et al., 2007; Wang and Dore, 2007). Тромбин является протеазой и в норме присутствует в тканях мозга в строго ограниченных концентрациях (Nishino et al., 1993; Xi et al., 2003). Повышение концентраций тромбина свидетельствует о повреждении сосудов, нарушении целостности гематоэнцефалического барьера и межклеточного матрикса и распознается клетками ЦНС посредством рецепторов группы PAR как сигнал опасности (Moller et al., 2000; Niego et al., 2011; Suo et al., 2002; Wang et al., 2002). Аденозин трифосфат (АТФ) также является важным медиатором разнообразных процессов в нервной ткани, выделяется в ограниченных количествах и распознается клетками посредством пуринергических рецепторов, например, рецепторов P2U и P2X. Как и в случае с тромбином,

повышение концентраций АТФ распознается клетками ЦНС как сигнал повреждения клеток (Cauwels et al., 2014; Kaya et al., 2002; Murakami et al., 2003). Кроме того, в ходе некротической гибели нейронов и астроцитов, вследствие разных причин в ткани мозга выделяются цитокины и реактивные формы кислорода. Эти вещества также служат сильными индукторами воспаления (Chen and Swanson, 2003; Shichita et al., 2012).

Иммунный ответ в нервной ткани обеспечивают клетки двух групп: во-первых, это иммунные клетки миелоидного (макрофаги, нейтрофилы) и лимфоидного (лейкоциты, лимфоциты) рядов, которые проникают в зоны повреждения из кровотока при появлении сигналов повреждения ткани; во-вторых, это резидентные иммунокомпетентные глиальные клетки – микроглиальные клетки и астроциты.

Астроциты являются многочисленной клеточной популяцией: в большей части структур мозга их число сопоставимо с числом нейронов, а в некоторых отделах (примечательно, что это отделы, связанные с проявлением интеллекта) астроциты численно преобладают (Herculano-Houzel and Lent, 2005; Herculano-Houzel et al., 2014). Астроглиальные клетки настолько важны для нейронов, что в тех частях мозга, в которых погибают астроциты, неизбежна гибель и нейронов (Chen and Swanson, 2003). Также астроциты вовлечены в передачу нервных импульсов. В настоящее время существует концепция «тройного синапса», в рамках которой астроциты рассматривают в качестве равноправного с нейронами участника передачи нервного импульса (Araque et al., 1999; Perea et al., 2009). Наконец, астроциты являются важными иммунокомпетентными клетками мозга (Farina et al., 2007; Sofroniew, 2014; Sofroniew, 2015a; Sofroniew, 2015b). Следует отметить, что иммунные свойства астроцитов не связаны с иммунными свойствами клеток миелоидного и лимфоидного путей развития и отличаются от свойств микроглиальных клеток. Дело в том, что микроглиальные клетки берут свое начало от гематопозитических стволовых клеток (имеют мезодермальное происхождение), то есть являются родственными по отношению к макрофагам. С другой стороны,

астроглиальные клетки делят предшественников с нейронами, являются клетками эктодермального происхождения и в строгом понимании не относятся к группе «иммунных» клеток. В связи с этим астроглию долгое время не рассматривали как участника воспалительных процессов в мозге. Лишь в последнее десятилетие этот вопрос подвергся пересмотру (Farina et al., 2007; Sofroniew, 2014; Sofroniew, 2015a; Sofroniew, 2015b). Тем не менее, до настоящего времени характеристика иммунного ответа в астроглиальных клетках освещена достаточно ограничено, что представляет значительный пробел в понимании биологии нервной ткани. Поэтому именно астроциты находятся в фокусе данной работы.

1.2. Сигнальные пути воспалительного ответа

Для понимания механизмов регуляции врожденного иммунитета на клеточном уровне рассмотрим общие характеристики клеточного воспалительного ответа.

Инициация воспалительного ответа происходит при взаимодействии клеток с молекулярными структурами («паттернами»), характерными для патогенов, то есть с сигналами инфекции, или молекулами, указывающими на повреждение клеток и тканей, то есть с сигналами повреждения. В англоязычной литературе такие структуры обозначают, как молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (дословно *pathogen associated molecular patterns* или *PAMPs*), или ассоциированные с опасностью (*danger associated molecular patterns, DAMPs*). В ответ на эти первичные сигналы клетки активируют молекулярные каскады воспаления и высвобождают соединения (например, цитокины и хемокины), которые в свою очередь информируют соседние клетки о присутствии опасности, то есть запускают вторичные воспалительные каскады. Основные классы рецепторов иммунного ответа (рецепторов, инициирующих первичные воспалительные каскады) включают: группу Толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLRs), Нод-подобных рецепторов (Nod-like receptors, NLRs), подобных лектину С рецепторов (C-type lectin receptors, CLR), RIG-I подобных рецепторов

(RIG-I-like receptors, RLRs), рецепторы группы «мусорщиков» (scavenger receptors, SR) и другие (Kawai and Akira, 2011; Takeda and Akira, 2015). Наиболее исследованы в настоящее время сигнальные пути TLRs. Именно они находятся в фокусе данной работы.

Известно, что в клетках человека экспрессируются 10 членов семейства TLRs, у *Mus musculus* и *Rattus norvegicus* их число составляет 13 (Takeuchi and Akira, 2010). Интересно отметить, что разные TLR используют сходные наборы внутриклеточных компонентов сигнального пути (рис. 1.2.). Так, для всех рецепторов, кроме TLR3, известна активация MyD88 зависимой ветви сигнального пути (Takeda and Akira, 2004; Takeda and Akira, 2015). TLR-4 и TLR3 способны инициировать альтернативную ветвь пути – TRIF-зависимый сигнальный путь TLR, причем, MyD88 зависимый и TRIF зависимые сигнальные пути в значительной степени пересекаются ниже комплексов MyD88 и TRIF. Поэтому для того, чтобы дать общую характеристику сигнальных путей Толл-подобных рецепторов рассмотрим сигнальный путь рецептора TLR-4 – наиболее исследованный путь (Takeda and Akira, 2004; Takeda and Akira, 2015).

1.2.1. Сигнальный путь TLR-4

Самым известным агонистом TLR-4 является липополисахарид (LPS, эндотоксин) – компонент клеточных стенок Грамм-отрицательных бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* и других. Собственно, липополисахарид – это не определенное вещество, а группа органических гетерополимеров со сходной структурой. Тремя компонентами липополисахарида являются так называемый О-антиген (полигликанная цепь), центральный олигасахарид и липид А (глюкозаминный дисахарид, связанный с жирными кислотами) (рис. 1.1.). Конечная структура липополисахарида специфична для каждой линии бактериальных клеток. В литературе термин «липополисахарид», как и термин «эндотоксин», используется в единственном числе и обозначает весь класс молекул

(Alexander and Rietschel, 2001). Было показано, что иммунные ответы на разные варианты LPS отличаются друг от друга (Pulendran et al., 2001), в связи с этим важно указывать, из какого источника был получен использованный в исследовании препарат. В данной работе был использован коммерческий препарат LPS компании Sigma Aldrich, кат. номер L2630, полученный из культур *Escherichia coli*.

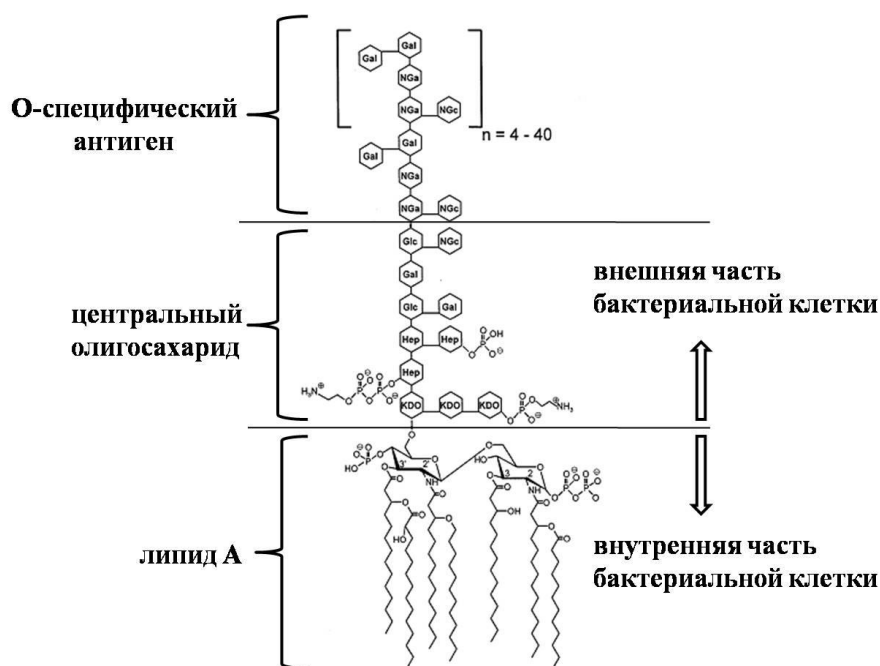


Рис. 1.1. Структура LPS. Три ключевыми компонентами LPS являются О-специфический антиген, состоящий из остатков сахаров в пиранозной форме, центральный олигосахарид, включающий остатки 3-деокси-D-маннооктулозониевую кислоту (KDO) и липид А – гликозилированный дисахарид с присоединенными остатками жирных кислот.

Обработка макрофагов или иных иммунных клеток LPS является широко используемой клеточной моделью воспаления, посредством которой были получены основные результаты исследований сигнальных путей Толл-подобных рецепторов (Alexander and Rietschel, 2001; Takeda and Akira, 2004). Понимание механизмов передачи сигнала внутри классического каскада TLRs необходимо для корректного анализа участия тех или иных молекулярных компонентов в

иммунном ответе астроцитов. Рассмотрим подробнее события, которые происходят в иммунной клетке после ее контакта с LPS.

Для эффективного распознавания LPS рецепторами TLR-4 требуется связывание эндотоксина с так называемым LPS-связывающим белком LBP (рис. 1.2.). Далее этот комплекс способен активировать рецепторную группу, которая включает димеры TLR-4, а также задействует корецепторы CD14 и MD2. Результатом распознавания LPS становится создание так называемой «докинговой» (docking platform, в прямом переводе – «заякоряющей») платформы в районе цитоплазматического конца рецептора TLR-4. Эта платформа представляет собой последовательно собирающийся комплекс белков, способных проводить сигнал от рецептора далее внутрь клетки. С рецептором TLR-4 связываются белки MyD88, TIRAP, киназы IRAK4 и IRAK1. Кластеризация IRAK4 приводит к аутофосфорилированию и, таким образом, активированию IRAK4 и IRAK1. Фосфорилированный комплекс может далее привлекать белок TRAF6 и активировать фактор транскрипции IRF5 и комплекс киназы TAB1/TAB2/TAK1, который в свою очередь модифицирует ингибиторный комплекс IKB α /NF- κ B, активирует киназы группы MAP (Mitogen Activated Protein Kinases, митоген активируемые белковые киназы), и далее фактор транскрипции AP-1 (рис. 1.2.) (Takeda and Akira, 2004; Takeda and Akira, 2015; Takeuchi and Akira, 2010). Под контролем факторов транскрипции AP-1, NF- κ B и IRF5 находится транскрипция многих регуляторов воспалительного ответа (рис. 1.2.).

Помимо MyD88 пути, существует также TRIF-зависимый путь TLR-4. TRIF-зависимый сигнальный путь также приводит к активации NF- κ B, MAP киназ и AP-1. В дополнение к ним, посредством TRIF пути происходит активация фактора транскрипции IRF3 и IRF7 (Takeda and Akira, 2004; Takeda and Akira, 2015; Takeuchi and Akira, 2010). Под контролем этих факторов транскрипции находятся интерфероны – важные участники воспалительного ответа.

Обобщенная схема сигнальных путей Толл-подобных рецепторов

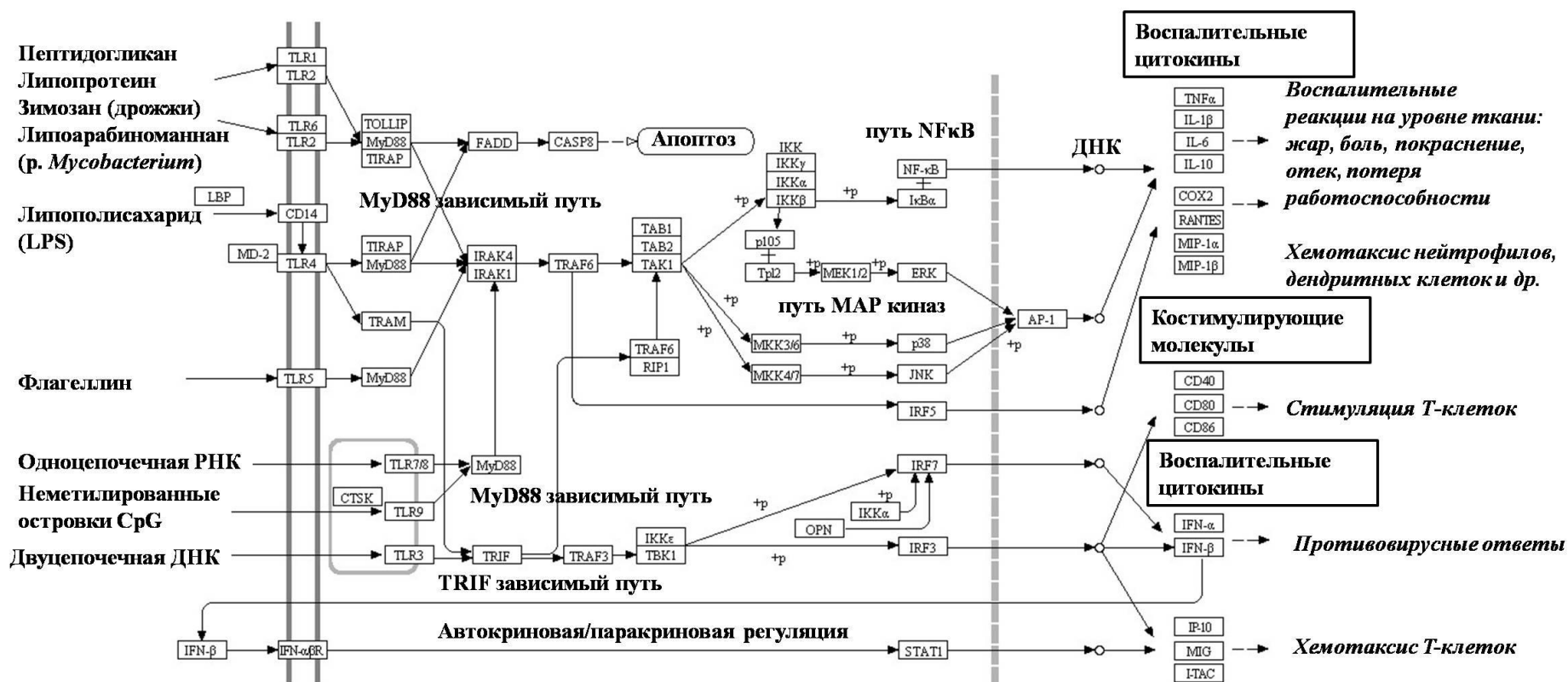


Рис. 1.2. Сигнальные пути Толл-подобных рецепторов. Активация сигнальных путей Толл-подобных рецепторов происходит при их контакте с соответствующими лигандами – провоспалительными молекулами. Далее, сигнал проходит через комплексы, включающие белок MyD88 (MyD88-зависимый путь) или TRIF (TRIF-зависимый путь). В конечном итоге происходит активация транскрипции многих генов, продукты которых обеспечивают активацию и привлечение клеток крови, активацию других клеток в районе повреждения и проявление признаков воспаления на уровне ткани. Адаптировано из Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Таким образом, активация сигнального пути TLR-4 приводит ко множеству изменений внутри клеток. Полный анализ этих изменений в рамках каждого исследования, связанного с воспалением, невозможен. Поэтому активацию сигнального пути TLR-4 детектируют по отдельным событиям, которые характерны для активации воспалительного ответа на уровне клеток. Одним из них является уровень изменений, не затрагивающих этапы транскрипции и трансляции: сюда можно отнести ассоциацию/диссоциацию молекул, посттрансляционные модификации и изменения локализации участников сигнального пути. В качестве примеров можно привести активацию каскада MAP киназ, модификацию хроматина, высвобождение фактора транскрипции NF-κB из ингибиторного комплекса с последующей транслокацией в ядро и т.д. (Bonizzi and Karin, 2004; Liu et al., 2013; Medzhitov and Horng, 2009). В рамках нашей работы мы использовали фосфорилирование p38 в качестве индикатора воспалительного ответа на ранних этапах воспаления – до 4 часов после стимуляции.

Кроме этого в ходе воспалительного ответа изменяется экспрессия нескольких тысяч генов. Например, добавление LPS к дендритным клеткам – иммуннокомпетентным клеткам гематопоэтического происхождения, приводит к усилению экспрессии примерно 1700 генов и подавлению экспрессии других 2000 генов (Amit et al., 2007; Rabani et al., 2011). Как правило, для подтверждения активации воспаления используют данные об изменении экспрессии одного или нескольких генов-маркеров, то есть генов, которые специфически вовлечены в процесс воспаления и изменяются на уровне транскрипции или трансляции. К широко используемым генам-маркерам воспаления можно отметить COX-2, TNFα, IL6, IL1β, IFNα, IFNγ и др. В рамках данной работы в качестве генов-маркеров были выбраны COX-2 и TNFα.

Важным аспектом исследований иммунного ответа на молекулярном уровне является время обработки клеток. Воспаление представляет собой комплексный клеточный ответ, при котором первичный контакт с сигналами-индукторами запускает экспрессию генов, которые в свою очередь обеспечивают активацию или подавление экспрессии следующих групп молекулярных участников.

Действительно, было показано, что часть молекул, изменяющихся на уровне экспрессии в дендритных клетках, достигала максимума усиления или подавления экспрессии через 30 минут после добавления LPS (Amit et al., 2007; Rabani et al., 2011). Некоторые молекулы воспалительного ответа (например, многие цитокины), высвобождаясь из клеток, далее выступают как индукторы воспаления, то есть, действуют в аутокринной (то есть посредством положительной обратной связи активируют те клетки, из которых были секретированы) или паракринной (то есть активируют соседние клетки) манере, запуская вторичные волны воспалительного ответа. На рис. 1.2. приведена схема аутокринной/паракринной активации на примере $IFN\beta$. Аналогичные сигнальные механизмы известны для $TNF\alpha$, IL6, IL10 и других молекул. Как следствие, воспалительный ответ изменяется во времени как по уровню экспрессии генов, так и по комбинации вовлеченных в ответ молекул.

В данной работе мы сосредоточили внимание на событиях раннего воспалительного ответа – от 15 минут до 4 часов после добавления LPS. Согласно литературным данным в этом промежутке происходит активация MAP киназ (p38, JNK) (Wang et al., 2010; Yoshizawa et al., 2008), а также детектируемые изменения экспрессии генов, анализируемых в рамках нашей работы (COX-2, $TNF\alpha$) (Font-Nieves et al., 2011). Именно в этом временном интервале происходит активация системы регуляции стабильности мРНК, о чем будет сказано далее (Prabhala et al., 2015; Tchen et al., 2004). Наконец, известно, что в этот же период уже начинается активация IL10, то есть запускаются процессы, обеспечивающие терминацию воспалительного ответа (Ledeboer et al., 2002).

1.2.2. Терминация сигнального каскада TLR-4.

Особого внимания заслуживают механизмы, которые ограничивают, блокируют или терминируют сигнальные каскады Толл-подобных рецепторов. Данные, полученные к настоящему времени, указывают на то, что за ограничение

и терминацию каскада TLR-4 ответственные механизмы двух фундаментальных уровней 1) уровня отрицательных регуляторов, блокирующих наращивание каскада и 2) уровня противовоспалительных факторов, обеспечивающих разрешение воспалительного ответа.

Отрицательные регуляторы сигнального пути TLR-4 представляют собой группу белков и регуляторных форм РНК (микроРНК), которые обеспечивают блокирование передачи сигнала на разных уровнях (Akira et al., 2010; Kondo et al., 2012; Saitoh and Akira, 2010). К ним относят вещества, которые выключают отдельные молекулярные комплексы внутри сигнального каскада. Например, факторы SOCS-1 и SHP-1 блокируют передачу сигнала через адапторные комплексы MyD88/TIRAP и киназ группы IRAK (Akira et al., 2010; Kondo et al., 2012); фосфатазы семейства DUSP/МКР обеспечивают инактивацию MAP киназ p38, JNK, Erk (Arthur and Ley, 2013; Kondoh and Nishida, 2007). Эти механизмы жизненно необходимы. Нарушения своевременной блокировки воспалительных каскадов являются ключевым механизмом патофизиологии смертельно опасных состояний – цитокинового шторма и сепсиса (Cavaillon et al., 2003; Tisoncik et al., 2012).

Факторы разрешения воспаления представляют собой противовоспалительные вещества, которые не блокируют передачу сигнала внутри каскада воспаления, но запускают процессы затухания экспрессии провоспалительных молекул и активируют каскады, действие которых направлены на восстановление участков, поврежденных в ходе инициации воспалительного ответа. К таким веществам относят производные липидов: резолвины, липоксины, простагландины (например, PGD₂), фактор роста TGFβ, цитокин IL10 и другие молекулы (Couper et al., 2008; Kohli and Levy, 2009; Schroder et al., 2003; Serhan et al., 2002). Например, было показано, что стимуляция клеток IL10 подавляет экспрессию IL6 и других цитокинов, индуцирует экспрессию других противовоспалительных веществ (Couper et al., 2008). Примечательно, что экспрессия IL10 запускается в ответ на стимуляцию LPS, однако достигает максимума в районе 24-48 часов после

добавления эндотоксина (Ledeboer et al., 2002; Yuk et al., 2011). Таким образом, еще при активации пути TLR-4 закладывается механизм его завершения, но время максимальной активности факторов разрешения наступает уже после полноценного развертывания воспалительного ответа.

Необходимо указать, что понятия «провоспалительный» - «антивоспалительный» не вполне корректно отражают роль отдельных молекул в процессе воспалительного ответа. Так, было показано, что выведение из системы воспалительного ответа отдельных провоспалительных факторов – $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, COX-2 приводит к более тяжелому протеканию воспаления и худшему восстановлению поврежденных структур (Chan and Moore, 2010; Nadeau et al., 2011; Rajakariar et al., 2006; Ulivi et al., 2008a). Это указывает на то, что запуск путей разрешения воспаления взаимосвязан с активацией провоспалительных процессов. Кроме того, известно, что IL6 , COX-2 и другие медиаторы могут выполнять про- и антивоспалительные функции в зависимости от молекулярного контекста, то есть обладают двойной специфичностью (Hunter and Jones, 2015; Ledeboer et al., 2002; Rajakariar et al., 2006; Ricciotti and FitzGerald, 2011; Sarvas et al., 2013; Yuk et al., 2011). Существование таких факторов указывает на взаимосвязь процессов развития и завершения иммунного ответа и подчеркивает комплексность механизмов регуляции воспаления. Кроме того, эти данные указывают на необходимость одновременного анализа экспрессии и регуляции про- и антивоспалительных молекул. Для того, чтобы выявить, какие механизмы вовлечены в совместную регуляцию про- и противовоспалительных процессов, в данной работе мы одновременно анализировали изменения экспрессии IL10 и COX-2. Для оценки участия COX-2 в провоспалительных процессах мы анализировали изменения в уровнях высвобождения его продукта – PGE_2 – физиологически активного вещества группы липидов с хорошо известными провоспалительными функциями. Для подтверждения активации провоспалительного ответа в клетках, мы также рассматривали изменение экспрессии $\text{TNF}\alpha$.

1.2.3. Сигнальные каскады MAP киназ

Одним из молекулярных блоков, активируемых в рамках сигнального пути TLR-4, является блок MAP киназ (сигнальный путь MAP киназ) (рис. 1.1). Регуляции участников этого блока уделено значительное внимание в данной работе, остановимся на нем подробнее.

К группе каскадов MAP киназ относят четыре сигнальных пути: Erk1/2 (p44/42), JNK, p38, и Erk5 (Cuenda and Rousseau, 2007; Plotnikov et al., 2011). По меньшей мере, каскады Erk1/2, JNK и p38 активно вовлечены в регуляцию воспалительных ответов. JNK и p38 являются важными участниками ранних этапов воспаления (Arthur and Ley, 2013; Cuadrado and Nebreda, 2010; Cuenda and Rousseau, 2007). Белок p38 в клетке представлен четырьмя изоформами: p38 α , p38 β , p38 γ и p38 δ , проявляющими тканевую специфичность. Наиболее распространенной является изоформа p38 α , в большинстве работ этой изоформе эквивалентно обозначение p38 (Arthur and Ley, 2013; Cuadrado and Nebreda, 2010; Cuenda and Rousseau, 2007). В случае JNK известны три гена JNK1, JNK2 и JNK3, формирующие десять различных сплайсовых форм белка. Наиболее распространенной является изоформа JNK1 (Bogoyevitch, 2006; Coffey, 2014).

В ходе активации MAP киназы подвергаются фосфорилированию (то есть, сами являются мишенями киназ), однако они отличаются от других фосфобелков тем, что проходят активацию посредством так называемого «двойного» фосфорилирования, то есть присоединяют фосфогруппы одновременно к остаткам и тирозина и треонина в последовательности Thr-X-Tyr (X соответствует любому аминокислотному остатку). Поэтому активацию MAP киназ осуществляют белки, способные проводить фосфорилирование по двум позициям, а не по одной, как это происходит в случае классических серин-треониновых или тирозиновых киназ. Функции двойного фосфорилирования выполняют белки МКК – киназы MAP киназ. Белки МКК достаточно селективны в отношении своих мишеней. Так, за активацию p38 ответственны МКК3 и МКК6, за активацию JNK ответственны

МКК4 и МКК7 (Arthur and Ley, 2013; Cuenda and Rousseau, 2007). Известно, что МКК4 может частично активировать p38, однако реципрокного фосфорилирования JNK посредством МКК3 и МКК6 выявлено не было (Cuenda and Rousseau, 2007). Сигнал на комплексы МКК4/7 и МКК3/6 передается от ферментативного комплекса TAB1/TAB2/TAK1 (рис. 1.2.). Активация MAPK носит кратковременный характер и необходима для инициации воспалительного ответа. Так, было продемонстрировано, что включение/выключение экспрессии IL6, TNF α и COX-2 зависит от регуляции активности p38 (Campbell et al., 2004; Dean et al., 1999).

Инактивацию MAP киназ осуществляют фосфатазы, удаляющие фосфорные группы одновременно в обеих позициях – в позиции тирозина и позиции треонина. Эти белки входят в группу так называемых фосфатаз двойной специфичности, или фосфатаз MAP киназ – DUSP/MKP (DUSP, Dual Specificity Phosphatases, MKP – MAPK Phosphatases). Всего в геноме млекопитающих закодировано 10 представителей семейства DUSP/MKP, при этом фосфатазная активность в отношении p38 была выявлена для MKP1, MKP2, MKP4, MKP5, MKP7 (Arthur and Ley, 2013; Kondoh and Nishida, 2007; Yang et al., 2014). MKP1 является наиболее исследованной фосфатазой MAP киназ, которая инактивирует как p38, так и JNK в исследованных к настоящему времени клетках миелоидного ряда (Arthur and Ley, 2013; Kondoh and Nishida, 2007; Yang et al., 2014). Фосфатазы MKP достаточно быстро экспрессируются в ответ на провоспалительный стимул в макрофагах и представляют собой механизм обратной связи, препятствующий избыточной активации MAP киназ (Zhao et al., 2005). Показано, что MKP1 экспрессируется в астроглиальных клетках (Lee et al., 2012). Однако его роль в регуляции воспалительного ответа не исследована. В настоящей работе мы проанализировали изменение экспрессии MKP1 в ходе воспалительного ответа в астроцитах.

1.2.4. Подходы к исследованию каскада MAP киназ в клеточных моделях

Поскольку в задачи данного исследования входил анализ участия киназ p38 и JNK в регуляции иммунного ответа в астроцитах, следует уделить некоторое внимание методическим аспектам применения низкомолекулярных активаторов и ингибиторов MAP киназ. Обобщенная схема регуляции MAP киназ посредством препаратов, обсуждаемых далее, приведена на рис. 1.3.

Широко используемым ингибитором p38 является соединение SB503280. Это вещество селективно подавляет активность p38 α и p38 β , но не влияет на p38 γ и p38 δ (Cuenda et al., 1995; Kuma et al., 2005). Стоит отметить, что SB503280 не препятствует фосфорилированию p38, однако связывается с активным центром белка, вовлеченным в передачу сигнала от p38 к белку-мишени. Однако в ряде работ продемонстрировано снижение уровня фосфорилированного p38 в условиях стимуляции фосфорилирования p38 в комбинации с обратной SB503280 (Du et al., 2010; Hassan et al., 2009). Вероятным объяснением этого феномена может быть наличие обратной положительной связи при фосфорилировании p38. Так, было показано, что p38 α активирует TAB1 – субъединицу киназы, активирующую MKK3/6 (рис. 1.2., 1.3.), что далее усиливает фосфорилирование p38 (De Nicola et al., 2013).

В качестве селективного ингибитора JNK используют соединение SP600125, которое препятствует фосфорилированию продуктов всех трех известных генов (JNK1, JNK2, JNK3) и, таким образом, блокирует передачу сигнала на мишени JNK (Bennett et al., 2001; Ennis et al., 2005).

Соединения SB503280 и SP600125 были использованы в данной работе при анализе участия p38 и JNK в проведении воспалительных сигналов в астроцитах. Следует отметить, что селективность обоих препаратов не является абсолютной. Было показано, что SB503280 и SP600125 в больших концентрациях могут активировать молекулярные компоненты каскадов, не входящих в состав сигнального пути MAP киназ, в обход p38 и JNK (Kong et al., 2014; Lali et al., 2000a;

Martial et al., 2008). Поэтому, при анализе эффектов ингибиторов MAP киназ возможные побочные множественные эффекты препаратов.

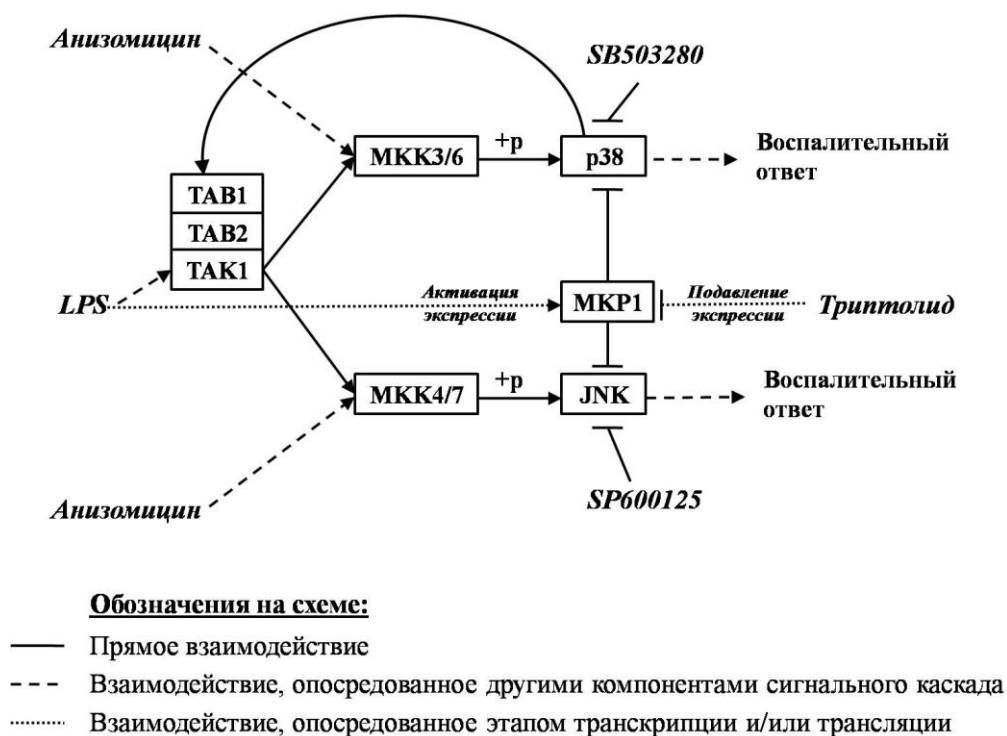


Рис. 1.3. Обобщенная схема регуляции p38 и JNK посредством низкомолекулярных соединений.

Известны также фармакологические активаторы MAP киназ. Наиболее часто используемым активатором p38 и JNK является вещество анизомицин (Hazzalin et al., 1998), хотя механизм его активации в целом неизвестен. Анизомицин активирует MKK3/6 и MKK4/7, однако эта активация происходит без участия TAK1 (Cheung et al., 2003a) (Рис.1.3).

Важно отметить, что при индукции фосфорилирования p38 следует использовать минимальные возможные концентрации анизомицина. Поскольку известно, что в больших концентрациях вещество ингибирует трансляцию в эукариотических клетках (Hazzalin et al., 1998). Так, для подавления трансляции в культивируемых первичных гепатоцитах или в клетках HeLa достаточно воздействия анизомицина в концентрации 10 мкМ (Grollman, 1967; Sidhu and Omiecinski, 1998). Было показано, что подавление трансляции под воздействием

анизомидина в астроцитах происходит при использовании вещества в концентрациях, превышающих 1 мкг/мл (что соответствует $\sim 3,7$ мкМ) (Yang et al., 2012). В данной работе была использована концентрация 1 мкг/мл, которая, предположительно, не оказывает значимого воздействия на подавление трансляции.

Механизм подавления трансляции анизомидином сходен с механизмом подавления трансляции циклогексимидом (Croons et al., 2008; Croons et al., 2009; Grollman, 1967). Оба соединения препятствуют формированию пептидных связей, при этом растущий белок остается связанным с рибосомой. Поэтому под воздействием анизомидина и циклогексимида в клетке не происходит накопления фрагментов полипептидов, которые имеют токсический эффект и активируют фосфорилирование p38. Этим указанные антибиотики отличаются от многих других ингибиторов трансляции (Croons et al., 2008; Croons et al., 2009). Вероятно, этот факт объясняет, почему для циклогексимида не было выявлено усиления фосфорилирования p38 (Feifel et al., 2002; Stockl et al., 2013). Таким образом, активация p38 под воздействием анизомидина является его специфическим эффектом, не связанным со стрессовым ответом клетки.

Ингибирование белкового синтеза оказывает примечательное влияние на транскрипцию некоторых генов – резко усиливает их экспрессию. Этот феномен получил название «супериндукции» и был выявлен для ряда генов, вовлеченных в воспалительный ответ. Например, супериндуцируются мРНК COX-2 и IL6 (Faggioli et al., 1997; Hershko et al., 2004; Newton et al., 1997). Этот эффект был описан и для экспрессии генов PPAR: PPAR α , PPAR β/δ и PPAR γ в астроцитах (Chistyakov et al., 2014; Chistyakov et al., 2015). Хотя молекулярный механизм супериндукции до конца не ясен, его наличие или отсутствие важно для характеристик экспрессии указанных генов на разных типах клеток, поэтому для анализа вовлеченности феномена супериндукции в наблюдаемые изменения экспрессии и разграничения эффектов анизомидина на фосфорилирование p38 и подавление трансляции мы также проводили анализ влияния на клетки

циклогексимида, в той концентрации, которая эффективно подавляет синтез белка (5 мкг/мл) (Herman et al., 2011; Sidhu and Omiecinski, 1998).

В качестве ингибитора MKP1 – ключевой фосфатазы, обеспечивающей инактивацию p38 и JNK, используют вещество, которое называется триптолид (Leyva-Illades et al., 2012; Purwana et al., 2010; Zhao et al., 2005). В основе действия этого вещества лежит его способность инактивировать одну из субъединиц РНК-полимеразы II, то есть той полимеразы, которая обеспечивает синтез именно матричной РНК (Bensaude, 2011; Titov et al., 2011). Несмотря на столь неспецифичный характер действия триптолида, его использование в рамках анализа участия MKP1 в дефосфорилировании MAP киназ в целом оправдано. Дело в том, что MKP1 достаточно быстро активируется в ответ на провоспалительное воздействие на уровне экспрессии мРНК (Arthur and Ley, 2013; Cuenda and Rousseau, 2007) и возвращается к контрольным значениям в течение первых часов после провоспалительного воздействия (Chi et al., 2006; Zhao et al., 2005). Из этого следует, что блокирование синтеза мРНК MKP1 препятствует приросту белка, что делает возможным анализ участия фосфатазы в регуляции MAP киназ. Действительно, показано, что обработка макрофагов триптолидом приводила к ингибированию, хотя вернее будет сказать препятствовала индукции экспрессии MKP1 и усиливала эффект LPS на фосфорилирование p38 (Bhattacharyya et al., 2007; Lu et al., 2012; Zhao et al., 2005).

Таким образом, в распоряжении исследователей имеются механизмы, позволяющие направленно регулировать MAP киназы. Тем не менее, следует учитывать возможные побочные эффекты от их применения и с осторожностью относиться к интерпретации данных, полученных в ходе экспериментов с их использованием.

1.2.5. Особенности сигнального пути TLR-4 в астроцитах

Как и клетки миелоидного и лимфоидного происхождения, астроциты экспрессируют рецепторы групп TLR, NLR, RLR и других типов (Farina et al., 2007; Jensen et al., 2013; Sofroniew, 2015b; Sofroniew and Vinters, 2010). Показано, что астроциты отвечают на обработку LPS посредством MyD88 зависимой активации MAP киназ, в том числе p38 (в астроцитах экспрессируются изоформа p38 α), JNK (JNK1, JNK2), Erk (Font-Nieves et al., 2012; Gorina et al., 2011). Фосфорилирование киназ в астроцитах приводит к активации NF- κ B и фосфорилированию STAT1, итогом чего является индукция экспрессии провоспалительных маркеров, в том числе, COX-2, TNF α , IL10, PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ и других молекул (Aleshin et al., 2009; Chistyakov et al., 2014; Chistyakov et al., 2015; Font-Nieves et al., 2012; Gorina et al., 2011).

Однако сигнальный каскад TLR-4, реализуемый в глиальных клетках, имеет ряд существенных отличий от каскадов, представленных в клетках миелоидного или лимфоидного происхождения. Прежде всего, следует отметить особенности на уровне комплексов рецепторов в астроцитах. В ряде работ утверждалось, что астроглиальные клетки вообще не экспрессируют рецепторы TLR-4 (Kielian, 2006; Kielian, 2009), хотя было известно, что глиальные клетки отвечают на обработку LPS. При этом воздействие эндотоксина на клетки могло быть объяснено TLR-4 независимым путем активации воспаления. Например, было показано, что распознавание LPS возможно посредством TLR2-зависимого каскада (Erridge et al., 2004; Yang et al., 1998). До сих пор в некоторых работах LPS указывают в качестве агониста TLR2 (Jensen et al., 2013). Вероятным объяснением участия TLR2 в проведении сигнала LPS является контаминация коммерческих препаратов. Действительно, было показано, что дополнительная очистка препарата LPS может влиять на итог стимуляции клеток (Hirschfeld et al., 2000). Далее, в ряде работ была показана экспрессия TLR-4 в астроцитах, хотя ее характеризовали как невысокую (Gustin et al., 2015).

Любопытно, что в одной из работ было поставлено под сомнение соответствие между клеточными моделями воспалительного ответа в астроцитах грызунов и человека. Было показано, что астроциты человека, полученные из эмбриональных тканей мозга, экспрессируют TLR-4 на уровне белка, не экспрессируют CD14 и при этом не отвечают на обработку LPS (Tarassishin et al., 2014). Эти данные об экспрессии TLR-4 противоречат результатам других исследований, в которых было показано, что астроциты, выделенные из образцов эмбрионального и образцов взрослого мозга человека по-разному экспрессируют TLR-4. Так, астроциты эмбриональных тканей экспрессируют TLR-4 лишь на уровне мРНК, а астроциты из взрослого мозга синтезируют белок TLR-4 (Bsibsi et al., 2002; Jack et al., 2005). Исследований экспрессии CD14 или ответа астроцитов на LPS данные группы не проводили. Следует отметить, что в указанной спорной работе (Tarassishin et al., 2014) иммунодетекцию TLR-4 проводили с использованием антитела, произведенного компанией Santa-Cruz. К сожалению, этот производитель известен невысоким качеством именно антител. В связи с этим полученные группой данные, хотя и являются интересными, требуют дополнительной проверки. Примечательно, что уровни экспрессии TLR-4 и CD14 определяют чувствительность клеток к LPS (Fenton and Golenbock, 1998; Kalis et al., 2003; Lee et al., 1992). В связи с этим, возможно предположить, что человеческие астроциты в условиях культуры клеток эмбриона не способны реагировать на LPS в силу отсутствия экспрессии не CD14, а TLR-4 (или обоих рецепторов), а способность взрослых астроглиальных клеток человека отвечать на эндотоксин требует подтверждения в рамках дополнительных исследований.

Другим существенным отличием TLR-4 пути в астроцитах является не активность TRAM/TRIF/IRF-3/IFN β ветви (Gorina et al., 2011; Krasowska-Zoladek et al., 2007). При этом, как и в клетках миелоидного происхождения, часть сигнала LPS в астроцитах проходит в обход фактора MyD88, однако этот путь также не вовлекает и TRIF. В настоящее время детали этого альтернативного MyB88 и TRIF-независимого пути остаются неизвестными (Gorina et al., 2011). Таким образом,

сигнальный каскад глиальных клеток имеет ряд значимых отличий и требует более детальных исследований во избежание ошибочности выводов, построенных на экстраполяции характеристик других иммуннокомпетентных клеток.

Астроциты активно участвуют в терминеции иммунного ответа и резолюции воспаления (Norden et al., 2014; Sofroniew, 2015a). Важным механизмом в рамках этой функции является синтез противовоспалительных молекул, в первую очередь IL10 (Sofroniew, 2014; Sofroniew, 2015a; Sofroniew, 2015b). Несмотря на значимость этого вопроса, работы, посвященные регуляции экспрессии и высвобождения противовоспалительных цитокинов в астроцитах, единичны. Показано, что астроциты синтезируют IL10 *in vivo* и *in vitro* и имеют к нему рецепторы IL10R1 (Ledeboer et al., 2002; Mizuno et al., 1994; Rasley et al., 2006). Введение IL10 в зоны повреждения при ишемии способствовало снижению размеров травмированных участков, что связывали с противовоспалительной ролью IL10 (Spera et al., 1998). Тем не менее, однозначной положительной корреляции между концентрацией IL10 в плазме постинсультных больных и благоприятностью исхода ишемии показано не было (Chang et al., 2010; Vila et al., 2003). Этот факт указывает на «контекст-зависимый», то есть, зависимый от других факторов, эффект IL10 и подразумевает необходимость оценки соотношения про- и противовоспалительных маркеров (Fouda et al., 2013).

Задачами первого этапа анализа стало охарактеризовать влияние острой стимуляции LPS на высвобождение маркеров воспаления TNF α , противовоспалительные IL10, и смешанной COX-2; выявить механизмы регуляции экспрессии IL10 и COX-2 в астроцитах в условиях острого воспалительного ответа и проанализировать участие фосфатазы MKP1 в отрицательной регуляции MAP киназы p38.

1.3. Регуляция скорости деградации мРНК в ходе воспаления

В ранних исследованиях скорость деградации мРНК считали относительно постоянным, консервативным процессом, однако в настоящее время роль

процесса деградации мРНК для регуляции клеточных ответов пересмотрена. Стало понятно, что скорость деградации молекул мРНК не является постоянной, а может быть увеличена или уменьшена в зависимости от потребностей клеток. Оказалось, что стабильность мРНК медиаторов воспаления меняется при воспалительных ответах клеток иммунной системы (Anderson, 2009; Kratochvill et al., 2011; Raghavan and Bohjanen, 2004). Например, уже через 15 минут после стимуляции дендритных клеток наблюдается изменение скорости деградации мРНК многих медиаторов воспаления (Rabani et al., 2011). Эти результаты затрагивают вопрос о роли регуляции стабильности мРНК в воспалительных клеточных ответах.

Наиболее исследованным и вовлеченным в регуляцию воспалительного ответа в клетке является механизм, который называют ARE-опосредованный путь распада мРНК (Anderson, 2009; Carpenter et al., 2014; Saitoh and Akira, 2010). Аббревиатура «ARE» расшифровывается, как Adenine Uridine Rich Element (богатый аденином и уридином элемент) и обозначает участок, богатый повторами AUUUA, встречающийся в 3' нетранслируемой области мРНК ряда генов. Этот участок мРНК может быть использован особой группой ARE-распознающих белков, которые участвуют в регуляции стабильности мРНК. Существует несколько вариантов композиций сайтов, которые имеют разное сродство к факторам, обуславливающих деградацию мРНК и обозначаются как классы ARE-последовательностей (Chen and Shyu, 1995). По разным оценкам, до 9% мРНК человека содержат ARE элементы в нетранслируемой 3' области, а, значит, предположительно находятся под контролем системы ARE-опосредованной стабилизации/дестабилизации мРНК (Bakheet et al., 2006). Примечательно, что ARE-элементами обогащены мРНК генов с определенными функциями: факторы роста, гены медиаторов иммунного ответа, регуляторы метаболизма, причем, многие из этих мРНК кодируют белки с онкогенными функциями (Anderson, 2009; Kim et al., 2008; Schoenberg and Maquat, 2012). Таким образом, ARE-опосредованный контроль может регулировать экспрессию не отдельных генов, а целых функциональных кластеров, что имеет принципиальное значение для

согласованной работы сигнальных комплексов. Подобная регуляция на уровне функциональных кластеров мРНК представляет собой своего рода «посттранскрипционный регуляторный код» (Keene, 2007; Lebedeva et al., 2011). Действительно, регуляция деградации мРНК медиаторов воспалительного ответа является примером контроля на уровне функциональной группы молекул (Anderson, 2009; Carpenter et al., 2014; Saitoh and Akira, 2010).

Белковые факторы, которые взаимодействуют с ARE-элементами мРНК и регулируют скорость деградации транскриптов, называют ARE-связывающими белками. В настоящее время ключевыми представителями этой функциональной группы считают белки HUR (Elavl1), TTP (Zfp36), KSRP, Auf1, Brf1, Brf2 (Anderson, 2009; Schoenberg and Maquat, 2012). Среди них, HUR и Auf1 принимают участие в стабилизации мРНК, а остальные факторы усиливают разрушение транскриптов. Наиболее исследованными белками из группы регуляторов распада ARE-содержащих мРНК являются белки HUR и TTP. Поэтому рассмотрим механизмы их действия подробнее.

1.3.1. Участие HUR и TTP в регуляции стабильности мРНК

HUR (Elavl1) принадлежит к семейству РНК-связывающих белков ELAVL (Embryonic Lethal Abnormal Vision – белок летального аномального зрения эмбриона) и экспрессируется во всех исследованных клетках (Brennan and Steitz, 2001a; Lu and Schneider, 2004; Ma et al., 1996). Белок содержит три мотива распознавания РНК и является одним из ключевых факторов стабилизации мРНК различных функциональных групп, в том числе циклинов, протоонкогенов, факторов роста, цитокинов и других, то есть участвует в регуляции пролиферации клеток, карциногенезе, дифференцировке, иммунном ответе и других биологических процессах (Kim et al., 2008). Нокаут гена является летальным для организма (Katsanou et al., 2009). Исследования на уровне транскриптома выявили примерно 26 тысяч сайтов связывания для HUR, расположенные главным образом

в 3' нетранслируемой части генов (Lebedeva et al., 2011). Главными функциями HUR считают защиту мРНК от связывания с факторами, усиливающими деградацию (Doller et al., 2008; Kim et al., 2008; Lebedeva et al., 2011; Simone and Keene, 2013). Присутствие HUR связывающих сайтов в интронных участках генов указывает на возможное участие фактора в сплайсинге (Lebedeva et al., 2011).

На рис.1.4. представлена обобщённая схема регуляции ARE-содержащих мРНК в ходе воспалительного ответа. Показано, что в условиях провоспалительных реакций в клетках происходит индукция экспрессии HUR на уровне мРНК и белка (Diaz-Munoz et al., 2015; Lin et al., 2011; Rhee et al., 2010). Другим важным механизмом, обеспечивающим регуляцию посредством HUR, является перемещение HUR между ядром и цитоплазмой (Bhattacharyya et al., 2006; Brennan and Steitz, 2001b; Kim et al., 2008). Считается, что непосредственная деградация матриц происходит в цитоплазме, в то время как связывание мРНК с HUR осуществляется в ядре. Регуляция этого процесса задействует систему MAP киназ (фактор p38 и киназу MK2) (Schoenberg and Maquat, 2012). Фосфорилирование HUR с участием p38, по-видимому, представляет главный механизм положительной регуляции стабилизации мРНК (Farooq et al., 2009; Kim et al., 2008). Также было показано, что в негативную регуляцию локализации HUR вовлечен белок 14-3-3. Фосфорилирование HUR с участием циклиновой киназы Cdk1 приводило к усилению связывания HUR с 14-3-3 в ядре HeLa клеток, что ограничивало способность HUR связывать и стабилизировать мРНК (Kim et al., 2008).

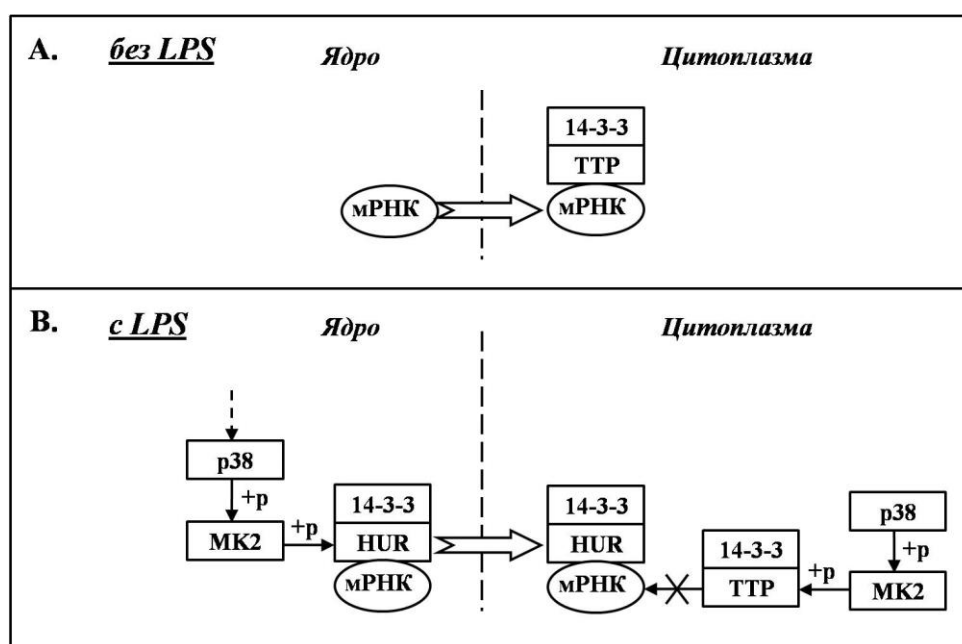


Рис. 1.4. Схема регуляции ARE-содержащих мРНК в ходе воспалительного ответа. В отсутствие провоспалительного сигнала (А) мРНК транслоцируется в цитоплазму, где с ней связывается белок ТТР, который направляет мРНК на деградацию в стрессовые гранулы. Под воздействием провоспалительного стимула HUR и ТТР подвергаются фосфорилированию от p38 и его мишени MK2. В результате этого HUR связывается с белком 14-3-3 и взаимодействует с ARE-сайтом на мРНК. С другой стороны, фосфорилирование ТТР также приводит к его связыванию с белком 14-3-3, однако при этом ТТР теряет способность взаимодействовать с мРНК. Итогом этих событий становится увеличение стабильности мРНК.

Наиболее значимым известным к настоящему моменту антагонистом HUR является белок тристетрапролин. Тристетрапролин - ТТР (Tristetraprolin, Zfp36) относится к белкам группы «цинковые пальцы» и способен связываться с мРНК, регулируя стабильность молекулы. Интерес к изучению ТТР возник после того, как было показано, что у нокаутных по гену ТТР мышей, здоровых при рождении, через 1-8 недель развивались комплексные системные патологии, включая артрит, дерматит, миелоидную гиперплазию и другие нарушения. Указанные заболевания не развивались при введении животным антител, нейтрализующих TNF α (Taylor et al., 1996a). Объяснением феномена стало установление участия ТТР в отрицательной регуляции экспрессии TNF α на посттранскрипционном уровне

(Blackshear, 2002). При отсутствии регуляции со стороны ТТР мРНК TNF α имела избыточную продолжительность жизни, что приводило к возникновению системного воспалительного состояния, следствием чего являлись указанные нарушения. В дальнейшем было показано, что ТТР важен для дестабилизации не только TNF α , но и множества других генов, в том числе медиаторов воспалительных ответов – хемокинов, цитокинов, и матриц генов других функциональных групп (Blackshear, 2002).

Регуляция ТТР представляет собой комплексный процесс. Экспрессируемый в норме (в фоновом режиме) ТТР способен связывать ARE-содержащие мРНК и направлять их на деаденилирование и последующую деградацию, происходящую в так называемых стрессовых гранулах, то есть выполняет функции отрицательного регулятора экспрессии генов. Как и HUR, ТТР может перемещаться между ядром и цитоплазмой (Taylor et al., 1996b). Под воздействием стрессовых стимулов, подразумевающих необходимость увеличения уровней определенных мРНК (например, в случае потребности клетки в цитокинах под воздействием воспалительных агентов) происходит связывание ТТР с белком 14-3-3. Это взаимодействие изолирует ТТР от стрессовых гранул, что препятствует участию белка в разрушении матриц и приводит к стабилизации мРНК (Stoecklin et al., 2004; Taylor et al., 1996b). Процесс инактивации ТТР протекает достаточно быстро. Так, в условиях провоспалительной стимуляции уже через несколько минут можно выявить усиление стабилизации мРНК ряда генов (Kratochvill et al., 2011; Rabani et al., 2011; Raghavan and Bohjanen, 2004). Высокая скорость инактивации ТТР осуществляется посредством системы фосфорилирования и дефосфорилирования. Важными медиаторами активности ТТР выступают MAP киназа p38. Фосфорилирование ТТР обеспечивает его сродство к белку 14-3-3, а дефосфорилирование – соответственно, высвобождение из ингибиторного комплекса.

Примечательно, что экспрессия ТТР на уровне мРНК и на уровне белка усиливается под воздействием провоспалительных сигналов. В то же время,

активация системы фосфорилирования ограничивает TTP-опосредованную деградацию. По-видимому, усиление экспрессии TTP на ранних этапах обеспечивает один из последующих механизмов затухания воспалительного сигнала, сдерживаемый на начальных этапах посредством посттрансляционной модификации TTP (Kratochvill et al., 2011). С этим заключением согласуются результаты исследований участия TTP в регуляции скорости деградации мРНК в условиях провоспалительной стимуляции (Kratochvill et al., 2011). Так, в клетках макрофагах было продемонстрировано постепенное распространение действия TTP на нестабильные транскрипты медиаторов воспаления после стимуляции LPS. Главным регулятором TTP в этом процессе выступала киназа p38 (Kratochvill et al., 2011). Таким образом, взаимосвязь между динамикой активации p38 и экспрессией TTP может выступать одним из механизмов, регулирующих кинетику воспалительного ответа в клетках и является крайне актуальным вопросом исследования.

Транскрипты, кодирующие HUR и TTP, сами относятся к группе ARE-содержащих матриц и регулируются собственными белковыми продуктами (Al-Ahmadi et al., 2009; Brook et al., 2006; Dai et al., 2012; Tchen et al., 2004). Таким образом, экспрессия факторов регулируется на уровне транскрипции, стабильности мРНК, экспрессии белка, посттрансляционных модификаций, локализации в клетке и взаимодействия с ингибиторными комплексами. При этом регуляторные механизмы для обоих факторов частично перекрываются. Оба белка изменяют свое поведение в условиях провоспалительного стимула и участвуют в регуляции врожденного иммунного ответа в клетке (Chen et al., 2013; Lin et al., 2006).

1.3.2. ARE-связывающие белки в астроцитах

Исследования факторов ARE-опосредованной регуляции стабильности мРНК в астроцитах пока единичны, однако полученные к настоящему моменту результаты позволяют предполагать, что система ARE-опосредованной регуляции

стабильности мРНК вовлечена в регуляцию воспаления в астроглиальных клетках. Показано, что обработка клеток $\text{IFN}\gamma$ в сочетании с ЕТҮА (5,8,11,14-эйкозотетраеновой кислотой) – противовоспалительным препаратом группы эйкосаноидов – приводила к увеличению стабильности МКР1 с участием HUR (Lee et al., 2012). Одним из механизмов стабилизации МКР1 была транслокация HUR из ядра в цитоплазму. Примечательно, что наиболее выраженный выход HUR из ядра наблюдали при именно комбинированной стимуляции клеток $\text{IFN}\gamma$ и ЕТҮА, а не под воздействием одного из препаратов (Lee et al., 2012). Далее, было получено, что обработка культур первичных астроцитов LPS приводит к усилению стабильности ARE-содержащие мРНК, кодирующих $\text{PPAR}\alpha$, $\text{PPAR}\beta/\delta$ и $\text{PPAR}\gamma$. Ингибирование киназы посредством добавления SB230580 снимало эффект провоспалительной стимуляции, что подразумевает участие p38 в регуляции стабильности мРНК в астроцитах (Chistyakov et al., 2014; Chistyakov et al., 2015). Было показано, что, помимо HUR, астроциты экспрессируют факторы TTP (на уровне мРНК) и KSRP (на уровне мРНК и белка (Li et al., 2012; Lisi et al., 2011). Таким образом, накопленные данные указывают на то, что сигнальный путь ARE-опосредованной регуляции стабильности мРНК активен и вовлечен в контроль провоспалительных ответов в астроцитах. Однако молекулярные механизмы этой регуляции практически не изучены.

Таким образом, задачами второго этапа анализа стало: охарактеризовать влияние острой стимуляции LPS на экспрессию мРНК и белков TTP и HUR и выявить механизмы регуляции экспрессии TTP и HUR в астроцитах в условиях острого воспалительного ответа.

1.4. Воспалительный ответ на повторные стимуляции

Известно, что иммунный ответ на повторную провоспалительную стимуляцию существенно отличается от ответа, запущенного однократным контактом клеток или тканей с сигналами опасности. Крайние проявления этих различий наблюдают в условиях моделируемых воспалительных состояний – в

модели «прайминга» и в модели «эндотоксиновой толерантности» (ЭТ) (Biswas and Lopez-Collazo, 2009; Morris and Li, 2012a), которые имеют отношение к таким патологиям, как сепсис и цитокиновый шторм (D'Elia et al., 2013; Tisoncik et al., 2012).

Прайминг определяют как повышение чувствительности, «сенситизацию» экспрессии провоспалительных маркеров, таких как TNF α , IL6 в ответ на повторную стимуляцию воспалительным стимулом в условиях, когда предшествующая обработка была представлена низкими или сверхнизкими концентрациям эндотоксина (например, менее 1 нг/мл для многих клеточных моделей) (Hirohashi and Morrison, 1996; Morris and Li, 2012b; Morris et al., 2014a). Противоположностью прайминга является эндотоксиновая толерантность – феномен снижения или полного подавления экспрессии провоспалительных молекул в ответ на повторный контакт организма с провоспалительными агентами (Biswas and Lopez-Collazo, 2009). Таким образом, развитие обоих крайних состояний воспалительного ответа – и прайминга, и эндотоксиновой толерантности обуславливают предшествующие контакты организма с провоспалительными сигналами, при этом характер ответа зависит от концентрации провоспалительного агента.

Эндотоксиновую толерантность следует отличать от других понятий, описываемых с использованием термина «толерантность». Так, лекарственная толерантность – это наступающее со временем снижение эффективности препарата. Это общеизвестный термин. Толерантностью к заболеванию называют разницу в чувствительности к факторам заболевания, в ситуации, когда одна и та же патогенная нагрузка вызывает разные по интенсивности проявления воспаления в индивидуальных организмах (Medzhitov et al., 2012). Наконец, под иммунной толерантностью или, иначе, центральной толерантностью, подразумевают блокирование активации Т и В лимфоцитов под воздействием собственных антигенов организма в ходе созревания клеток. Понятие иммунной толерантности является фундаментальным в рамках иммунологии и приводится в классических

учебных пособиях (например, классические учебные пособия: Murphy, 2011; Owen et al., 2013). Понятие эндотоксиновой толерантности ближе всего к определению лекарственной толерантности.

Эндотоксиновую толерантность (ЭТ) определяют как снижение чувствительности организма к воздействию LPS при повторной стимуляции (Biswas and Lopez-Collazo, 2009; Fan and Cook, 2004; West and Heagy, 2002). ЭТ проявляется на уровне клеток, тканей и целого организма. Одно из первых описаний ЭТ содержит работа 1947 года (Beeson, 1947), в которой было отмечено, что повторное введение кроликам противотифозной вакцины сопровождалось меньшей лихорадкой в сравнении с первой инъекцией. В 1988 году было продемонстрировано, что инъекции мышам небольших доз эндотоксина значительно снижали смертность среди животных при повторных введениях липополисахарида уже в летальных концентрациях (Freudenberg and Galanos, 1988). Таким образом, к проявлениям ЭТ на уровне организма следует отнести снижение выраженности воспалительного ответа и повышению устойчивости организма к летальным факторам.

Аналогичные эффекты были выявлены и на уровне отдельных клеток. Было показано, что предобработка макрофагов эндотоксином приводила к снижению выброса $\text{TNF}\alpha$, IL6, COX-2 при их последующей стимуляции LPS и повышению их устойчивости к летальным дозам провоспалительных агентов (Biswas and Lopez-Collazo, 2009; Cross, 2002; Mathison et al., 1990).

Наконец, было установлено, что предобработка организма или клеток эндотоксином приводит к усилению экспрессии противовоспалительных маркеров, таких как IL10, $\text{TGF}\beta$ (Biswas and Lopez-Collazo, 2009; Cross, 2002). Таким образом, эндотоксиновая толерантность характеризуется не только подавлением синтеза провоспалительных факторов и десенситизацией путей гибели клеток, а представляет собой комплексный ответ, ориентированный на защиту организма.

Примечательно, что изучение ЭТ имеет практический терапевтический потенциал в отношении инсультов. Было показано, что предшествующая

стимуляция мозга LPS в течение 2-3 суток снижает повреждения мозга, вызванные последующим инсультом (Rosenzweig et al., 2004; Rosenzweig et al., 2007). Улучшение прогноза характеризовалось снижением размеров очага повреждения и сокращением периода функционального восстановления после приступа. Примечательно, что, хотя инсульт в целом является непрогнозируемым состоянием, в ряде случаев возможно оценить риск развития состояния. Так, например, с повышением риска инсультов связаны постоперационные периоды, к факторам риска относят массу тела, возраст, пол, образ жизни и некоторые другие параметры (Limburg et al., 1998; Sharifpour et al., 2013). Однако использование ЭТ в качестве терапевтического подхода не представляется возможным без детального понимания механизмов регуляции состояния, особенностей его развития и подавления, а также оценки возможных побочных эффектов.

Изменения, наблюдаемые в клетках и тканях, подвергнутых повторным провоспалительным стимуляциям, указывают на подавление провоспалительного ответа и усиление противовоспалительных механизмов, что важно для понимания биологии и регуляции воспалительных ответов (Biswas and Lopez-Collazo, 2009; Cross, 2002). Поэтому в данной работе мы исследовали как изменяется экспрессия COX-2, TNF α и IL10 в астроцитах при их повторной стимуляции LPS.

1.4.1. Модели изучения ответа на повторные стимуляции

Классическим индуктором воспалительного ответа в рамках моделей прайминга и ЭТ является липополисахарид. На это указывает и прилагательное «эндотоксиновая» в названии модели «эндотоксиновая толерантность». Тем не менее, сходные эффекты перестройки иммунного ответа наблюдают и в тех случаях, когда в качестве стимулов используют иные вещества, например, TNF α , IL6, пептидогликан, тромбин (Fraker et al., 1988; Jiang et al., 2002; Nakayama et al., 2004). Это указывает на универсальность механизмов адаптации клетки, которые не зависят от природы провоспалительного стимула.

Различия в протоколах, используемых при изучении прайминга и эндотоксиновой толерантности, включают вариации следующих параметров: 1) объект исследования: это может быть организм, ткань или культура клеток; 2) тип воспалительного агента или комбинации агентов; 3) концентрации воспалительных стимулов и последовательность использования стимулов разных концентраций; 4) время адаптационной и экспериментальной стимуляций.

Экспериментальные модели прайминга и ЭТ могут быть условно разделены на группы *in vivo* (все манипуляции производят с организмами); *in vitro* (все манипуляции производят с культурами клеток) и смешанные – *ex vivo*; в этом случае выделение «репрограммированного» материала (тканей или клеток) следует за стимуляцией организма (Lopez-Collazo and del Fresno, 2013; Morris and Li, 2012a; Morris et al., 2014a; Morris et al., 2014b; Nahid et al., 2011). Модели *in vivo* подходят для оценки системных параметров состояний, например, выживаемости, времени восстановления иммунного статуса и т.д. В то же время, *ex vivo* и *in vitro* модели позволяют исследовать молекулярные механизмы, лежащие в основе репрограммирования иммунного ответа.

Некоторые варианты повторных стимуляций различных видов клеток, используемые в рамках моделей ЭТ в табл. 1.1. Из таблицы видно, что, используя разные периоды и концентрации LPS для стимуляций, разные исследовательские группы наблюдали сходные эффекты в изменении профилей экспрессии про- и противовоспалительных маркеров.

Табл. 1.1. Некоторые модели повторных стимуляций *in vitro*

Клеточные культуры	Схемы стимуляций	Изменение экспрессии	Ссылка
Дендритные клетки	LPS 100 нг/мл 48 ч + LPS 1 мкг/мл 24 ч	↓IL-6, IL-1β ↑ IL10	<i>Chang et al., 2009</i>
Моноциты	LPS 10 нг/мл 24 ч + LPS 10 нг/мл 4	↓TNF-α ↑ IL10, MCP-1	<i>Pena et al., 2011</i>
Мононуклеарные клетки периферической крови	LPS 1 нг/мл 48 ч + LPS 100 нг/мл LPS 2, 6, 24 ч	↓TNF-α, IL-12, ↑ IL10, COX-2	<i>Mendez et al., 2011</i>
Первичные культуры астроцитов	LPS 100 нг/мл 24 ч + LPS 10 нг/мл	↓IL-6, ↑ TGF-β	<i>Beurel and Jope, 2010</i>

В рамках нашего исследования была использована модель эндотоксиновой толерантности *in vitro* для того, чтобы выяснить, как изменялся иммунный ответ астроцитов на повторные стимуляции и определить ключевые регуляторные механизмы, вовлеченные в изменения клеточного ответа глиальных клеток.

Нам известно всего две работы одной исследовательской группы, посвященные изучению воспалительного ответа в астроцитах при повторных стимуляциях (Beurel, 2011; Beurel and Jope, 2010). Авторы исследований выбрали модель индукции толерантности к LPS, при которой клетки сначала обрабатывали эндотоксином в бóльшей концентрации (100 нг/мл первая стимуляция) в течение 24 часов, после чего стимулировали меньшей концентрацией LPS (10 нг/мл, вторая стимуляция). Согласно опубликованным данным повторные стимуляции астроцитов LPS приводили к изменениям клеточного ответа в целом соответствовавшим модели ЭТ. При этом, наблюдали следующие изменения по сравнению с ответом на однократную стимуляцию: 1) происходило понижение индукции IL6 и других провоспалительных генов; 2) происходило усиление индукции TGF β и некоторых других противовоспалительных генов (Beurel and Jope, 2010). К сожалению, авторы не привели объяснений выбора указанных концентраций и их последовательности. При этом, известно, что LPS в концентрации 100 нг/мл вызывает выраженное повышение экспрессии COX-2 и TNF α в астроглиальных культурах, что указывает на воспалительный эффект этой концентрации, причем, этот эффект остается ярко выраженным после 24 часов с момента обработки LPS (Aleshin et al., 2011; Chistyakov et al., 2014). Учитывая эти методические особенности работ указанной исследовательской группы (ссылки), можно сказать, что механизм ЭТ на астроцитах не изучен.

1.4.2. Механизмы регуляции прайминга и эндотоксиновой толерантности

Предложен ряд механизмов, обеспечивающих репрограммирование клеток и индукцию прайминга или эндотоксиновой толерантности в иммуннокомпетентных клетках. Ключевым механизмом сенситизации иммунного ответа при прайминге считают сочетание селективной активации GSK3 и JNK с подавлением Akt и Erk подпороговыми концентрациями провоспалительных стимулов – концентрациями, не вызывающими детектируемые изменения в экспрессии маркеров воспаления (например, TNF α , IL6). (Morris and Li, 2012a; Morris et al., 2014a; Morris et al., 2014b). Согласно современным представлениям, LPS в сверхнизких концентрациях достаточно для того, чтобы повлиять на отдельные компоненты сигнального пути TLR-4 (или посредством экспрессии молекул или посредством посттранскрипционных модификаций факторов), но не достаточно для того, чтобы изменить экспрессию маркеров воспаления. Однако те изменения, которые активируют низкие концентрации LPS, в итоге перестраивают последующий иммунный ответ (Morris and Li, 2012a; Morris et al., 2014a; Morris et al., 2014b).

Для объяснения феномена эндотоксиновой толерантности предлагают различные механизмы. Известно, что отдельные участки сигнального пути TLR-4 блокируются отрицательными регуляторами – белками и миРНК. Например, отрицательный регулятор IRAK-M блокирует уровень IRAK4, а miR155 и miR146 препятствуют проведению сигнала от TRAF6. При этом, происходит выключение отдельных ветвей внутри каскада, что влияет на конечный суммарный исход ответа (Biswas and Lopez-Collazo, 2009; West and Heagy, 2002). Другим механизмом, вовлеченным в изменение ответа при эндотоксиновой толерантности, является так называемая «пластичность» NF- κ B. Известны пять генов, кодирующих две субъединицы NF- κ B: p65, p50, c-rel, relB и p52, при этом субъединицы могут комбинироваться в гомо- и гетеродимеры. При этом, провоспалительная стимуляция обеспечивает переключение экспрессии разных субъединиц, что влияет на конечный состав димеров в клетке (Hayden and Ghosh, 2008).

Каноническая (p65/p50) и альтернативные формы NF-κB имеют разное сродство к транскрипционным комплексам и вовлечены в регуляцию транскрипции различных мишеней. Так, при активации ответа на однократную стимуляцию LPS димер p65/p50 обеспечивает высокий выброс TNFα и меньший синтез IL10, а неканонические формы RelB/p65 или p50/p50 обеспечивают снижение транскрипции TNFα, с одновременным усилением синтеза IL10 (Biswas and Lopez-Collazo, 2009). Наконец, известно, что изменения иммунного ответа при ЭТ связаны с ремоделированием хроматина – изменением паттернов метилирования, ацетилирования и убиквитинирования разных участков ДНК под воздействием предшествующих стимуляций LPS, что опять же позволяет более эффективно активировать экспрессию одних генов, и подавить экспрессию других генов в ответ на повторную стимуляцию (ссылки приведены в обзорах, например, Biswas and Lopez-Collazo, 2009; Cavaillon and Adib-Conquy, 2006; Lopez-Collazo and del, 2013). Следует отметить, что все указанные уровни обуславливают изменения иммунного ответа на уровне целых групп генов. С одной стороны, этот факт усложняет анализ регуляторных механизмов, обеспечивающих ЭТ. С другой стороны, однако, это наблюдение дает возможность предполагать, что регуляцию ЭТ возможно осуществлять посредством контроля ограниченного числа мишеней, что представляется привлекательным для терапевтических разработок.

Из трех перечисленных механизмов, вовлеченных в регуляцию воспалительного ответа в условиях ЭТ (обратные отрицательные связи; пластичность NF-κB и модификации хроматина) для астроцитов был подтвержден только третий. Показано, что изменения экспрессии IL6 в условиях повторных стимуляций LPS связаны с участием комплексов ремоделирования хроматина – GSK-3β/HDAC6 (Beurel and Jope, 2010). При этом роль NF-κB и отрицательных регуляторов сигнального пути остается не исследованной.

Перспективной мишенью для регуляции ЭТ на клеточном уровне представляется сигнальный каскад MAP киназ. Во многих работах было продемонстрировано, что p38 и JNK не подвергаются фосфорилированию в

условиях ЭТ (Brudecki et al., 2013; Kraatz et al., 1999; Nimah et al., 2005). Примечательно, в этих работах было показано, что неспособность повторного стимула вызывать фосфорилирование MAP киназ в клетках THP-1 являлась следствием избыточной активации MKP-1 – ключевой фосфатазы, инактивирующей p38 и JNK. Нокаут MKP-1 приводил к восстановлению экспрессии TNF α и IL6 (Brudecki et al., 2013; Kraatz et al., 1999). Таким образом, MKP-1 может быть перспективной мишенью в контексте регуляции ЭТ.

Задачами третьего этапа исследования стало охарактеризовать влияние двукратной стимуляции LPS на воспалительный ответ астроцитов и выявить механизмы регуляции экспрессии COX-2 и IL10 в астроцитах в условиях двукратной провоспалительной стимуляции.

Таким образом, целью данной работы было выявить молекулярные механизмы ответов астроцитов, развивающихся при однократной и повторной стимуляциях липополисахаридом.

Задачи включали:

1. Охарактеризовать влияние однократной стимуляции LPS на высвобождение маркеров воспаления (TNF α , COX-2) и маркера противовоспалительных процессов IL10;
2. Проанализировать участие фосфатазы MKP1 в регуляции MAP киназы p38 при однократной стимуляции LPS.
3. Охарактеризовать влияние однократной стимуляции LPS на экспрессию мРНК и белков TTP и HUR и выявить механизмы их регуляции в астроцитах;
4. Охарактеризовать влияние двукратной стимуляции LPS на воспалительный ответ астроцитов и выявить молекулярные механизмы регуляции экспрессии COX-2 и IL10 в этих условиях.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1.Оборудование и реактивы

Оборудование:

спектрофотометр Ultrospec 2000: PharmaciaBiotech, Германия; амплификатор MyCycler, амплификатор iCycler: Bio-Rad, США; амплификатор DTLite 4 (ДНК-технология, Россия); камеры для вертикального электрофореза, камера для горизонтального электрофореза, камера для полусухого переноса; камера для полуколичественного анализа электрофореграмм и иммуноблоттов (GelDoc™ XR+ System) iCycler: Bio-Rad, США; планшетный спектрофотометр SpectramaxM5 MolecularDevices, США; лазерный сканирующий микроскоп LSM 510: CarlZeiss, Jena, Germany; ледяная баня с ультразвуком Bioruptor: Diagenode, США.

Реагенты:

культуральная среда DMEM, со стабильным L-глутамином и 1 г/л D-глюкозы, эмбриональная телячья сыворотка, стрептомицин-пенициллин, трипсинс 0,05% ЭДТА: BioChrom или ПанЭко;

липополисахарид (LPS), тромбин, росиглитазон, актиномицинД: Sigma Aldrich, США; GW9662; росиглитазон: CaymannChemical, Эстония;

субстрат SuperSignal™ West Pico, субстрат SuperSignal™ Fempta; Syto59: Thermo FisherScientific, США;

реагент Брэдфорда;белковые маркеры Precision Plus Protein All Blue Standard (250-10 kDa);Трис-глициновыйбуфердляпереносабелков;Трис-глициновый буфер с ДСН для проведения электрофореза; буфер для нанесения образцов белка по Лэммли (Laemmli Sample Buffer): BioRad, США;

30% раствор мономеров акриламида/бисакриламида, обезжиренное молоко для блокирования мембран: Roth, Германия;

Cli-095, флагелин (FGL, сенная палочка), пептидогликан (PGN, сенная палочка) Invivogen, США;

SB 203580, Анизомидин, циклогексимид Calbiochem, Германия;

Bay 11-7085; маркеры длины ПЦР продуктов GeneRuler™ Fermentas; ингибиторы протеаз, реагент WST-1: Roche, Швейцария.

Антитела:

Первичные антитела, использованные для анализа экспрессии белков посредством иммуноблоттинга:

Табл. 2.1. Первичные антитела, использованные для иммуноблоттинга:

Антитело	Компания	Кат. Номер	MW (кДа)	Тип	Развед.
COX-2	Cell Signaling Technology	D5H5	74	кролик	1:2000
ТТР	Sigma Aldrich	SAB2102766	36	кролик	1:200
HUR	Cell Signaling Technology	D9W7E	30	кролик	1:1000
МКР1	Santa Cruz	sc-1199	40	кролик	1:200
фосфо-p38	Cell Signaling Technology	4511	43	кролик	1:1000
p38	Cell Signaling Technology	9212	43	кролик	1:1000
фосфо-JNK	Cell Signaling Technology	4668	46, 54	кролик	1:1000
JNK	Cell Signaling Technology	9252	46, 54	кролик	1:1000
β-тубулин	Millipore	05-661	57	мышь	1:10000

Вторичные антитела против кролика и мыши были приобретены в компании Dianova, Германия.

Для лазерной сканирующей конфокальной микроскопии были использованы антитела против HUR (1:500) и COX-2 (1:500), а также антитела против GFAP от компании Millipore (1:500). Вторичные антитела против кролика и против курицы были мечены флуорофорами Alexa-488 и Alexa-546, приобретены в ThermoFisherScientific, США.

Наборы:

набор для анализа высвобождения TNFα (RatTNFalphaELISAKit);

набор для анализа высвобождения IL10 (RatIL10 ELISAKit): LifeTechnologies, США;

набор First Strand cDNA Synthesis Kit; набор для синтеза кДНК iScript™; набор для ПЦР в режиме реального времени iQ™ SYBR®GreenSupermix: Bio-Rad, США;

набор Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2x): Thermo Fisher Scientific, США;

набор PowerLyzer RNA Isolation: Maxima, США;

набор RNeasy: Biotech Rabbit; набор Cytotoxicity Detection Kit (LDH): Roche, Швейцария;

набор для анализа высвобождения PGE₂ (Prostaglandin E₂ ELISAKit): Caymann Chemical, Эстония.

Растворы:

Выделение астроцитов:

Буфер Puck's, mM: 137,0 NaCl, 5,4 KCl, 0,2 KH₂PO₄, 0,17 Na₂HPO₄, 5,0 глюкоза, 58,4 сахароза, pH 7,4;

Иммуноблоттинг:

PBS (фосфатно-солевой буфер), mM: 137 NaCl, 2,7 KCl, 10 Na₂HPO₄, 2 KH₂PO₄, pH 7,4;

TBS (трисовый солевой буфер), mM: 40 NaCl, 3 KCl, 25 Tris, pH 7,4;

RIPA, mM: 20 Tris-HCl, 150 NaCl, 1 Na₂EDTA, 1% Nonidet P-40, 1% C₂₄H₃₉NaO₄, pH 7,5;

BSA: 1% раствор готовили из стока с большей концентрацией, исходя из расчета оптической плотности раствора, измеренной при длине волны 320 нм; итоговый раствор имел показатель оптической плотности 0,44 (что соответствует концентрации 1 г/л).

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия:

HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), 10X mM: 54,0 KCl, 4,4 KH₂PO₄, 3,4 Na₂HPO₄·2H₂O, 4,9 MgCl₂·2H₂O, 4,1 mM MgSO₄·7H₂O, 1,32 MNaCl, 100 mM HEPES;

LS (500 мл): 18,75 мл 4M NaCl, 20,83 мл 240 mM Na-Phosphate;

Na-Phosphate: Na₃PO₄ 240 mM;

HS (500 мл): 62,5 4M NaCl, 41,6 мл 240 mM Na-Phosphate;

FSBB (6 мл) 1 мл FBS, 0,5 мл 240 mM Na-Phosphate, 0,675 мл 4M NaCl, 0,18 мл Ttiton-X100.

2.2. Получение первичных культур астроцитов, культуры клеток линии С6 и стимуляции.

Первичные культуры астроцитов получали от новорожденных крысят линии Wistar, следуя одной из общепринятых методик. Животным проводили декаптацию в асептических условиях, из головного конца извлекали мозг. Мозг промывали в ледяном буферном растворе Puck's и перетирали сквозь сита с размерами ячеек 250 и 136 мкм, после чего фрагменты ткани помещали в культуральные флаконы. К материалу добавляли среду DMEM (1 г/л D-глюкозы, 10% FBS, антибиотики: стрептомицин 50 ед/мл, пенициллин 50 мкг/мл) после чего помещали в инкубатор при 37°C, 10% CO₂, влажности 10%. Спустя 5 суток после выделения культуры оттряхивали для удаления микроглии на ротационном шейкере (200 об/мин, 3 часа, 37°C) и меняли среду на свежую среду того же состава. Далее клетки культивировали в течение еще шести суток со сменой среды каждые двое суток. После получения монослоя культуры промывали теплым PBS и инкубировали с раствором трипсина с ЭДТА в течение 5 минут. Трипсинизацию останавливали добавлением среды с сывороткой, клетки отмывали от раствора фермента. Подсчет клеток проводили по образцу суспензии, обработанному трипановым синим, в камере NeubauerFineOptik (глубина 0,1 мм, длина стороны квадратной секции 0,1 мм). Учитывали количество клеток в 16 больших секциях.

Расчет количества клеток производили по формуле $x = n/16 \times 10000 \times F$, где x – искомая концентрация клеток (количество клеток в мл), n – число клеток в 16 квадратах, F – фактор разведения образца. Далее клетки рассаживали в шестилуночные культуральные планшеты в количестве 750 тыс. клеток в 3 мл среды в лунке и оставляли для прикрепления на 24 часа. После этого клеткам меняли среду на свежие порции DMEM с добавлением или без добавления липополисахарида (1, 10 или 100 нг/мл) в соответствии со схемами экспериментов, как далее указано в тексте. Далее клетки инкубировали в течение 46 часов. После этого среду во всех лунках заменяли на свежую DMEM без LPS. Через два часа после смены среды клетки стимулировали согласно протоколам экспериментов.

Культуры опухолевых клеток линии С6 были любезно предоставлены доктором Г. Райзером, директором института нейрехимии, университета Отто фон Герики, г. Магдебург, Германия. Клетки хранили в виде замороженных культур, культивировали в тех же условиях, которые указаны выше для астроцитов.

2.3. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Клетки рассаживали на чашки Петри со стеклянным дном (60 мм) в количестве 100000 в 300 мкл на стекло и оставляли для прикрепления на 2 часа при 37°C, 10% CO₂, влажности 10%. После этого удаляли среду с не прикрепившимися клетками и добавляли к клеткам свежую среду. Далее клетки инкубировали в соответствии со схемами экспериментов (как указано в тексте). После окончания периодов стимуляции остатки среды удаляли, клетки промывали теплым раствором HBSS и фиксировали в растворе 4% параформальдегида (15 минут при комнатной температуре). Далее клетки промывали растворами 120 mM фосфата натрия (10 минут), LS буфера (10 минут) и HS буфера (10 минут). После этого к клеткам добавляли блокирующий раствор, содержащий FBS и тритон X-100 (FSBB) (20 минут). Далее к клеткам добавляли первичные антитела (в растворе FSBB), инкубацию с антителами проводили в течение 12 часов на холоде (4°C). Затем клетки промывали тремя порциями буфера HS (по 10 минут) и инкубировали

с растворами вторичных антител в FSBB (1,5 часа, комнатная температура). Клетки далее отмывали от вторичных антител в порциях HS, LS буфера, раствора фосфата натрия 120 мМ (по 10 минут) и оставляли в 5 мМ растворе фосфата натрия до момента съемок. Ядро маркировали посредством добавления Syto59 при последней промывке клеток раствором HS. Визуализацию и фотосъемку проводили с использованием лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 (Carl Zeiss, Германия).

2.4. Иммуноблоттинг

После окончания периода стимуляции из планшетов удаляли среду, клетки трижды промывали ледяным PBS и в течение 10 минут лизировали в буфере RIPA (100 мкл) и переносили в 1,5 мл пробирки. Лизаты клеток далее инкубировали в ледяной бане с ультразвуковой обработкой (15 мин), встряхивали на шейкере и центрифугировали (10000 об/мин, 10 минут). Надосадочную жидкость отбирали в свежие пробирки. Концентрацию общего белка в пробах определяли в соответствии с классическим протоколом Брэдфорда, используя батарею разведений BSA в качестве количественного контроля. К лизатам добавляли буфер Лэммли для ДСН-электрофореза. Процедуры ДСН-электрофореза по Лэммли и переноса белка на мембраны проводили в соответствии с общепринятым протоколом. Для разделения белков использовали гели (разделяющие гели) с концентрацией мономеров 7% (для белков более 100 кДа), 10% (для белков в диапазоне 30-100 кДа) или 12,5% (для белков менее 20 кДа). Электрофорез проводили в условиях постоянного напряжения 80В. Для переноса использовали нитроцеллюлозные мембраны с размером пор 0,1 (для белков менее 20 кДа) или 0,2 мкм (для белков более 20 кДа) или PVDF мембраны (для детекции MKP1 и p38). Перенос проводили в условиях постоянного напряжения 20В в течение 1 часа. Качество переноса белка определяли посредством окрашивания мембраны раствором Ponceau S. Мембраны блокировали в буфере TBS с 5% обезжиренного молока и 0.05% Tween-20. Далее мембраны помещали в раствор TBST с

первичными антителами против соответствующих белков и инкубировали в течение 12 часов в холоде (4 °C) на шейкере. После отмывки и мечения мембран вторичными антителами их проявляли с использованием хемилюминисцентного субстрата Thermo Fisher Scientific. После анализа экспрессии циклооксигеназы мембраны обрабатывали буфером Restore Buffer (Thermo Fisher Scientific) и использовали для анализа экспрессии β -тубулина. Фотосъемку мембран проводили с применением камер Bio-Rad. Количественный анализ экспрессии проводили в приложении QuantityOne (Bio-Rad 4.6.9). В качестве контроля отрицательного контроля использовали значения, полученные для клеток, не подвергнутых стимуляции. При этом средний уровень экспрессии в контрольных клетках был принят за 1, а разброс значений среди измерений контрольных образцов представлен в виде долей от 1.

2.5. Выделение РНК, ОТ и ПЦР в режиме реального времени

Выделение тотальной мРНК производили с помощью наборов PowerLyzer RNA Isolation или RNeasy. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически. Для получения первой цепи кДНК использовали наборы для обратной транскрипции (ОТ) First Strand cDNA Synthesis Kit или iScript™. Реакции проводились в соответствии с рекомендациями производителей. Относительный уровень мРНК определяли методом ПЦР в реальном времени с помощью амплификатора DTLite 4 (ДНК-технология, Россия) или iCycler и набора Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix или iQ™ SYBR® Green Supermix. В одну реакционную смесь объемом 25 мкл брали 80 нг кДНК. Показатели экспрессии β -актина использовали для нормализации. В качестве контроля отрицательного контроля использовали значения, полученные для клеток, не подвергнутых стимуляции. При этом средний уровень экспрессии в контрольных клетках был принят за 1, а разброс значений среди измерений контрольных образцов представлен в виде долей от 1.

Для наработки фрагментов генов использовали следующие праймеры:

β-актин	прямой	5'-TCATCACTATCGGCAATGAGCGGT-3'
	обратный	5'-ACAGCACTGTGTTGGCATAGAGGT-3'
COX-2	прямой	5'-TGTACAAGCAGTGGCAAAGG-3'
	обратный	5'-TAGCATCTGGACGAGGCTTT-3'
HUR	прямой	5'AACCCCCGGGTTCCTCCGAG 3'
	обратный	5'CCGAGGAAGCATTGCCGGGG3'
IL10	прямой	5'GGGAGAGAAGCTGAAGACCC3'
	обратный	5'GTCCAGTAGATGCCGGGTG3'
PPARγ	прямой	5'CCTGAAGCTCCAAGAATACC-3'
	обратный	5'-GATGCTTTATCCCCACAGAC-3'
TNFα	прямой	5'-ACGTCGTAGCAAACCACCAA-3'
	обратный	5'-AAATGGCAAATCGGCTGAC-3'
TTP	прямой	5'-CAGCCTGACTTCTGCGAACCGA-3'
	обратный	5'-TGGCTCATCGACATAAGGCTCTCGT-3'

2.5.1. Анализ скорости деградации мРНК

Актиномицин представляет собой антибиотик, связывающийся с ДНК клетки и блокирующий транскрипцию. Вследствие этой активности, вещество используют для оценки скорости деградации мРНК, поскольку после добавления актиномицина Д изменение уровня мРНК определяется двумя факторами: 1) исходным уровнем транскрипта, 2) скоростью деградации мРНК.

Астроциты культивировали без дополнительных обработок, с добавлением LPS (100 нг/мл) на 1 час или в присутствии ингибитора SB203580 (ингибитор MAP p38, 20 мкМ, добавляли за 30 мин. до LPS) и липополисахарида (LPS, 100 нг/мл, 1 час). Клетки обрабатывали актиномицином Д (5 мкг/мл). Через указанные промежутки времени образцы собирали и уровни экспрессии мРНК TTP и HUR определяли методом ПЦР в реальном времени. За 100% в каждом случае принят уровень экспрессии мРНК TTP и HUR для клеток, не обработанных актиномицином, но стимулированных LPS, SB203580 и LPS или в астроцитах, не подвергнутых стимуляции (контроль). Время полужизни мРНК определяли как точку времени, после которой в клетке оставалось менее половины мРНК, детектированного в контроле.

2.6. Анализ высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

Среду отбирали из лунок и использовали для последующего анализа высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Уровень высвобождения ЛДГ определяли с помощью коммерческого набора Roche в соответствии с инструкциями производителя. В качестве положительного контроля в анализе использовали культуральную среду от клеток с лизированными мембранами вследствие добавления 0,1% раствора тритона X-100.

2.7. Анализ высвобождения TNF α и IL10

Среду отбирали из лунок и сохраняли для последующего анализа высвобождения цитокинов при -70°C. Уровень высвобождения TNF α и IL10 определяли с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа LifeTechnologies в соответствии с инструкциями производителя.

2.8. Анализ жизнеспособности культур с использованием реагента WST-1

Клетки рассаживали в 96 луночные планшеты в количестве 50,000 клеток в лунке в 200 мкл среды. Через 24 часа питательную среду в каждой лунке меняли на свежую (по 100 мкл на лунку) с добавлением исследуемых веществ. Через 48 часов к культурам добавляли реагент WST-1 (10 мкл на лунку). Клетки далее инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После инкубации измеряли поглощение в лунках при длине волны 450 нм. Анализ проводили в соответствии с инструкциями производителя.

2.9. Статистическая обработка

Все эксперименты воспроизводили три раза на культурах, полученных из трех независимых выделений. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Данные анализировали с помощью метода ANOVA. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05 (* - по отношению к контролю, $p < 0,05$).

2.10. Биоинформатический анализ данных о полногеномной экспрессии

Массив данных о полногеномной экспрессии генов в 276 образцах опухолевой ткани и 8 образцах здоровой ткани с исходным идентификационным номером GSE16011 был ранее подготовлен к анализу Ивлиевым А.Е. и доступен для скачивания на www.lipidomics.ru. Для проведения анализа из массива были отобраны образцы здорового мозга (контроль; 8 образцов), глиомы с наиболее благоприятным прогнозом (44 образца, обозначена в исходной работе как класс «*neural*»), медиана продолжительности жизни около 5 лет) и форма с наихудшим прогнозом (76 образцов, обозначена в исходной работе как «*mesenchymal*», медиана продолжительности жизни 0,6 года). Данные о принадлежности образцов к группам взяты из работы Ивлиева и соавторов (Ivliev et al., 2011).

Список участников и регуляторов пути TLR был составлен на основе данных KEGG, ресурса <http://www.sabiosciences.com> и публикации (Wang et al., 2009) – всего 122 гена. Поиск дифференциально экспрессирующихся генов был проведен в приложении MeV (TM4) с использованием теста Стьюдента с коррекцией Бонферрони для множественного сравнения ($p < 0,0033$ для попарных сравнений трех групп).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Характеристика острого воспалительного ответа в астроцитах

Анализ литературы показал, что астроциты обладают свойствами иммуннокомпетентных клеток и экспрессируют провоспалительные и противовоспалительные факторы, в том числе COX-2 и IL10. В то время как регуляция экспрессии COX-2 исследована сравнительно подробно, данных о регуляции TNF α значительно меньше, а сведения об экспрессии IL10 – важного участника завершения воспаления в астроцитах ограничены несколькими публикациями. Перед нами стояли задачи охарактеризовать влияние стимуляции LPS на синтез IL10; выявить механизмы регуляции экспрессии IL10 и COX-2; проанализировать участие фосфатазы MKP1 в отрицательной регуляции MAP киназы p38.

3.1.1. Влияние LPS на экспрессию COX-2, IL10 и TNF α

В качестве маркера воспалительного ответа в астроглиальных клетках использовали циклооксигеназу 2 (COX-2), так как: i) указанный фермент вовлечен в поддержание гомеостаза астроцитов и экспрессируется в фоновом режиме в нестимулированных клетках (Font-Nieves et al., 2012), ii) в астроглиальных клетках COX-2 индуцируется в ответ на провоспалительную стимуляцию, в том числе стимуляцию LPS (Font-Nieves et al., 2012; Jensen et al., 2013) и iii) в ходе воспалительного ответа COX-2 регулируется на уровне экспрессии мРНК, синтеза белка и выброса PGE₂ (Aleshin et al., 2009; Font-Nieves et al., 2012). Это позволяет использовать указанный маркер воспаления для оценки активации иммунного ответа на уровне транскрипции, трансляции и посттрансляционной регуляции. Однако COX-2 на самом деле является фактором, вовлеченным как в провоспалительный так и в противовоспалительный ответ. COX-2 является ключевым ферментом биохимической цепочки синтеза простагландинов, из которых

первичные простагландины (в том числе PGE₂) относятся к провоспалительным веществам, а вторичные простагландины (в первую очередь, циклопентеновые простагландины) относятся к важным веществам процессов резолюции (Сергеева, Варфоломеева, 2006). Для оценки участия COX-2 в провоспалительном ответе в рамках ключевых экспериментов мы анализировали выброс PGE₂ – продукта активности COX-2 с выраженной провоспалительной ролью и экспрессию TNF α .

В первую очередь мы проанализировали зависимость между уровнем экспрессии COX-2 и временем стимуляции LPS. Этот этап был необходим для того, чтобы определить оптимальное время для последующих анализов изменений в астроцитах. Ранее было показано, что LPS в концентрации 100 нг/мл вызывает выраженный клеточный ответ в астроглиальных клетках, при этом экспрессия мРНК COX-2 достигает максимума между 1 и 4 часами после добавления эндотоксина (Aleshin et al., 2009; Chistyakov et al., 2014; Font-Nieves et al., 2012). В астроглиальных культурах *Mus musculus* экспрессия белка COX-2 под воздействием липополисахарида в концентрации 10 нг/мл возрастала от 2 и вплоть до 24 часов после стимуляции (Font-Nieves et al., 2012). Отсутствие согласованности в литературных данных привело нас к необходимости проведения предварительных экспериментов. Для определения времени, оптимального для анализа клеточного ответа в рамках нашей модели воспаления, астроциты стимулировали LPS 100 нг/мл в течение разных промежутков времени. Клеточные лизаты далее собирали и посредством иммуноблоттинга анализировали экспрессию COX-2. Было получено, что изменение экспрессии COX-2 на уровне белка возможно детектировать после 2 часов стимуляции. Далее уровень фермента возрастал с максимумом между 12 и 24 часами и превышал значения базального уровня вплоть до точки равной 72 часам после обработки эндотоксином (рис. 3.1.).

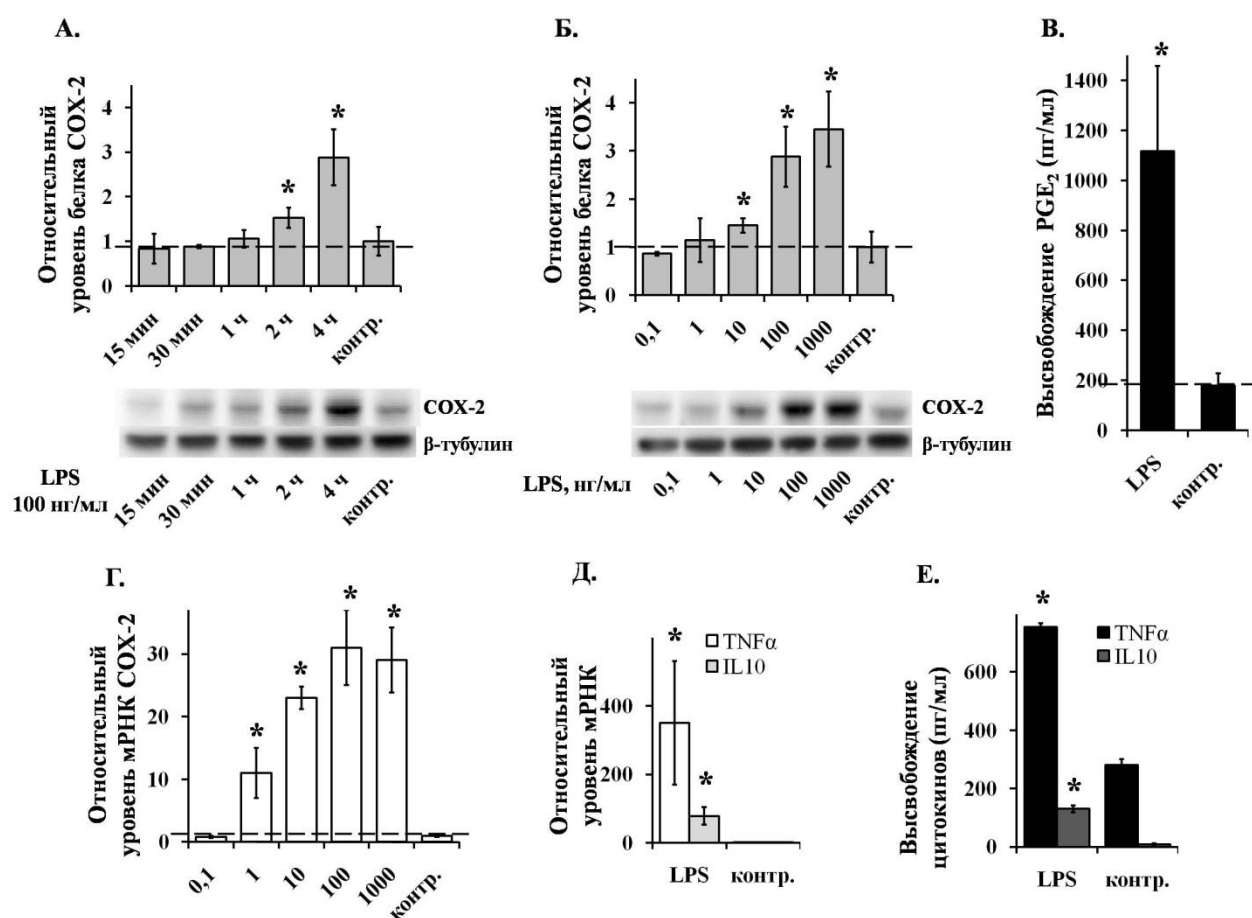


Рис. 3.1. Влияние LPS на экспрессию маркеров воспаления в астроцитах. Астроциты стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение разных промежутков времени (приведены в подписях оси абсцисс) (А) или LPS в разных концентрациях (приведены в подписях оси абсцисс) в течение 4 часов (Б, Г). Далее посредством иммуноблоттинга или ОТ/ПЦР-РВ определяли уровни экспрессии белка или мРНК COX-2. Уровни белка и мРНК в не подвергнутых стимуляции клетках (контроль) приняты за 1. Приведены типичные электрофореграммы и результаты денситометрии. (В, Д, Е) Астроциты инкубировали с LPS (LPS, 100 нг/мл, 4 часа) или не подвергали стимуляции (контроль). Концентрации высвобожденных IL10, TNFα или PGE₂ определяли посредством иммуноферментного анализа, используя образцы культуральной среды без клеток. Уровни экспрессии мРНК IL10, TNFα определяли посредством ОТ/ПЦР-РВ. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Данные результаты указывают на оптимальность временной точки равной 4 часам для последующих анализов изменения воспалительного ответа клеток. Этот выбор

обусловлен следующими аргументами: 1) относительно малый период для детекции ответа, что позволяет одновременно «захватить» изменения в экспрессии СОХ-2 и в экспрессии генов с меньшим временем индукции, 2) возможность детекции как снижения, так и повышения экспрессии белка по отношению к контролю и 3) наличие данных по воспалительному ответу в указанный временной промежуток (Aleshin et al., 2009; Chistyakov et al., 2014; Font-Nieves et al., 2012), что позволяет сопоставление получаемых данных с результатами прошлых исследований.

Далее мы провели общее описание ответа астроглиальных клеток при стимуляции LPS на временной точке равной 4 часам. Для этого, мы проанализировали зависимость величины ответа от концентрации эндотоксина – определили чувствительность астроцитов к эндотоксину. Клетки стимулировали LPS в концентрациях 0,1; 1; 10; 100 и 1000 нг/мл в течение 4 часов, после чего анализировали изменение экспрессии СОХ-2 на уровне мРНК и белка (рис. 3.1.). Получено, что концентрации LPS 10 нг/мл, 100 нг/мл и 1000 нг/мл вызывали примерно 25-30ти кратное увеличение мРНК СОХ-2, концентрации LPS 1 нг/мл стимулировали примерно 15ти кратное усиление экспрессии мРНК, в то время как концентрация LPS 0,1 нг/мл не вызывала детектируемых изменений в экспрессии СОХ-2 на уровне мРНК после 4х часов стимуляции. На уровне белка, минимальной концентрацией LPS, для которой после 4 часов отмечали эффект индукции экспрессии СОХ-2, была концентрация 10 нг/мл (примерно 1,5 кратное усиление экспрессии СОХ-2). Концентрация LPS 100 нг/мл вызывала примерно 3х кратное усиление экспрессии СОХ-2 и по силе эффекта не отличалась от воздействия LPS в концентрации 1000 нг/мл. Таким образом, в рамках нашей модели, концентрации LPS 0,1 и 1 нг/мл мы определяем как подпороговые, концентрацию 10 нг/мл считаем невысокой, а 100 нг/мл и 1000 нг/мл рассматриваем как варианты сильной стимуляции. Следует отметить, что согласно литературным данным LPS в концентрации 1000 нг/мл не вызывает апоптоза астроглиальных клеток, но индуцирует гибель других клеток нервной ткани и, следовательно, не подходит для

использования в рамках моделирования физиологически умеренного или сильного, но не экстремального воспалительного ответа в клеточных культурах нервной ткани (Carone et al., 2007; Caruso et al., 2007; Suk et al., 2001).

Далее мы оценили выброс PGE_2 и экспрессию провоспалительного цитокина $\text{TNF}\alpha$ и противовоспалительного цитокина IL10 на уровне мРНК и белка. Получено, что стимуляция астроглиальных клеток LPS приводила к усилению выброса PGE_2 примерно в 5 раз, а также индуцировала экспрессию мРНК и белка $\text{TNF}\alpha$ примерно в 350 и в 750 раз соответственно, а также мРНК и белка IL10 примерно в 130 и в 80 раз соответственно (рис. 3.1). Таким образом, ранние этапы клеточного ответа астроцитов на LPS возможно охарактеризовать как провоспалительный процесс, однако уже в это время начинается синтез противовоспалительных веществ. Это означает, что уже на ранних этапах воспаления активны процессы регуляции противовоспалительных механизмов.

3.1.2. Влияние стимуляции LPS на MAP киназы и MKP1

MAP киназы являются ключевыми регуляторами воспалительного ответа в иммунных клетках, поэтому на следующем этапе мы проанализировали изменение экспрессии и статуса фосфорилирования двух белков группы MAP киназ – JNK и p38 в условиях воспаления в астроцитах. Клетки стимулировали LPS в течение 2 и 4 часов эндотоксином, после чего посредством иммуноблоттинга анализировали экспрессию фосфорилированных и тотальных белков киназ (рис. 3.2.).

Получено, что стимуляция клеток LPS приводила к усилению экспрессии фосфорилированных форм JNK и p38, при этом уровни фосфорилированных белков после 2х часов обработки LPS были выше, чем уровни, которые наблюдали через 4 часа после добавления эндотоксина. Примечательно, стимуляция клеток при этом приводила к снижению экспрессии тотального белка JNK, в то время как уровень тотального белка p38 не изменялся под воздействием LPS (рис. 3.2.).

Следует отметить, что в ходе раннего провоспалительного ответа на макрофагах также наблюдали активацию JNK и p38 (Chan and Riches, 2001; Kim et al., 2012; Peng et al., 2003). Было показано, что фосфорилирование p38 достигало максимума через 30-60 минут после добавления LPS в макрофагах мыши и возвращалось в норму уже к 4 часам, а в некоторых моделях – уже через 1 час после стимуляции (Peirce et al., 2010; Peng et al., 2003; Tsai et al., 2015). В астроглиальных клетках уровни фосфорилированных MAP киназ оставались повышенными спустя даже 4 часа после добавления к клеткам эндотоксина. Таким образом, особой чертой активации MAP киназ в астроглиальных культурах является затяжной характер ответа. В связи с этим интересным представляется вопрос об отрицательной регуляции фосфорилирования MAP киназ в астроцитах.

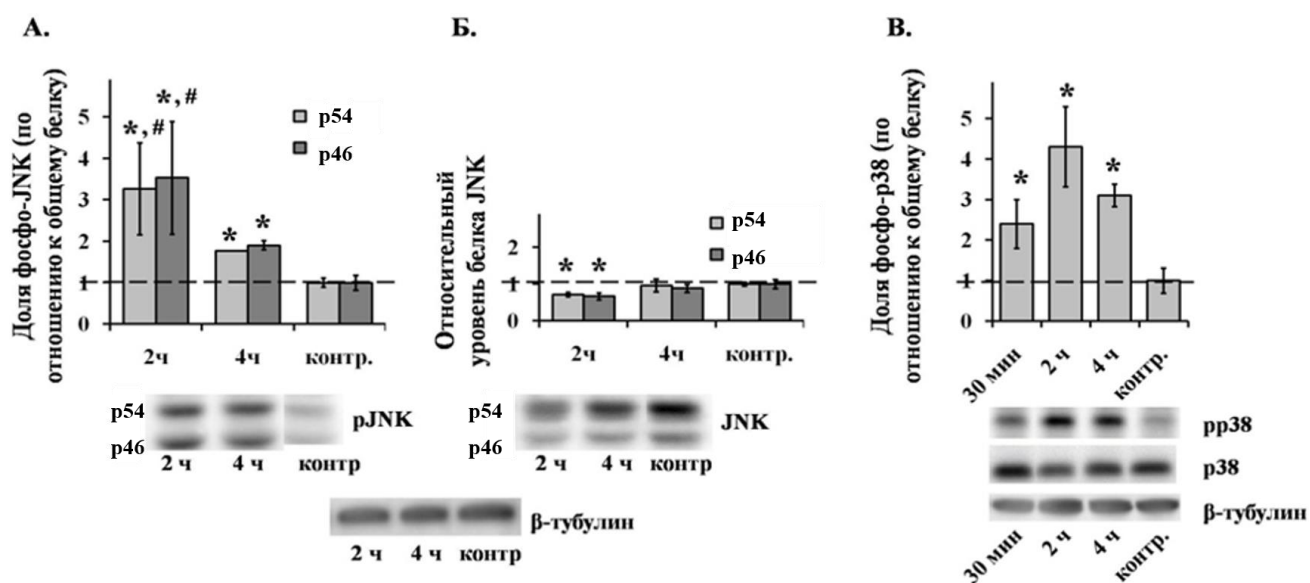


Рис. 3.2. Влияние LPS на экспрессию и фосфорилирование JNK (А) и p38 MAPK(Б).

Астроциты стимулировали LPS 100 нг/мл в течение 2 и 4 часов, посредством иммуноблоттинга определяли уровни фосфорилированных белков и полных форм белков JNK (А, Б) и p38 (В). Приведены типичные электрофореграммы и результаты денситометрии. Уровни белков в контрольных клетках приняты за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками, # $p < 0,05$ для данных, полученных после 2 и после 4 часов обработки LPS. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Главным отрицательным регулятором p38 MAP киназ на всех исследованных до настоящего времени клетках считают белок MKP1 (DUSP1) (см. подробнее в главе 1.2.4). Однако, участие MKP1 в регуляции MAP киназ в ходе TLR-4 опосредованного ответа ранее исследовано не было.

Для проверки нашего предположения, мы проанализировали экспрессию белка MKP1 в астроцитах при обработке клеток LPS. Клетки обрабатывали эндотоксином (100 нг/мл) в течение разных периодов времени, уровень экспрессии оценивали методом иммуноблоттинга. Для проверки корректности работы антитела мы также провели иммуномаркирование лизатов HeLa клеток (контроль, рекомендованный производителем антител). Результаты теста с HeLa подтвердили корректность работы антитела. Однако результаты анализа кинетики экспрессии MKP1 не продемонстрировали изменения фосфатазы после выбранных периодов стимуляции LPS. Следует отметить, что изменение экспрессии MKP1 также не было выявлено после 48 часов инкубации астроцитов с LPS (рис. 3.3), что не соответствовало данным о накоплении белка в клетках в условиях длительной провоспалительной стимуляции (Nimah et al., 2005). Мы предположили, что вероятным объяснением может быть недостаточная чувствительность антитела к MKP1 крыс. Следует отметить, что использованное нами антитело было приобретено в компании SantaCruz, именно его использовали авторы других работ, посвященных исследованиям MKP1 в первичных астроцитах крыс (Lee et al., 2012; Lee et al., 2008; Woo et al., 2015). Тем не менее, картины иммуноокрашивания, получаемые с указанным реактивом имели невысокое качество, хотя и соответствовали картинам иммуноблоттинга, представленным в указанных референсных публикациях (Lee et al., 2012; Lee et al., 2008; Woo et al., 2015). Для того, чтобы убедиться в корректности получаемых данных, использовали другой подход. Мы проанализировали влияние триптолида – вещества, которое используют в качестве ингибитора MKP1 на уровень фосфорилирования p38 (см. подробнее в главе 1.2.4). Астроциты обрабатывали триптолидом в диапазоне концентраций от 0,1 до 1000 нг/мл (что соответствует диапазону от 0,277 нМ до

2,77 мкМ) без или с добавлением LPS 100 нг/мл в течение 1,5 часов и проанализировали изменения в экспрессии MKP1 и фосфорилировании p38. Было получено, что обработка клеток триптолидом не индуцировала фосфорилирование p38 в астроцитах, а добавление триптолида в комбинации с LPS не отличалось по эффекту от добавления LPS без триптолида (рис. 3.3.).

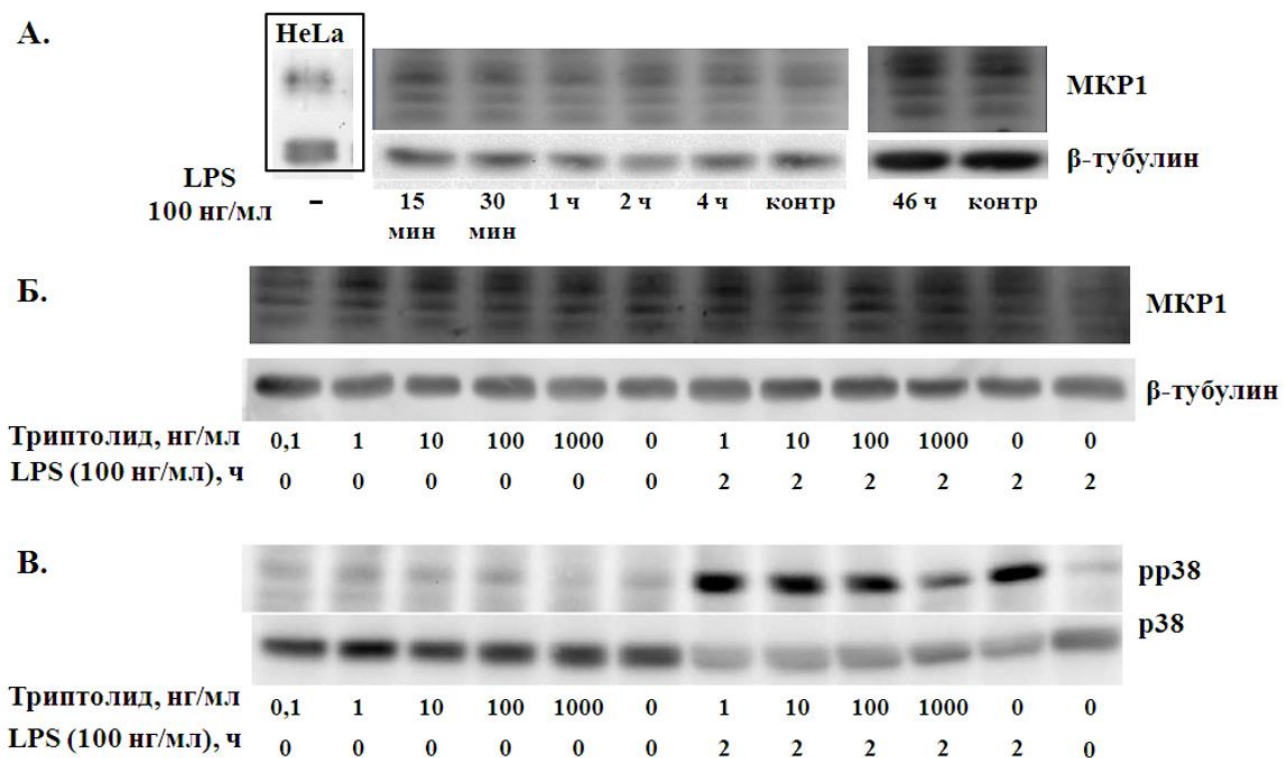


Рис. 3.3. Влияние LPS и триптолида на экспрессию белка MKP1 и фосфорилирование p38.

(А) Астроциты стимулировали LPS (100 нг/мл) и через указанные промежутки времени уровень белка MKP1 определяли посредством иммуноблоттинга, в качестве положительного контроля для оценки работоспособности антитела против MKP1 использовали тотальные лизаты нестимулированных клеток HeLa (выделено рамкой). (Б, В) Астроциты инкубировали с триптолидом в указанных концентрациях в течение 30 минут, после чего на 2 часа к клеткам добавляли LPS 100 нг/мл или продолжали инкубацию последующие 2 часа без дополнительных обработок. Посредством иммуноблоттинга определяли уровни экспрессии MKP1, фосфорилированной формы p38 и всего p38. Приведены типичные электрофореграммы. Уровень белка в контрольных клетках принят за 1.

Следует также отметить, что использование высоких доз антибиотика (1000 нг/мл) приводило к снижению уровня фосфорилированного p38 (рис. 3.3). Согласно данным иммуноблоттинга добавление триптолида также не влияло на экспрессию MKP1 (рис. 3.3). В совокупности наши результаты указывают на то, что MKP1 не вовлечен в процессы отрицательной регуляции p38 в условиях стимуляции клеток эндотоксином. Тем не менее, наши данные не позволяют утверждать, что MKP1 не задействован в регуляции фосфорилирования p38 в условиях отсутствия стимуляции LPS. Отсутствие изменений в экспрессии MKP1 под воздействием триптолида в течение 2 часов может свидетельствовать о том, что белок MKP1 в астроцитах имеет стабильность, превышающую 2 часа (время эксперимента), в таком случае имеющегося фермента могло хватить для обеспечения нормального уровня фосфорилированного p38. Действительно, показано, что время полужизни белка MKP1 составляет примерно 3 часа (Lee et al., 2012; Woo et al., 2015). Таким образом, остается открытым вопрос о том, участвует ли MKP1 в дефосфорилировании p38 в условиях без стимуляции LPS. Поиск ответа на этот вопрос требует проведения дополнительных анализов и использования других подходов. В целом наши данные не подтверждают участия MKP1 в отрицательной регуляции p38 в астроцитах в условиях воспаления. Это указывает на особенности протекания воспалительного ответа в астроцитах по сравнению с макрофагами.

3.1.3. Регуляции экспрессии COX-2 и IL10 в условиях острого воспаления

Механизмы регуляции экспрессии IL10 в условиях воспалительного ответа на уровне клеток практически не исследованы. Мы предположили, что противовоспалительный ответ в астроцитах регулируют те же механизмы, которые вовлечены в регуляцию провоспалительного ответа. То есть, за контроль экспрессии IL10 отвечают те же механизмы, которые регулируют экспрессию COX-2. Для проверки этого предположения мы выделили несколько блоков молекулярных механизмов, которые согласно литературным данным регулируют

экспрессию циклооксигеназы 2: 1) блок регуляции активности MAP киназ p38 и JNK (ингибиторы SB203580 и SP600125, активатор – анизомидин); 2) блок регуляции NF-κB (Bay 11-7085); 3) блок регуляции PPARγ (агонист росиглитазон и антагонист GW9662). В ряде работ было показано участие этих механизмов в регуляции экспрессии COX-2 на уровне мРНК и белка в астроцитах или иных клетках. Так, подавление MAPK и NF-κB приводило к ингибированию синтеза мРНК и белка COX-2 (Font-Nieves et al., 2012; Ulivi et al., 2008b), активация MAPK под воздействием сорбитола или анизомидина усиливала экспрессию мРНК COX-2 (Shafer and Slice, 2005), а обработка клеток росиглитазоном усиливала стимулированную LPS экспрессию фермента (Aleshin et al., 2009; Aleshin et al., 2013).

Принимая во внимание указанные данные, мы проверили влияние SB203580, SP600125 и анизомидина на LPS-индуцированную экспрессию COX-2 и IL10 в астроцитах.

На этапе, предшествующем собственно анализу, провели подбор подходящей концентрации анизомидина и проверили влияние выбранной концентрации анизомидина и SB203580 на фосфорилирование MAPK p38 (рис. 3.4.). Этот шаг имел принципиальное значение в связи с тем, что известно побочное действие анизомидина – ингибирование трансляции (Hazzalin et al., 1998). Подавление трансляции само по себе приводит к усилению экспрессии ряда генов, в том числе COX-2, это явление известно, как «супериндукция» (Faggioli et al., 1997; Hershko et al., 2004; Newton et al., 1997). Принято считать, что концентрации анизомидина менее 1 мкг/мл не блокируют трансляцию (Yang et al., 2012). В связи с этим крайне важно применять анизомидин в минимальных концентрациях. Для выбора подходящей концентрации мы простимулировали клетки анизомидином в концентрациях 0,001; 0,01; 0,1 и 1 мкг/мл и сравнили влияние этих обработок на фосфорилирование p38 с эффектом от стимуляции клеток LPS 100 нг/мл. Наши результаты показывают, что усиление фосфорилирования p38 происходит при обработке клеток анизомидином в концентрациях 0,1 и 1 мкг/мл. При этом уровни

фосфо-p38, наблюдаемые при обработке клеток анизимицином в концентрации 1 мкг/мл, сопоставимы с уровнями, индуцируемыми обработкой LPS 100 нг/мл (рис. 3.4.). Далее, мы проверили, как влияет добавление SB203580 на индукцию фосфорилирования p38 под воздействием LPS и анизимицина. Наши результаты демонстрируют, что обработка клеток 20 мкМ SB203580, предшествующая добавлению анизимицина или LPS, снимает эффект фосфорилирования. Таким образом, мы выбрали концентрацию анизимицина, равную 1 мкг/мл и концентрацию SB203580 равную 20 мкМ.

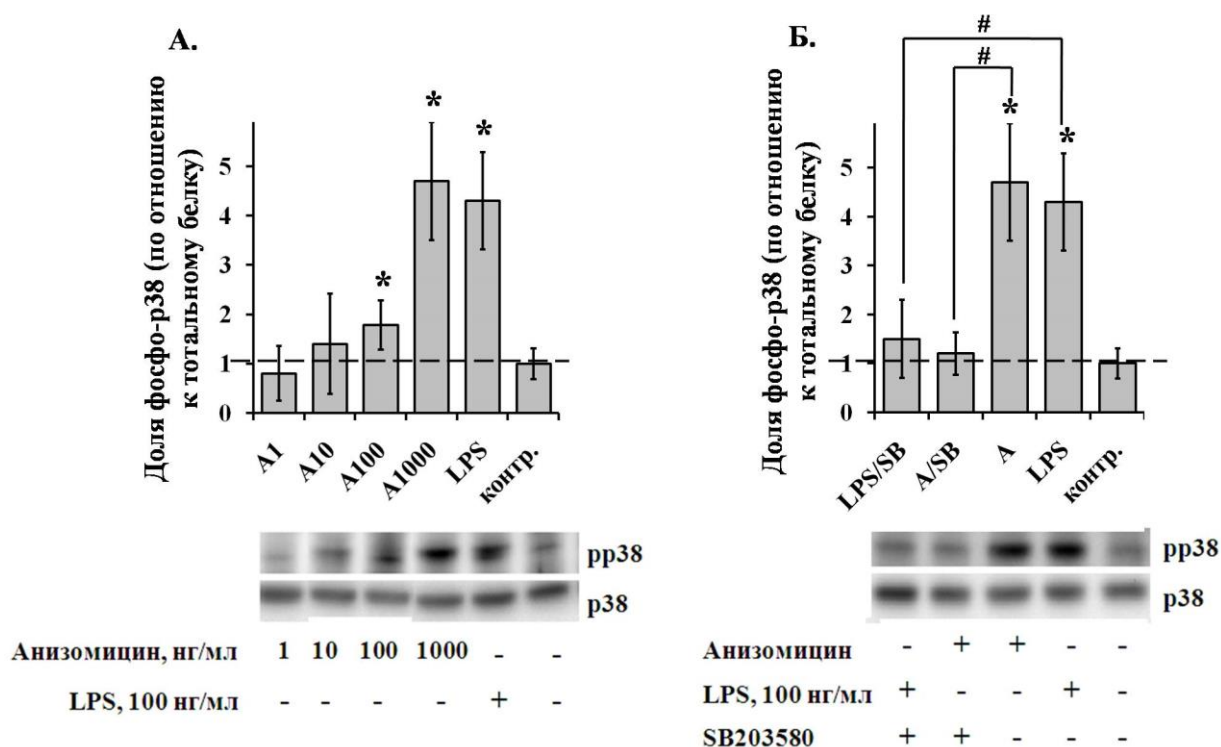


Рис. 3.4. Влияние анизимицина, SB203580 и LPS на фосфорилирование p38 в астроцитах. (А) Астроциты стимулировали LPS (100 нг/мл) или анизимицином (0,01, 0,1 или 1 мкг/мл) в течение 2 часов. (Б) Клетки инкубировали с SB203580 20 мкМ в течение 15 мин, далее в течение 2 часов стимулировали LPS 100 нг/мл или анизимицином 1 мкг/мл. После этого посредством иммуноблоттинга определяли уровни фосфорилированного p38 и всего белка p38 в культурах. Значения, полученные при измерении уровней фосфобелка нормировали на значения, полученные для тотального белка. Приведена типичная электрофореграмма и результаты денситометрии. Уровень белка в контрольных клетках принят за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками.

Обработка клеток SB203580 (ингибитором MAPK p38) и SP600125 (ингибитором JNK) приводила к подавлению индукции COX-2 под воздействием LPS (рис. 3.5.). При этом добавление ингибиторов по отдельности снижало экспрессию COX-2 лишь частично (примерно в 2 раза от величины, наблюдаемой при обработке клеток LPS без добавления ингибиторов). Совместное добавление агентов полностью блокировало рост экспрессии фермента (рис. 3.5.). Данные эффекты прослеживали также на уровне выброса PGE₂ (рис. 3.5.). Обработка клеток анизомидом в отсутствие LPS не влияла на уровень экспрессируемого белка. Однако обработка астроцитов анизомидом и LPS вопреки ожиданиям приводила не к усилению, а, наоборот, к полной блокировке синтеза COX-2. Добавление SB203580 не снимало ингибиторный эффект анизомидина (рис. 3.5.). Данные эффекты анизомидина и ингибитора p38 были отмечены и при анализе выброса PGE₂ (рис. 3.5.). Мы проверили, как влияет анизомидин на экспрессию мРНК COX-2. Для оценки вклада супериндукции в изменение экспрессии COX-2, мы также проанализировали эффект обработки клеток циклогексимидом. Наши результаты (рис. 3.5.) демонстрируют, что добавление анизомидина стимулировало мощный рост в экспрессии COX-2 более, чем в 200 раз. В то же время, обработка клеток циклогексимидом – другим блокатором трансляции – приводила лишь к примерно 30-ти кратному усилению экспрессии COX-2. Влияние анизомидина на индукцию экспрессии мРНК COX-2 существенно, но не полностью снижалось при добавлении SB203580 (рост мРНК COX-2 при сочетанном добавлении SB203580 и анизомидина составлял примерно 40 раз по отношению к контролю). Таким образом, полученные данные указывают на участие p38 в усилении экспрессии мРНК COX-2 (разница между уровнями COX-2 при обработке циклогексимидом и анизомидом), однако не позволяют отвергнуть предположение о том, что ингибирование COX-2 на уровне белка под воздействием анизомидина является результатом блокировки трансляции, несмотря на минимальность выбранной

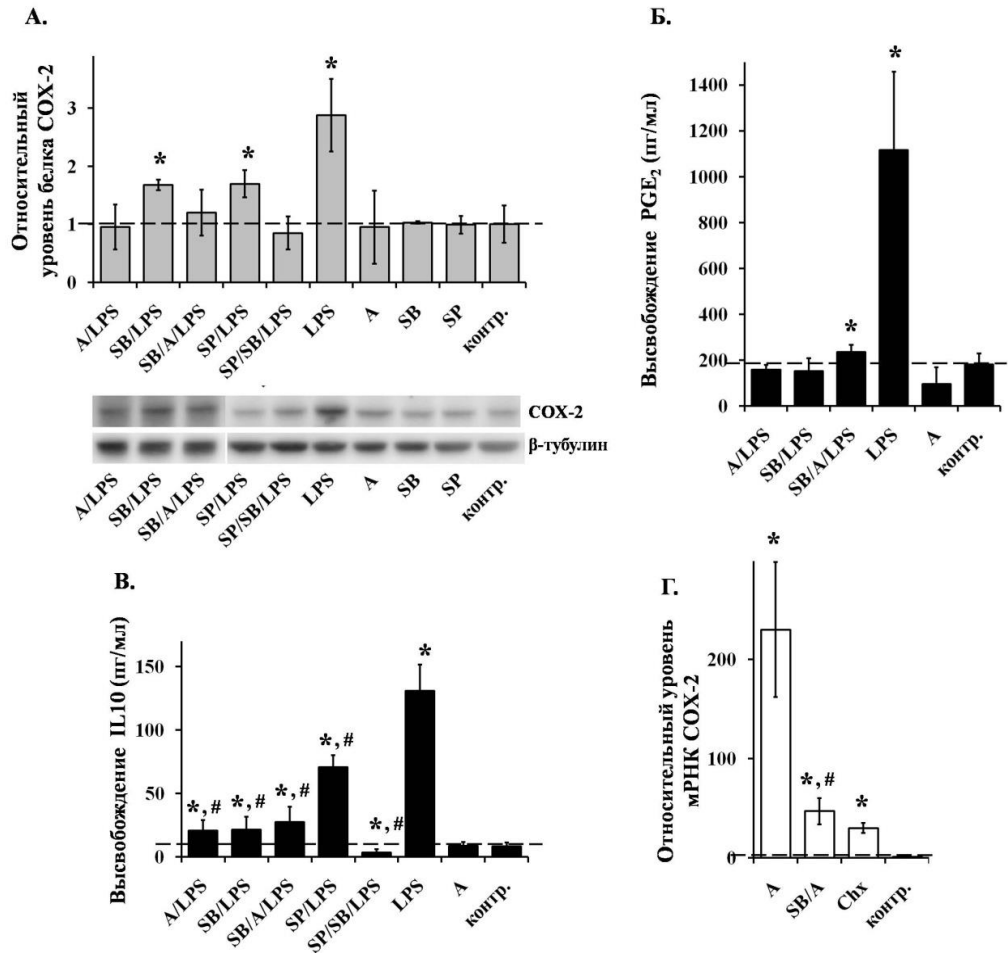


Рис. 3.5. Влияние SB203580, SP600125, анннзомицина, циклогексимида и LPS на экспрессию и активность COX-2, высвобождение IL10. Астроциты стимулировали SB203580 (SB, 20 мкМ, 30 мин до LPS), SP600125 (SP, 10 мкМ, 30 мин до LPS), аннзомицином (А, 1 мкг/мл, 15 мин до LPS), циклогексимидом (5 мкг/мл), LPS (100 нг/мл, 4 часа) или их комбинациями. Посредством иммуноблоттинга определяли уровни экспрессии белка COX-2 (А), посредством иммуноферментного анализа определяли уровни высвобождения PGE₂ (Б) или IL10 (В). Посредством ПЦР в режиме реального времени определяли уровни экспрессии мРНК COX-2 (Г). Все эксперименты проводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

концентрации аннзомицина. Действительно, в одной из работ (Sidhu and Omiecinski, 1998) было показано снижение белкового синтеза более, чем в 2 раза при обработке клеток 1 мкг/мл аннзомицина. С другой стороны, было показано, что аннзомицин

в концентрации 1 мкг/мл не подавляет синтез белков в астроглиальных клетках (Yang et al., 2012). Полученные результаты могут быть объяснены посредством активации дополнительных ветвей сигнальных путей воспаления, которые к настоящему времени не исследованы. В основе этого предположения лежат данные о том, что и анизомицин, и SB203580 усиливают фосфорилирование субъединиц TAK1/TAB1/TAB2 киназы (Cheung et al., 2003b; Wolf et al., 2011) (рис. 1.2. и 1.3.). Примечательно, что фосфорилирование этих белков по разным позициям может приводить как активации нижележащих сигнальных путей, так и заглушать сигнал внутри каскада MAPK (Cheung et al., 2003b; Wolf et al., 2011).

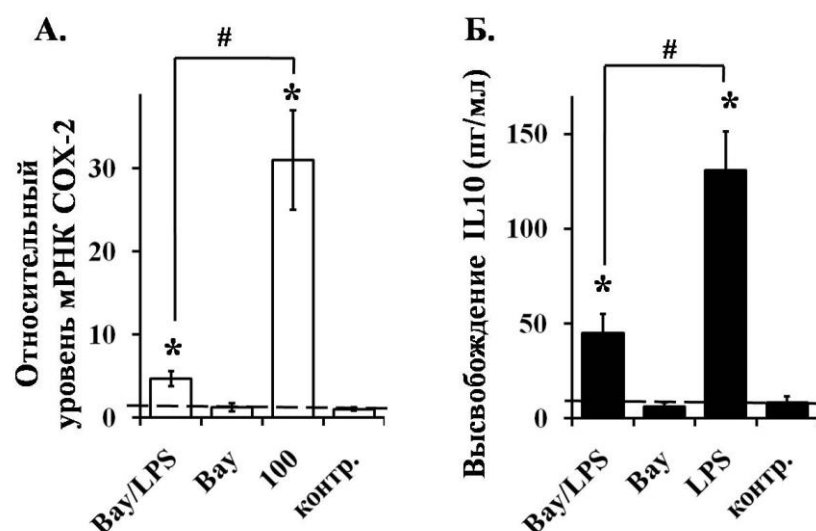


Рис. 3.6. Влияние ингибитора NF-κB на экспрессию мРНК COX-2 и высвобождение IL10. Астроциты стимулировали Bay 11-7085 (Bay, 5 мкМ, 30 мин до LPS) и обрабатывали LPS (100 нг/мл). Посредством ПЦР в режиме реального времени определяли уровни экспрессии мРНК COX-2 (А). Посредством иммуноферментного анализа определяли уровни высвобождения IL10 (Б). Все эксперименты проводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Далее мы проверили участие MAP киназ в регуляции экспрессии IL10. Ингибирование киназ p38 и JNK приводило к снижению уровня экспрессии IL10 в ходе воспалительного ответа (Рис. 3.5). При этом, как и в случае с COX-2, обработка клеток SB203580 или SP600125 приводила к частичному подавлению

ответа IL10, в то время как сочетанное добавление ингибиторов полностью блокировало экспрессию белка. Добавление анизомидина самостоятельно или анизомидина в сочетании с SB203580 также приводило к снижению экспрессии IL10.

Добавление ингибитора NF- κ B Bay 11-7085 приводило к снижению уровней COX-2 и IL10, индуцируемых LPS (рис. 3.6).

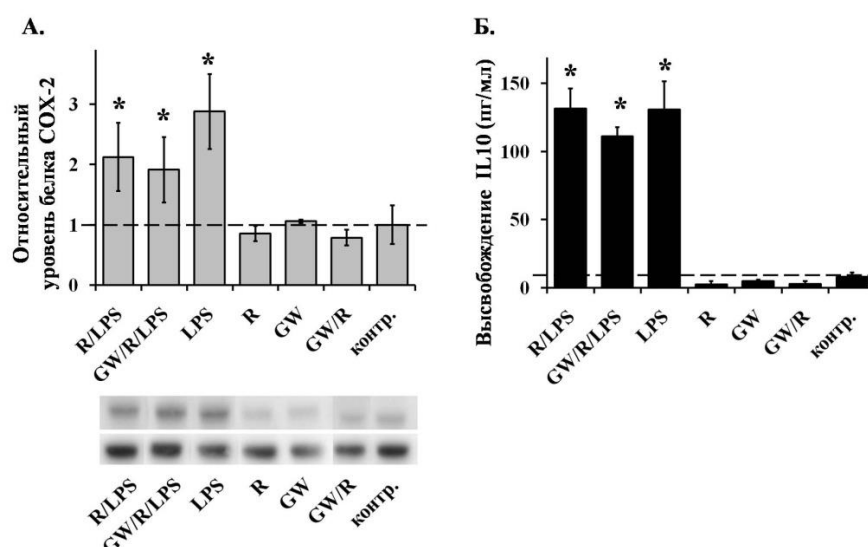


Рис. 3.7. Влияние росиглитазона, GW9662 и LPS на экспрессию COX-2 и высвобождение IL10. Астроциты стимулировали росиглитазоном (R, 20 нМ, 15 мин до LPS), GW9662 (GW, 10 мкМ, 30 мин до LPS), LPS (100 нг/мл, 4 часа) или их комбинациями и посредством иммуноблоттинга определяли уровни экспрессии белка COX-2 (А), посредством иммуноферментного анализа определяли уровни высвобождения IL10 (Б). Все эксперименты проводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Ранее было показано участие PPAR γ в регуляции COX-2 в астроглиальных клетках (Aleshin et al., 2009). Кроме того, имеющиеся в настоящее время данные указывают на вовлеченность активации PPAR γ в разрешение воспаления (Penas et al., 2015). Поэтому мы решили проверить, влияет ли регуляция активности PPAR γ на экспрессию IL10 в ходе воспалительного ответа в астроцитах. Мы оценили влияние воздействием росиглитазона и ингибитора GW9662 не оказывала влияния

на индукцию экспрессии белка COX-2 (рис. 3.7). Это довольно любопытный результат, поскольку известно, что обработка клеток росиглитазоном приводит к усилению экспрессии COX-2 даже в отсутствие LPS и усиливает эффект эндотоксина при сочетанной с LPS обработке (Aleshin et al., 2009). Одним из объяснений наблюдаемых расхождений может быть использование среды с разным уровнем глюкозы в разных экспериментальных моделях. Действительно, результаты, полученные Алешиным и соавторами (Aleshin et al., 2009; Aleshin et al., 2013; Sergeeva et al., 2010) характеризуют астроциты, содержащиеся в высокой глюкозе (4,5 г/л D-глюкозы), в то же время известно, что PPAR γ является одним из ключевых участников метаболизма глюкозы и липидов, и, соответственно, может себя иначе вести в условиях с высоким или низким содержанием углевода. Для IL10 также не было выявлено изменений экспрессии при стимуляции клеток в сочетании с модуляторами активности PPAR γ (рис. 3.7).

В целом, полученные данные указывают на то, что в регуляцию экспрессии COX-2 и IL10 в условиях острого воспалительного ответа вовлечены одни и те же механизмы. Следовательно, активация провоспалительных сигнальных каскадов обеспечивается одновременно с запуском и путей противовоспалительного блока.

На первом этапе исследований были сделаны следующие выводы:

1) Обработка астроцитов LPS в течение 4 часов приводит к усилению экспрессии COX-2, TNF α и IL10. Усиление экспрессии COX-2 сопровождается увеличением выброса PGE₂, что указывает на провоспалительный характер ранних этапов клеточного ответа.

2) MAP киназы p38 и JNK активируются в ответ на стимуляцию TLR-4; фосфатаза MKP1 не изменяется под воздействием обработки LPS.

3) В регуляцию экспрессии IL10 и COX-2 на ранних этапах обработки вовлечены механизмы сигнальных каскадов MAP киназ и NF- κ B; росиглитазон не оказывает влияния на экспрессию исследованных молекул.

3.2. Экспрессия и регуляция TTP и HUR

Ранее было показано, что в астроцитах экспрессируются компоненты системы ARE-опосредованной регуляции стабильности мРНК, однако данные о них носили разрозненный характер. Изменение в поведении TTP и HUR в астроцитах в условиях воспалительного ответа ранее проанализировано не было. Далее мы сосредоточили внимание на вопросах экспрессии и регуляции TTP и HUR в астроцитах при их стимуляции LPS.

3.2.1. Исследование экспрессии генов врожденного иммунитета методами биоинформатики

Интенсивные исследования последних лет привели к накоплению большого числа данных об экспрессии генов на полногеномном уровне (данные транскриптомного анализа). Результаты таких исследований находятся в открытом доступе и могут быть использованы для соотнесения данных, получаемых в условиях экспериментальных моделей с процессами, протекающими в рамках реальных патологий. Кроме того, эти результаты можно использовать для предварительной оценки перспективности проведения последующих *in vitro* анализов. В рамках данной работы мы использовали данные о полногеномной экспрессии в опухолях головного мозга – глиомах, представлены в виде массива GSE16011, доступного для скачивания в базе GEO datasets (Gravendeel et al., 2009). Ранее этот массив был использован для анализа молекулярных механизмов, характеризующих патологию (Gravendeel et al., 2009; Ivliev et al., 2010, 2013). Среди полученных результатов интересным является выявленная взаимосвязь между изменениями экспрессии группы генов, связанных с процессами врожденного иммунитета и прогнозом по продолжительности жизни у пациента (Ivliev et al., 2010). Мы сформулировали следующие вопросы, ответы на которые мог дать анализ указанного массива. 1) Как отличается экспрессия компонентов сигнального пути TLR-рецепторов между образцами здорового мозга и двумя

формами глиом с относительно благоприятным и плохим прогнозом лечения? 2) Изменяется ли экспрессия генов TTP и HUR в указанных группах образцов?

Из 148 участников TLR пути, список которых был собран на основании данных базы KEGG, ресурса <http://www.sabiosciences.com> и публикации (Wang et al., 2009), 31 не изменил экспрессию в обоих классах глиом. Оставшиеся 117 компонента пути включают гены, которые изменили уровень экспрессии: 1) у образцов обеих групп глиом по сравнению с контролем; 2) только у одной из групп глиом по сравнению с контролем; 3) только между образцами глиом (таблица 3.1.).

Таблица 3.1. Изменение экспрессии генов*, кодирующих компоненты TLR пути в глиомах с относительно благоприятным и крайне

Гены, не изменившие свою экспрессию:	AKT2, CD80, ATF2, ELK1, IFNA1, IFNA2, IFNA5, IFNA7, IFNA8, IFNA16, IFNB1, IRF5, LBP, MAP3K3, NFKB2, PIK3CB, MAPK1, MAP2K2, MAP2K6, EIF2AK2, LAMF1, MAP3K7, PIK3R3, TNFRSF10A, PGLYRP1, RIPK3, PIK3R5, TLR9, TLR10, ICAM1, C22orf40,
Гены, изменившие свою экспрессию только в одном из классов глиом:	IFNA6, PIK3R1, MAPK11, NR2C2, TAB1, IRG1, EP300, IL12A, PIK3CA, PIK3R2, PPARA, PTPN11, SARM1, ECSIT, PELI2, ATF3, BCL3, CD14, CD40, MAP3K8, IL1B, IL6, IL8, CXCL10, JUN, CD180, PIK3CG, MAP2K3, PTGS2, PTPN6, RELB, SPP1, STAT1, TLR2, TLR5, TRAF6, SOCS1, TNFSF10, TMED1, LY96, TLR7, TLR8, TICAM2, CYLD, IRAK2, NFKBIB, PIK3CD, MAPK13, TBK1, SIGIRR, AKT1, MAPK14, IFNAR1, IRAK3, CD83, CREB1, TNF, OTUD5
Гены, изменившие экспрессию в обоих классах:	RIPK2, PAG1, PELI1, MAPK3, MAPK9, MAPK10, MAP2K4, TOLLIP, PELI3, BTK, CASP8, CD86, CTSK, FOS, IL18, IRAK1, IRF7, CXCL9, MYD88, NFKB1, REL, CCL5, TLR1, TLR3, TNFAIP3, RIPK1, FADD, MAP3K14, IKBKE, TANK, IRAK4, NOD2, IRF8, IFNAR2, IKBKB, MAP3K1, NFKBIA, RELA, CCL4, TLR4, TAB2, RNF216, PIN1, MAP2K1,

*номенклатура генов приведена в виде официальных имен, принятых для генов человека, в соответствии с обозначениями в базе <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

Анализ полученных данных позволил сделать заключения: 1) повышение экспрессии CD14 и TLR рецепторов (гены TLR1-8) отличает группы опухолей с относительно благоприятным и относительно неблагоприятным прогнозом; 2)

многие участники пути, имеющие повышенную (MyD88, IRAK1 и др.) или пониженную (TOLLIP, NFKB1 и др.) экспрессию в группе с более благоприятным прогнозом по сравнению с контролем, имеют еще более повышенную или пониженную экспрессию в более агрессивной форме рака. Полученные результаты согласуются с представлениями о специфическом участии сигнального пути TLR рецепторов в развитии глиом различной степени тяжести (Ivliev et al., 2010).

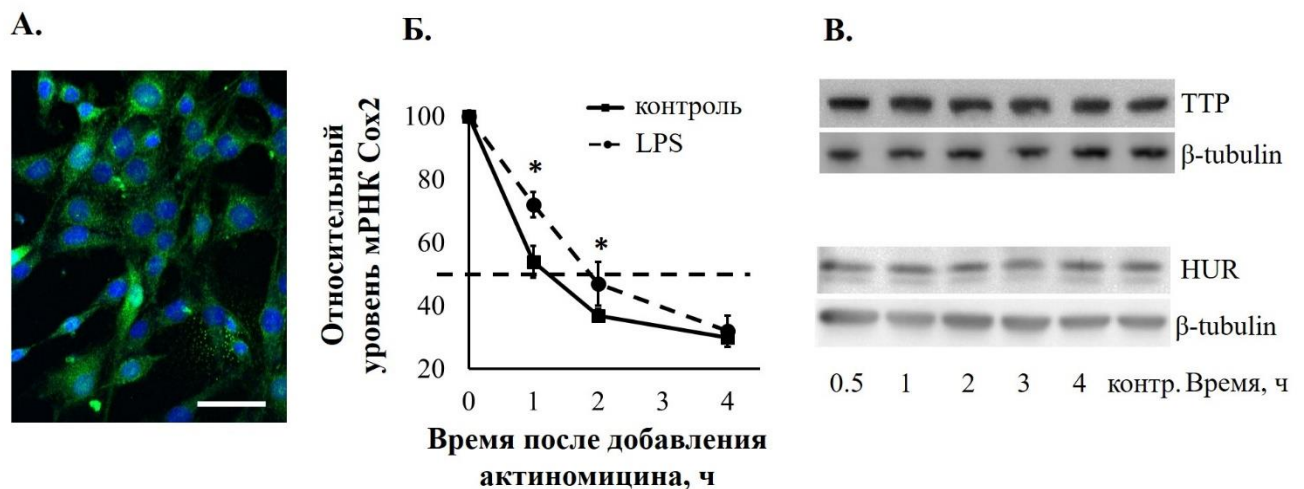


Рис. 3.8. Экспрессия GFAP, изменение стабильности мРНК COX-2 и изменение экспрессии TTP и HUR в опухолевых клетках С6 под воздействием LPS.

(А) Клетки опухолевой линии С6 фиксировали и обрабатывали антителом против GFAP (обозначен зеленым), ДНК маркировали посредством Syto56 (обозначен синим), масштабная линейка обозначает отрезок, соответствующий 5 мкм. (Б) Клетки С6 культивировали без дополнительных обработок (контроль, черная сплошная линия), или с добавлением LPS (1000 нг/мл) на 1 час (пунктирная линия). Затем клетки обрабатывали актиномицином Д (5 мкг/мл). Через указанные промежутки времени образцы собирали и уровни экспрессии мРНК COX-2 определяли методом ПЦР в реальном времени. За 100% в каждом случае принят уровень экспрессии мРНК для клеток, не обработанных актиномицином, но стимулированных LPS (пунктирная линия) или в клетках, не подвергнутых стимуляции (контроль). Все эксперименты воспроизводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. (В) клетки стимулировали LPS (1000 нг/мл) в течение указанных периодов времени, после чего собирали лизаты клеток и согласно протоколам иммуноблоттинга измеряли относительную экспрессию белков TTP и HUR в образцах. Контрольные культуры не подвергались стимуляции LPS. Все эксперименты воспроизводили три раза.

Анализ дифференциальной экспрессии HUR и TTP продемонстрировал, что экспрессия мРНК HUR не была изменена в обоих классах глиом по сравнению с контролем, а экспрессия мРНК TTP выросла примерно в 3,2 раза в классе глиом с неблагоприятным прогнозом (продолжительность жизни менее 1 года после операции).

Стоит отметить, что глиомы представляют собой сложные клеточные ассоциации, в состав которых помимо перерожденных клеток астроглиального происхождения также входят клетки миелоидного и лимфоидного происхождения, мигрирующие сюда в ходе ответа организма на разрастание опухоли. В связи с этим встает вопрос, насколько процессы изменения системы регуляции стабильности мРНК соотносятся с собственно опухолевыми клетками? Для поиска ответа на этот вопрос, мы решили проверить, как влияет провоспалительная стимуляция на изменение стабильности ARE-содержащей мРНК, кодирующей COX-2 и как изменяется экспрессии HUR и TTP на уровне белка в опухолевых клетках С6, которые рассматривают в качестве модельных клеток астроцитов (например, Adronetto et al., 2013). Для того, чтобы подтвердить сходство между культурой С6 и астроглиальными клетками мы провели иммуномаркирование культуры опухолевых клеток антителом против GFAP. Результаты представлены на рисунке 3.8.

Согласно данным, полученным нами, опухолевые клетки линии С6 экспрессируют маркер астроглиальных клеток – белок GFAP (рис. 3.8 А). При этом, стимуляция клеток LPS существенно изменяет стабильность мРНК COX-2: в условиях без добавления провоспалительного стимула время полужизни молекулы (то есть, время, после которого в клетке остается не более 50% от исходной мРНК COX-2) составило примерно 1,2 часа, а после добавления провоспалительного стимула возросло до приблизительно 1,8 часа (рис. 3.8 Б). Однако, нам не удалось выявить изменения в экспрессии HUR или TTP при стимуляции клеток LPS в течение 4 часов (рис. 3.8 С). Таким образом, в опухолевых клетках линии С6 провоспалительная стимуляция вызывает изменение стабильности ARE-

содержащих мРНК, однако не влияет на экспрессию на уровне белка ключевых регуляторов этой системы – белков HUR и TTP.

Оставался открытым вопрос о роли этих белков на нетрансформированных клетках глии, поэтому далее мы сосредоточили внимание на анализе поведения HUR и TTP в первичных астроцитах в условиях провоспалительной стимуляции.

3.2.2. Экспрессия TTP и HUR на уровне мРНК

Для выявления роли ARE-белков в регуляции воспалительных ответов в астроцитах мы провели анализ экспрессии генов на уровне мРНК через 1 и 4 часа после стимуляции клеток LPS (100 нг/мл). Результаты показали, что уровни мРНК TTP в культурах астроцитов после 1 часа стимуляции эндотоксином превышали контрольные приблизительно в 15 раз, в то время как через 4 ч уровни экспрессии TTP были повышены примерно в 7 раз по отношению к контролю (не стимулированным клеткам) (рис. 3.9.). Изменения экспрессии HUR выявлено не было (рис. 3.9.).

Для ответа на вопрос изменяется ли экспрессия TTP и HUR под воздействием других провоспалительных стимулов мы обработали клетки разными провоспалительными агентами (АТФ, пептидогликаном, флагеллосиалином, тромбином) и оценили экспрессию TTP через 4 часа после стимуляции. Экспрессия TTP возрастала в ответ на все указанные обработки, однако разные агенты вызывали разное по величине усиление экспрессии TTP. Наиболее выраженный ответ был получен при использовании LPS. Экспрессия HUR не изменялась при обработке клеток всеми указанными агентами (рис. 3.9.).

Для ответа на вопрос, как зависит величина экспрессии TTP и HUR от концентрации LPS, клетки стимулировали LPS в концентрациях от 0,1 до 1000 нг/мл в течение 4 часов, после чего определяли уровни экспрессии TTP и HUR. Согласно полученным результатам, концентрация эндотоксина, равная 0,1 нг/мл, уже стимулировала двукратное усиление экспрессии TTP, а концентрации в

диапазоне 1-1000 нг/мл вызывали усиление экспрессии примерно в 8 раз и не различались между собой по величине эффекта. Указанные концентрации LPS не приводили к изменению экспрессии HUR (рис. 3.9.).

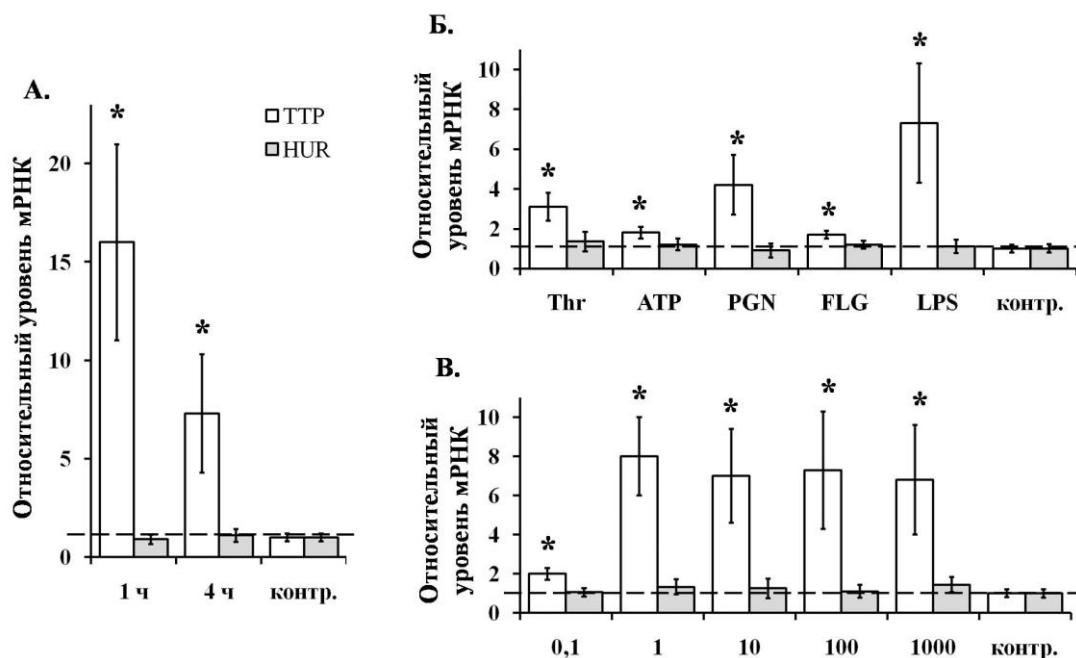


Рис. 3.9. Влияние LPS, тромбина, АТФ, пептидогликана, и флагеллина на экспрессию мРНК TTP и HUR. (А) Клетки обрабатывали LPS в концентрации 100 нг/мл в течение 1 или 4 часов. (Б) Астроциты инкубировали 4 часа с агонистами Толл-подобных рецепторов: липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл, TLR-4); пептидогликаном (PGN, 5 мкг/мл, TLR1/2) и флагеллином (FGL, 5 мкг/мл, TLR5), с TLR-независимыми провоспалительными стимуляторами: тромбином (Thr, 1 ед/мл) или АТФ (ATP, 10 нМ) (В) Астроциты стимулировали LPS в разных концентрациях (0,1, 1, 10, 100 и 1000 нг/мл) в течение 4 часов. Посредством ПЦР в режиме реального времени определяли уровень мРНК. Уровень мРНК в контрольных клетках принят за 1. Все эксперименты воспроизводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками, Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Таким образом, индукция экспрессии TTP в астроцитах является общей характеристикой ранних этапов провоспалительных реакций в астроцитах и имеет максимальную величину при стимуляции клеток LPS. Воспалительная стимуляция астроцитов не влияет на уровни экспрессии HUR (рис. 3.9.).

3.2.3. Регуляция TTP и HUR на уровне мРНК

Далее мы исследовали механизмы, которые могут участвовать в контроле экспрессии TTP и HUR в астроглиальных клетках. Для проверки вовлеченности TLR-4 в индукцию экспрессии TTP при стимуляции липополисахаридом клетки инкубировали с антагонистом TLR-4 Cli-095 в течение 30 минут до стимуляции LPS. Эффект добавления Cli-095 к астроцитам оценивали посредством анализа экспрессии COX-2. Было получено, что добавление 5 мкМ Cli-095 снимает эффект индукции циклооксигеназы 2 под воздействием LPS (рис. 3.10). Измеренные уровни экспрессии сравнивали с уровнями экспрессии гена в не стимулированных клетках (отрицательный контроль) и в клетках, стимулированных LPS без обработки Cli-095 (положительный контроль). Результаты анализа подтвердили снижение экспрессии TTP в LPS стимулированных культурах при предварительной обработке клеток антагонистом TLR-4 (рис. 3.10).

В регуляции экспрессии TTP и HUR в ряде клеток задействован белок p38 (Brook et al., 2006; Kim et al., 2008; Tchen et al., 2004), однако эти данные были получены для клеток миелоидного происхождения. Оставался открытым вопрос, играет ли роль белок p38 в регуляции TTP и HUR на астроцитах. Мы проверили, как изменится экспрессия мРНК генов при добавлении к культурам активатора или ингибитора фосфорилирования p38. Клетки стимулировали анизимицином, SB203580 или их комбинацией (SB203580 добавляли к клеткам за 15 минут до стимуляции культур анизимицином), изменение экспрессии оценивали через 4 часа после добавления агентов. Согласно полученным данным, анизимицин усиливал экспрессию мРНК TTP примерно в 45 раз и экспрессию HUR в 3 раза (рис. 3.10). Этот эффект существенно снижался при добавлении к клеткам SB203580 – до 8 раз для TTP и в 1,8 раз для HUR в культурах с сочетанной обработкой. Примечательно, добавление SB203580 отдельно также снижало экспрессию TTP примерно на 25% от уровня в контрольных образцах, но не влияло на уровень экспрессии HUR (рис.

3.10). Эти результаты указывают на участие фосфорилированного белка в регуляции фоновой экспрессии TTP.

Для проверки предположения о том, что эффект анизомидина на экспрессию TTP и HUR мог быть обусловлен подавлением синтеза какого-то отрицательного регулятора транскрипции (см. литобзор главу 1.2.4), мы проанализировали, как влияет на экспрессию гена другой блокатор трансляции – циклогексимид. Получено, что добавление циклогексимида также приводит к индукции экспрессии мРНК TTP и HUR (рис. 3.10). Однако стимуляция циклогексимидом индуцировала экспрессию TTP лишь приблизительно в 10 раз (в сравнении с 45 кратной индукцией в случае инкубации с анизомидином). В целом, меньший эффект циклогексимида и существенное снижение эффекта анизомидина при добавлении SB203580 указывают на то, что фосфорилирование p38, а не отмена негативной регуляции транскрипции TTP, вовлечено в контроль экспрессии TTP на уровне мРНК. Экспрессия HUR усиливалась под воздействием циклогексимида, однако значимых отличий от эффекта анизомидина выявлено не было (рис. 3.10). Полученные результаты указывают на то, что p38 является регулятором экспрессии TTP и HUR. Кроме того, данные результаты указывают на то, что исследованные гены относятся к генам, для которых известно явление супериндукции. Это согласуется с данными, известными для регуляции TTP в макрофагах и указывает их сходство с макрофагами (Smoak and Cidlowski, 2006).

Известно, что киназа p38 является ключевым регулятором скорости деградации так называемых ARE-содержащих мРНК. Однако HUR и TTP являются не только участниками, но также и мишенями этой системы регуляции. Действительно, транскрипты TTP и HUR содержат ARE-последовательности и могут связываться с белками TTP и HUR. Изменяется ли стабильность мРНК TTP и HUR под воздействием провоспалительной стимуляции? Одним из наиболее используемых протоколов определения скорости деградации мРНК является метод обработки клеток актиномицином Д – антибиотиком, блокирующим транскрипцию за счет неселективного связывания с ДНК. Обработка клеток актиномицином Д

позволяет определить, какая доля транскрипта разрушается за определенный период после блокировки транскрипции. В результате использования разных периодов инкубации клеток с актиномицином Д, таким образом, можно построить кривую деградации мРНК и определить время полужизни мРНК – период времени, за который уровень транскрипта сокращается в два раза.

Для определения скорости деградации мРНК ТТР и HUR клетки обрабатывали актиномицином Д в течение 30 минут, 1 часа, 2 часов, 4 часов. Кривые уровней мРНК строили для следующих культур: 1) астроциты без дополнительных обработок (скорость деградации мРНК в контрольных клетках); 2) астроциты, обработанные LPS (100 нг/мл) в течение 1 часа (скорость деградации мРНК в условиях воспаления); 3) астроциты, обработанные SB203580 и LPS 100 нг/мл. Получено, что уровень мРНК ТТР изменялся более, чем в пять раз (менее 20% от исходного) уже через 30 минут после добавления к клеткам актиномицина Д (период полужизни составлял около 10 минут) (рис. 3.11.).

Обработка клеток LPS увеличивала уровень транскрипта до 40% через 30 минут после добавления актиномицина Д (время полужизни примерно 25 минут). Однако этот эффект снимался при ингибировании p38. Таким образом, полученные результаты указывают на высокую скорость деградации мРНК ТТР в астроцитах и усиление стабильности транскрипта в условиях воспалительного ответа в p38-зависимой форме.

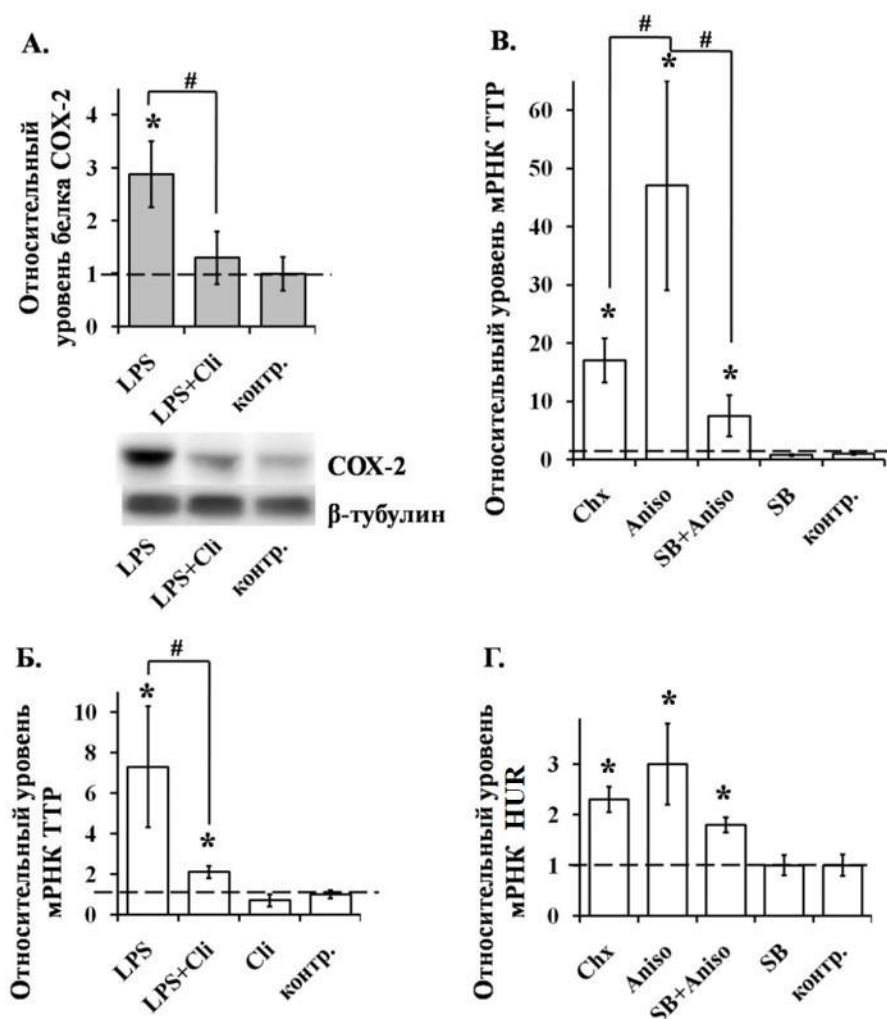


Рис. 3.10. Влияние Cli-095, SB203580 и аннизомицина на экспрессию мРНК TTP и HUR. (А, Б) Астроциты инкубировали с Cli-095 (Cli, 5 мкМ, 30 мин до LPS) и LPS (100 нг/мл, 4 часа). (В, Г) клетки инкубировали с SB203580 (SB, 20 мкМ), аннизомицином (А, 1 мкг/мл), комбинацией SB203580 и аннизомицина (SB203580 добавляли за 15 минут до аннизомицина) или циклогексимином (5 мкг/мл) в течение 4 часов с указанными веществами. Посредством иммуноблоттинга определяли уровни экспрессии COX-2. Посредством ПЦР в режиме реального времени определяли уровни экспрессии мРНК. Уровень белка или мРНК в контрольных клетках принят за 1. Все эксперименты воспроизводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

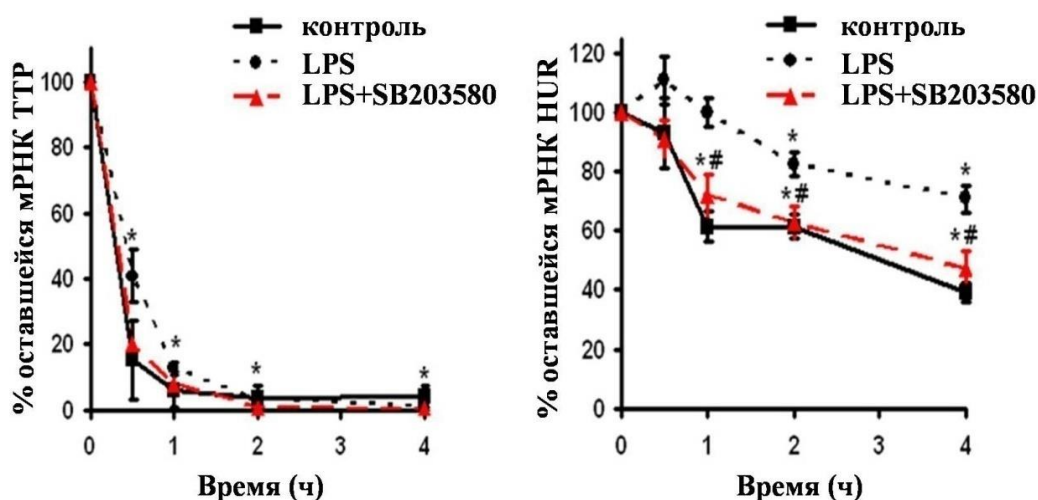


Рис. 3.11. Влияние ингибирования p38 MAPK и добавления LPS на скорость деградации мРНК ТТР и HUR. Астроциты культивировали без дополнительных обработок (контроль, черная сплошная линия), с добавлением LPS (100 нг/мл) на 1 час (пунктирная линия) или обрабатывали ингибитором SB203580 (ингибитор MAPK p38, 20 мкМ) и липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) (красная линия). Затем клетки обрабатывали актиномицином Д (5 мкг/мл). Через указанные промежутки времени образцы собирали и уровни экспрессии мРНК ТТР и HUR определяли методом ПЦР в реальном времени. За 100% в каждом случае принят уровень экспрессии мРНК ТТР и HUR для клеток, не обработанных актиномицином, но стимулированных LPS (пунктирная линия), SB203580 и LPS (красная линия) или в астроцитах, не подвергнутых стимуляции (контроль). Все эксперименты воспроизводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

В отличие от ТТР, HUR имеет гораздо более стабильные транскрипты. Действительно, уровень мРНК HUR падал до 50% только через 3 часа после добавления актиномицина. Добавление к клеткам LPS усиливало стабильность матрицы – период полужизни мРНК составлял более 4 часов (рис. 3.11.).

3.2.4. Регуляция ТТР и HUR на уровне белка

Следующим шагом в данной работе было проследить изменение экспрессии ТТР и HUR на уровне белка. Астроциты инкубировали с LPS (100 нг/мл) в течение

разных периодов времени и анализировали посредством иммуноблоттинга. К нашему удивлению, мы не выявили изменений экспрессии белков TTP и HUR в течение 4 часов (рис. 3.12). В то же время, было получено, что использование LPS в концентрации 1000 нг/мл индуцировало усиление экспрессии белка HUR, однако не влияло на уровень белка TTP.

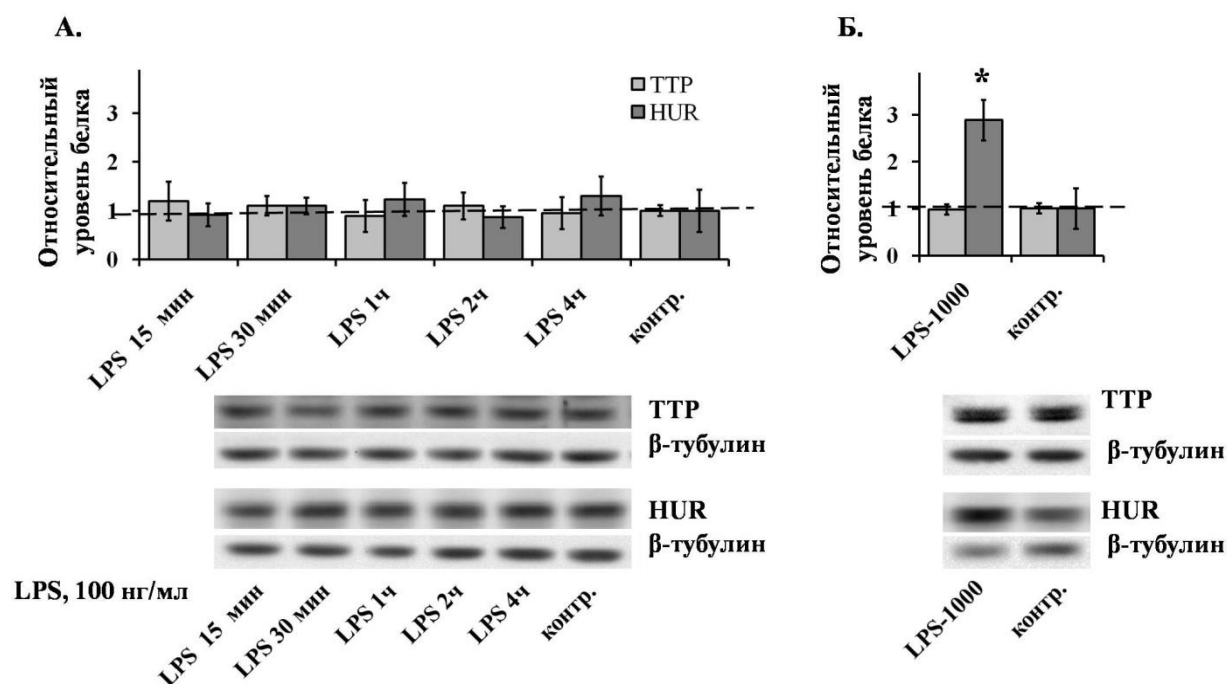


Рис. 3.12. Влияние LPS на экспрессию белка TTP и HUR. Клетки обрабатывали LPS в концентрации 100 нг/мл в течение указанных промежутков времени или LPS в концентрации 1 мкг/мл (LPS-1000) в течение 4 часов. После этого посредством иммуноблоттинга определяли уровни TTP и HUR в культурах. Приведены типичные электрофореграммы и результаты денситометрии. Уровень белка в контрольных клетках принят за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками.

Известно, что одним из уровней регуляции активности HUR является контроль локализации белка (Kim et al., 2008). Считается, что HUR связывается с мРНК генов-мишеней в ходе транскрипции и вместе с матрицей покидает ядро, обеспечивая стабилизацию матриц. Для проверки вовлеченности этого уровня регуляции в контроль активности HUR в астроцитах, обработанных LPS, мы проанализировали внутриклеточную локализацию белка через 15 и 60 минут после

стимуляции. Получено, плотность иммуномаркирования ядер заметно снижалась спустя 60 минут после добавления LPS (рис. 3.13).

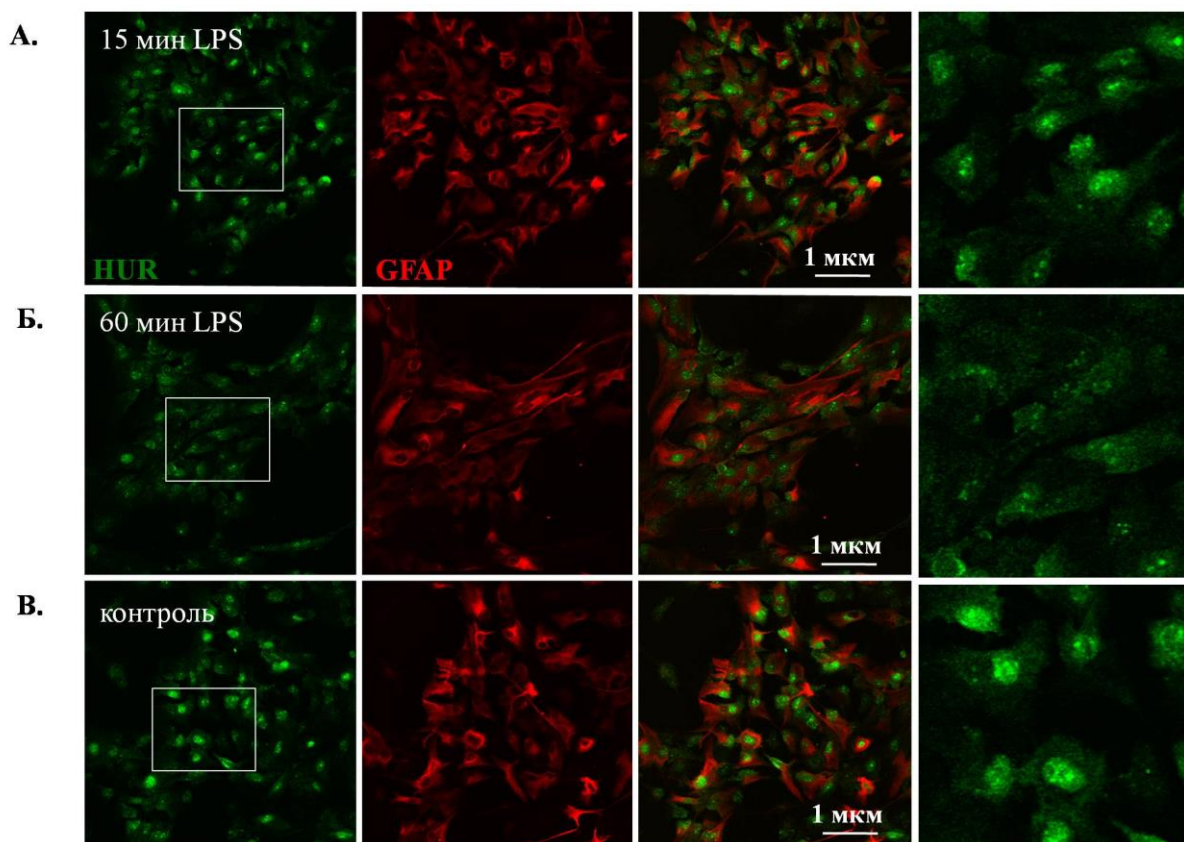


Рис. 3.13. Влияние стимуляции LPS на локализацию HUR в астроглиальных клетках. Астроциты инкубировали с LPS 100 нг/мл в течение 15 минут (А) или 1 часа (Б). в качестве контроля были использованы клетки, не обработанные LPS (В). После этого клетки фиксировали и обрабатывали в соответствии с протоколом иммуноокрашивания с маркированием белков HUR (зеленый) и GFAP (красный) соответствующими антителами. Представлены типичные фотографии культур.

Полученные картины иммуномаркирования клеток антителом против HUR согласуются с данными, полученными ранее для астроцитов, обработанных $\text{IFN}\gamma$ в сочетании с ETYA (Lee et al., 2012). Результаты указывают на то, что в ходе воспалительного ответа HUR регулируется на уровне внутриклеточной локализации, как в других клетках, однако, по-видимому, не изменяет уровень экспрессии в ходе физиологического воспалительного ответа.

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

4. В ходе воспалительного ответа в астроцитах усиливается экспрессия мРНК TTP, однако не происходит ее трансляции в белок. Экспрессия мРНК HUR остается неизменной в ходе воспалительного ответа, но высокие концентрации LPS могут стимулировать экспрессию белка HUR. Обработка LPS стимулирует выход белка HUR из ядра.

5. Экспрессии мРНК TTP зависит от активности MAP киназы p38, HUR и TTP регулируются на уровне стабилизации мРНК в ходе воспалительного ответа.

3.3. Характеристика ответа астроцитов на двукратную стимуляцию LPS

Известно, что развитие ответа врожденного иммунитета оказывает влияние на реакцию организма на последующие, повторные провоспалительные стимуляции. Это влияние выражается в изменении чувствительности отдельных ветвей сигнальных каскадов иммунного ответа. Молекулярный механизм этого явления остается малоизученным. На уровне экспрессии это выражается в усилении («сенситизации») или подавлении («толеризации») производства определенных маркеров воспаления, например, $\text{TNF}\alpha$, IL6, COX-2 в ответ на повторные стимуляции. Толеризация и сенситизация экспрессии генов были ранее продемонстрированы для макрофагов, нейтрофилов, фибробластов и др. клеточных типов в рамках модели так называемой «эндотоксиновой толерантности» (см. главу 1.4). Репрограммирование воспалительного ответа при двукратной стимуляции было показано и для астроцитов, однако в целом, как было указано в литературном обзоре, это состояние осталось неизученным. В связи с этим мы поставили вопросы, как предшествующая стимуляция влияет на иммунный ответ астроглиальных клеток на последующие стимулы, и какие механизмы регулируют экспрессию генов при втором контакте клеток с воспалительным стимулом.

Мы использовали модель двукратной стимуляции астроглиальных клеток. Первый стимул был представлен эндотоксином, концентрация которого варьировала от 0,1 до 100 нг/мл, что будет уточнено далее. Продолжительность

первой стимуляции была выбрана равной 46 часам. Ранее было показано, что этого времени достаточно для того, чтобы ключевые процессы в клетках пришли в состояние равновесия после стресса (Dillingh et al., 2014). В качестве второй стимуляции использовали добавление LPS в концентрации 100 нг/мл на 4 часа или на другое время, что указано в описании эксперимента. Общая схема обработок в рамках моделей острого воспалительного ответа (ответа на однократную обработку) и ответа астроцитов на двукратные стимуляции приведена на рис. 3.14.



Рис. 3.14. Схема стимуляции и обозначений. Схема представляет обобщение протоколов обработок клеток и поясняет краткие обозначения моделей, использованные далее в тексте и подписях к иллюстрациям. Вкратце, клетки рассаживали в культуральную посуду (культуральные планшеты или чашки Петри) и оставляли на 24 часа для прикрепления. Далее, производили смену среды и инкубировали клетки в течение последующих 46 часов. В рамках модели двукратной стимуляции клетки культивировали в присутствии LPS (стимуляция №1), в условиях модели острого воспаления (однократной стимуляции) и в контрольных образцах клетки культивировали в среде без эндотоксина. Далее производили смену среды (во всех случаях на среду без LPS) и через 2 часа клетки обрабатывали в соответствии со схемами экспериментов. Обозначения обработок построены по схеме «концентрация LPS при стимуляции №1 (нг/мл) /Сокращенные обозначения модуляторов/концентрация LPS при стимуляции №2 (нг/мл)».

3.3.1. Влияние длительной провоспалительной стимуляции на экспрессию и активность COX-2

Ранее было показано, что экспрессия COX-2 может усиливаться при длительной (48 часов) обработке LPS в концентрации 1 нг/мл у клеток миелоидного

происхождения (Mendez et al., 2011). Поскольку мы использовали COX-2 как провоспалительный маркер, нам было важно понять, как он ведет себя при повторных стимуляциях, в условиях, когда первая стимуляция представлена разными концентрациями эндотоксина. Поэтому, в первую очередь мы проанализировали влияние продолжительной провоспалительной стимуляции подпорогового, низкого или высокого уровня на последующую активацию иммунного ответа в астроцитах. Клетки инкубировали с LPS в концентрациях 0,1, 1 (подпороговые концентрации), 10 (низкая концентрация) и 100 нг/мл в течение 46 часов. После этого культуры стимулировали LPS в концентрации 100 нг/мл, далее посредством иммуноблоттинга анализировали экспрессию COX-2. Клетки, стимулированные однократно (0/100), использовали как положительный контроль, не подвергнутые стимуляции клетки (0/0) использовали как отрицательный контроль. Получено, что длительная обработка клеток LPS в концентрациях 0,1 и 1 нг/мл (0,1/100 и 1/100) не приводила к изменению уровня экспрессии COX-2 в ответ на повторную стимуляцию по сравнению с культурами, однократно стимулированными LPS в концентрации 100 нг/мл в течение 4х последних часов эксперимента (0/100). В то же время, уровни COX-2, наблюдаемые в культурах, предобработанных LPS в концентрациях 10 и 100 нг/мл (10/100 и 100/100), заметно превышали уровни, наблюдаемые в образцах культур положительного контроля (0/100) (рис. 3.15.). Тем не менее, повышенные уровни COX-2 были выявлены и в клетках, стимулированных LPS в концентрациях 10 и 100 нг/мл в течение 46 часов без второй стимуляции (10/0 и 100/0 по сравнению с 0/0) (рис. 3.15.).

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что длительная обработка клеток LPS во всех использованных концентрациях не подавляла синтез белка COX-2 при повторной обработке клеток эндотоксином. При этом, обработка клеток LPS в концентрациях 10 и 100 нг/мл приводила к заметному накоплению белка COX-2 через 46 часов после добавления стимула. Стоит отметить, что полученные данные указывают на то, что синтез COX-2 в условиях второй стимуляции клеток LPS (10/100 и 100/100), по-видимому, шел более интенсивно,

чем синтез в условиях однократной стимуляции (0/100). Действительно, во всех случаях мы наблюдали примерно двукратное увеличение уровня белка по отношению к соответствующему контролю: 0/100 против 0/0, 10/100 против 10/0 и 100/100 против 100/0. Однако, очевидно, что прирост между 0/100 и 0/0 требовал меньшее количество молекул COX-2, чем прирост между 10/100 и 10/0. Полученные данные указывают на то, что длительная обработка астроцитов LPS усиливала экспрессию COX-2 на уровне белка при последующей стимуляции. Данный феномен мог быть объяснен посредством усиления противовоспалительной функции COX-2. Действительно, двукратная стимуляция клеток LPS в целом соответствует модели эндотоксиновой толерантности, которую рассматривают в качестве состояния, в котором подавлена провоспалительная часть иммунного ответа, зато более активирована его противовоспалительная составляющая (Biswas and Lopez-Collazo, 2009; Cavaillon and Adib-Conquy, 2006). При этом, COX-2 посредством синтеза разных продуктов вовлечен как в провоспалительные, так и в противовоспалительные процессы (Rajakariar et al., 2006; Ricciotti and FitzGerald, 2011). В связи с этим далее мы оценили, как изменяется выброс PGE_2 при повторной стимуляции клеток. Получено, что концентрация PGE_2 была повышена во всех проанализированных образцах (10/100, 10/0, 100/100 и 100/0) по отношению к обоим проанализированным контролям: отрицательному (0/0) и положительному (0/100) (рис. 3.15). Данные указывают на то, что длительная обработка астроцитов провоспалительным стимулом умеренной или высокой концентрации не подавляет провоспалительный ответ на уровне экспрессии COX-2 и выброса PGE_2 .

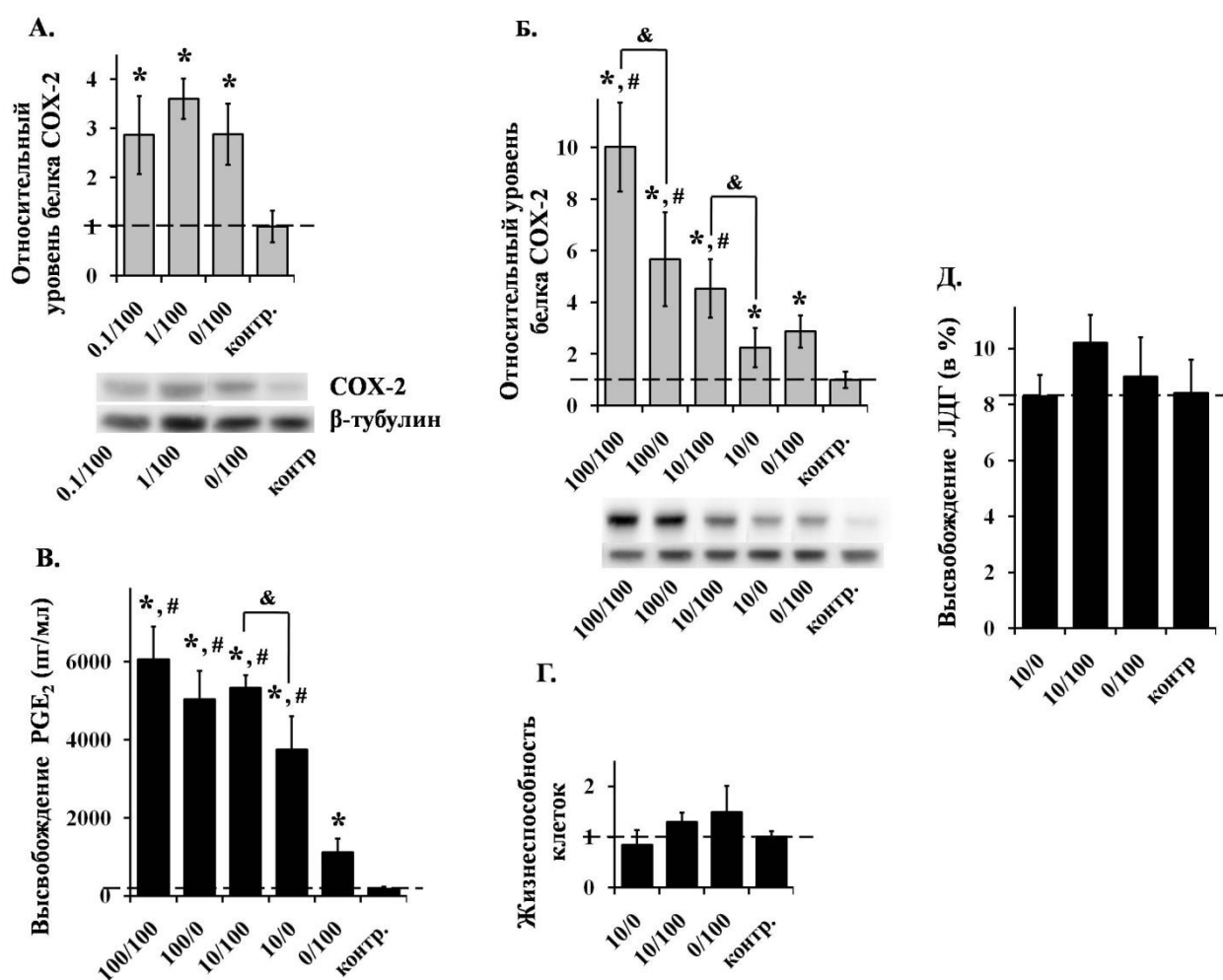


Рис. 3.15. Влияние двукратной провоспалительной стимуляции на синтез белка COX-2, высвобождение PGE₂ и уровни цитотоксичности в культуре. Астроциты инкубировали с LPS (0,1, 1, 10 и 100 нг/мл) в течение 46 часов, после чего стимулировали LPS 100 нг/мл в течение 4 часов или 12 часов (рис. Г.). Клетки, стимулированные LPS 100 нг/мл в течение 4 часов, использовали в качестве положительного контроля. Не стимулированные клетки использовали в качестве отрицательного контроля. Посредством иммуноблоттинга определяли уровень белка COX-2 (А, Б). Посредством иммуноферментного анализа определяли уровни высвобождаемого PGE₂ (В). Значения экспрессии нормировали на показатели экспрессии β-тубулина. Приведены результаты денситометрии и типичные электрофореграммы. Посредством анализа WST-1 определяли уровень жизнеспособности клеток в условиях повторных стимуляций (Г). Показатели в контрольных клетках (не стимулированных клетках) приняты за 1. Уровни повреждения клеточных мембран определяли посредством анализа выброса ЛДГ (Д). Все эксперименты воспроизводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

В связи с тем, что наши данные значительно отличались от общих представлений об эндотоксиновой толерантности как о состоянии с подавленным провоспалительным ответом, далее мы более подробно исследовали модель двукратной стимуляции клеток 10/100.

3.3.2. Характеристика культуры астроцитов при двукратной стимуляции

LPS

Токсичность эндотоксина была ранее продемонстрирована для ряда клеток (Kim and Ha, 2009; Sharifi et al., 2010). Для оценки влияния длительной обработки астроцитов липополисахаридом на «самочувствие» культур при двукратной провоспалительной стимуляции, мы провели серию общих тестов: проанализировали морфологию клеток, оценили цитотоксичность условий культивирования (произвели оценку выброса ЛДГ) и жизненную активность клеток (анализ WST-1).

Для оценки морфологии астроциты пересаживали в чашки Петри со стеклянным дном и стимулировали в соответствии со схемами 0/100 и 10/0. Клетки фиксировали и обрабатывали по протоколу иммуноокрашивания с маркированием GFAP и мечением ДНК посредством Syto59. Далее образцы анализировали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Для сравнения уровней экспрессии GFAP в культурах параметры детектора флуоресценции настраивали по образцам, двукратно стимулированным LPS, то есть по образцам с ожидаемой максимальной экспрессией белка. После этого, не меняя настроек и регулируя только положение оптического среза, производили съемку контрольных и экспериментальных культур. Анализ проводили по четырем случайно выбранным полям, содержащим сходное количество клеток, эксперименты воспроизводили три раза, с двумя техническими повторами внутри

каждого эксперимента. В результате анализа не было выявлено усиления экспрессии GFAP или изменения морфологии клеток в условиях длительной стимуляции клеток LPS в концентрации 10 нг/мл (рис. 3.16.).

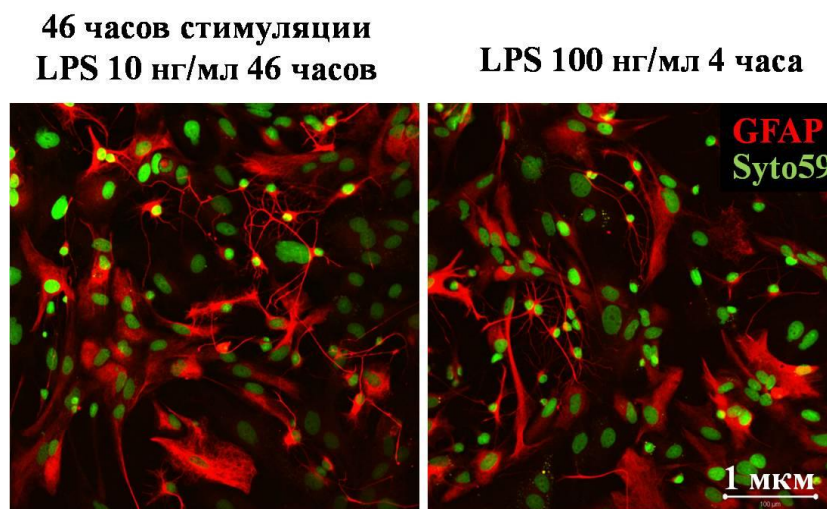


Рис. 3.16. Влияние двукратной провоспалительной стимуляции на морфологические характеристики культур астроцитов и экспрессию белка GFAP. Астроциты инкубировали с LPS 10 нг/мл в течение 46 часов, после чего стимулировали LPS 100 нг/мл в течение 4 часов. После этого клетки фиксировали и обрабатывали, следуя протоколу иммуноокрашивания, с маркированием белка GFAP (обозначен красным) и ДНК посредством Syto59 (обозначен зеленым).

Далее мы провели анализ жизнеспособности клеток, используя реагент WST-1 (Roche). WST-1 представляет собой водорастворимую соль тетразолия, которая расщепляется под действием ферментов клетки до формазана, относительная концентрация которого может быть определена колориметрически. Поскольку расщепление соли возможно только в присутствии жизнеспособных клеток, интенсивность окраски напрямую связана с количеством метаболически активных клеток. Принцип анализа WST-1 в целом схож с таковым МТТ, отличия состоят в том, что WST-1 не проникает внутрь клеток, формирование водорастворимого формазана происходит вне клеток, в результате чего анализ не требует этапа солубилизации. В рамках нашего анализа мы поставили вопрос о том, как изменяется жизнеспособность клеток в условиях длительной обработки

эндотоксином 10 нг/мл, а также как указанная адаптация изменяет ответ культур на последующую стимуляцию LPS 100 нг/мл в течение 12 часов. Результаты анализа показали, что общий уровень метаболизма возрастает при стимуляции клеток LPS 100 нг/мл в течение 12 часов, длительная обработка клеток LPS 10 нг/мл незначительно снижает показатели в культурах, предшествующая стимуляция эндотоксином не оказывает влияния на уровень метаболической активности, индуцированный LPS 100 нг/мл (рис. 3.15).

Для выявления цитотоксического эффекта кратковременной и длительной стимуляции, мы провели анализ выброса лактадегидрогеназы (ЛДГ) – индикатора нарушения целостности мембран клеток в экспериментальных и контрольных условиях. Анализ и вычисления проводили в соответствии с протоколом рекомендованным производителем набора (Roche). Во всех исследованных моделях выброс лактатдегидрогеназы составлял 8-10% от максимального (за 100% принят уровень ЛДГ в полностью лизированных клетках). Значения, полученные при исследовании моделей 10/100 и 100/0, не отличались от значений, выявленных в контрольных культурах (0/0) (рис. 3.15).

3.3.3. Влияние двукратной стимуляции на экспрессию COX-2, TNF α и IL10

Далее мы проанализировали изменение профилей экспрессии COX-2 на уровне мРНК и экспрессии TNF α и IL10 на уровне мРНК и белка в условиях модели двукратной провоспалительной стимуляции 10/100.

Получено, что предварительная инкубация астроглиальных клеток с эндотоксином снижает уровень мРНК COX-2, индуцируемый повторной обработкой LPS (рис. 3.17). Примечательно, что это снижение не согласуется с ростом экспрессии на уровне белка. Одним из объяснений этого противоречия может служить повышение эффективности использования транскриптов COX-2 в условиях модели 10/100. т.е. можно предположить, что длительная стимуляция клеток эндотоксином ведет к изменению экспрессии факторов, определяющих

скорость трансляции. При этом меньшее количество матриц COX-2 используется более эффективно, что и определяет усиление синтеза белка без выраженного усиления транскрипции. Другое возможное объяснение - изменение кинетики

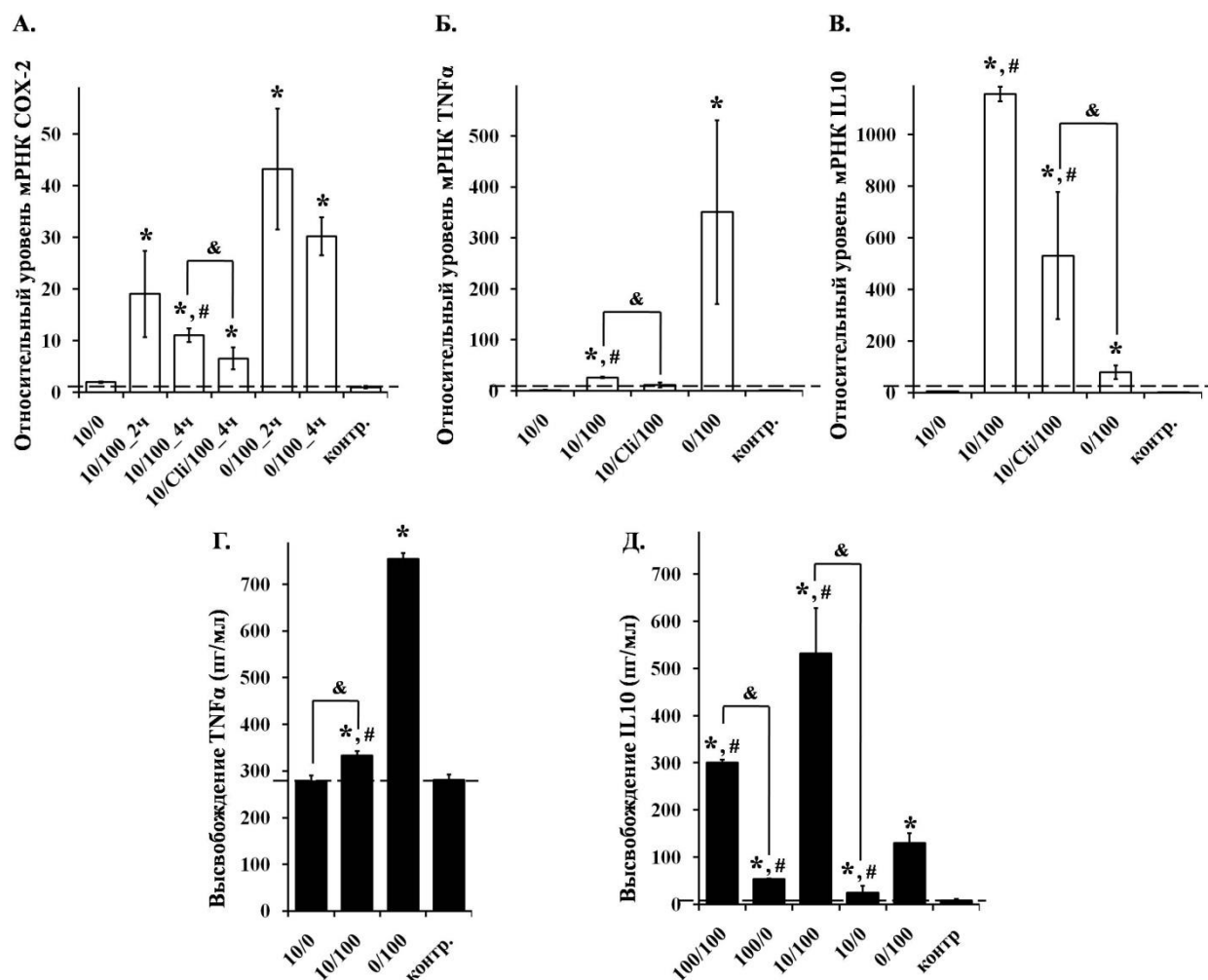


Рис. 3.17. Влияние двукратной провоспалительной стимуляции на экспрессию COX-2, TNFα и IL10. Астроциты инкубировали с LPS 10 нг/мл в течение 46 часов, после чего стимулировали LPS 100 нг/мл в течение 4 часов (А, В-Д) или 2 часов (Б). Методом ПЦР в режиме реального времени определяли уровни экспрессии мРНК COX-2 (А, Б), TNFα (В), IL10 (Д). С помощью иммуоферментного анализа определяли уровни экспрессированных белков TNFα (Г) и IL10 (Е). Клетки, стимулированные LPS 100 нг/мл в течение 4 часов, использовали в качестве положительного контроля. Не стимулированные клетки использовали в качестве отрицательного контроля. Все эксперименты воспроизводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

транскрипции. Действительно, усиление экспрессии мРНК COX-2 на временных точках ранее 4 часов может обеспечить запас матрицы, достаточный для последующего усиления трансляции. Для проверки второго предположения мы проанализировали изменение экспрессии мРНК COX-2 на временной точке 2 часа после добавления LPS. Однако согласно нашим результатам и на двух часах уровень COX-2 в клетках, предварительно обработанных эндотоксином в течение длительного времени, был ниже, чем в клетках, стимулированных LPS однократно (рис. 3.17). Наши данные указывают на то, что условия многократной провоспалительной стимуляции могут оказывать влияние на интенсивность трансляции, однако данное предположение требует дальнейшей проверки.

Далее мы проанализировали, как изменяется экспрессия TNF α и IL10 в моделируемых условиях. Полученные результаты указывают на подавление индукции TNF α в условиях двукратной стимуляции (10/100 по сравнению с 0/100). Этот эффект был выявлен как на уровне экспрессии мРНК, так и на уровне экспрессии белка (рис. 3.17). Этот результат согласуется с литературными данными о поведении TNF α в клетках разных типов при повторных стимуляциях LPS (разные варианты модели «эндотоксиновой толерантности») (Biswas and Lopez-Collazo, 2009; Cavaillon and Adib-Conquy, 2006). Влияние аналогичных условий на экспрессию TNF α в астроцитах ранее описано не было.

Далее, наши результаты демонстрируют усиление экспрессии IL10 на уровне мРНК и белка в условиях модели 10/100 по сравнению с моделью 0/100 (530 ± 96 против 130 ± 20 пг/мл соответственно) (рис. 3.17). То есть, длительная провоспалительная стимуляция усиливает интенсивность экспрессии IL10 в ответ на повторную стимуляцию. Сходное поведение IL10 было многократно описано для клеток разных типов в условиях моделей эндотоксиновой толерантности и является характерной чертой состояния (Biswas and Lopez-Collazo, 2009; Cavaillon and Adib-Conquy, 2006). Для астроглиальных клеток изменение экспрессии IL10 в условиях повторных стимуляций LPS ранее показано не было, хотя в работах Беурел и соавторов было показано аналогичное поведение TGF β – другого маркера

эндотоксиновой толерантности, характеризующегося сенситизацией экспрессии (Beurel and Jope, 2010; Beurel, 2011).

Следует, однако, отметить, что усиление экспрессии IL10 в целом соответствует описанию «прайминга». В связи с этим мы задались вопросом, будет ли изменяться регуляция IL10 при увеличении концентрации LPS при первой стимуляции? Поэтому мы проанализировали, как повлияет на экспрессию белка IL10 длительная стимуляция эндотоксином в концентрации 100 нг/мл (модели 100/0 и 100/100). Наши результаты продемонстрировали повышенную концентрацию IL10 в культурах 100/0 (примерно 54 ± 1 пг/мл в культурах 100/0 против 8 ± 3 пг/мл для не стимулированных клеток) и усиление синтеза белка в культурах 100/100 по сравнению с положительным контролем 0/100 (300 ± 7 пг/мл для 100/100 против 120 ± 20 пг/мл в 0/100). Величина эффекта индукции, тем не менее, была меньшей между парами 100/0 против 100/100 и 10/0 против 10/100, что видно на рис. 3.17. В культурах 10/100 индукция IL10 была максимальной и составляла примерно 530 ± 96 пг/мл. В целом, индукция IL10 усиливалась при предварительной провоспалительной стимуляции, и величина эффекта сенситизации синтеза цитокина при меньших дозах являлась большей. Таким образом, величина индукции IL10 зависит от концентрации эндотоксина, использованной при первой стимуляции и, по-видимому, не соответствует модели «прайминга», т.е. представляет собой феномен с отдельным механизмом.

3.3.4. Регуляция воспалительного ответа при двукратной стимуляции

Одним из механизмов, обуславливающих изменение провоспалительного ответа в условиях многократной стимуляции эндотоксином, считается снижение экспрессии рецептора или компонентов рецепторного комплекса TLR-4. Действительно, интернализация TLR-4, перестройка мембранных компонентов рецепторного комплекса, блокирование проведения сигнала на уровне адаптеров были отмечены для ряда клеток, подвергнутых многократной стимуляции LPS

(Cuschieri et al., 2006; Medvedev et al., 2007). Это ставит вопрос о чувствительности клеточных мембранных сигнальных комплексов астроцитов к липополисахариду после длительной провоспалительной стимуляции. Для того, чтобы выяснить, задействован ли TLR-4 в проведении провоспалительного сигнала в астроцитах в условиях многократной стимуляции эндотоксином, а также для того, чтобы определить, является ли изменение рецептора ключевым механизмом изменения экспрессии мРНК COX-2 в рамках модели 10/100, мы заблокировали рецептор веществом Cli-095 и посмотрели, как блокировка TLR-4 влияет на экспрессию цитокинов (рис. 3.17). Обработка клеток LPS (модель 10/100) в присутствии ингибитора TLR-4 Cli-095 (10/Cli/100) привела к снижению экспрессии COX-2, TNF α и IL10. Это указывает на то, что второй провоспалительный сигнал задействовал TLR-4-зависимый молекулярный каскад в астроцитах.

Таким образом, длительная провоспалительная стимуляция, изменяет молекулярный каскад Толл-подобных рецепторов ниже уровня рецепторов. Для подтверждения этого предположения мы задались вопросом, будет ли изменен ответ астроглиальных клеток на другой провоспалительный стимул, не проходящий через комплекс Толл-подобных рецепторов? Для ответа на этот вопрос мы проанализировали изменение ответа астроглиальных клеток на тромбин, важный провоспалительный стимул для астроцитов (см. главу 1.1.1). Использование моделей 0/Thr и 10/Thr продемонстрировало изменения в экспрессии TNF α , COX-2 и IL10, соответствовавшие изменениям, наблюдаемым при использовании LPS в качестве второго стимула (рис. 3.18). Однократная стимуляция клеток тромбином индуцировала экспрессию трех указанных медиаторов, а предварительная стимуляция клеток эндотоксином приводила к снижению наблюдаемой индукции TNF α и COX-2 и усилению индукции IL10 в ответ на последующую обработку TLR-4 независимым провоспалительным индуктором.

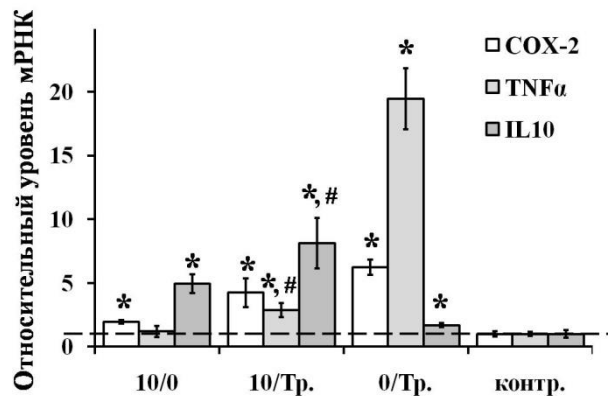


Рис. 3.18. Влияние длительной стимуляции LPS на индуцированный тромбином синтез мРНК COX-2, IL10 и TNFα. Астроциты инкубировали с LPS 10 нг/мл в течение 46 часов, после чего стимулировали тромбином (Thr, 1 ед/мл) в течение 4 часов. Посредством ПЦР в режиме реального времени определяли уровни экспрессии мРНК (а) COX-2, (б) IL10 и (в) TNFα. Значения экспрессии, полученные для COX-2, IL10 и TNFα, нормировали на соответствующие значения β-актина. Уровень мРНК в контрольных клетках принят за 1. Все эксперименты воспроизводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Ранее было показано, что в условиях повторных стимуляций клеток LPS (модель «эндотоксиновой толерантности») происходит нарушение активации MAPK (Patenaude et al., 2011). Причем, одним из механизмов этого нарушения считают избыточную активацию фосфатазы MKP1, инактивация которой восстанавливает экспрессию провоспалительных маркеров (Nimah et al., 2005). В то же время, в ходе нашего исследования не было выявлено повышения экспрессии MKP1 через 46 часов после обработки астроцитов (см. рис. 3.3). Это привело нас к вопросу о том, как изменяется фосфорилирование p38 в ответ на двукратную стимуляцию LPS. Для ответа на этот вопрос была проанализирована экспрессия фосфобелка p38 в условиях модели 10/100.

Результаты иммуноблоттинга продемонстрировали отсутствие фосфорилирования p38 в ответ на повторную стимуляцию клеток LPS (10/100) (рис. 3.19). Далее мы поставили вопрос о том, возможно ли индуцировать

фосфорилирование p38 в астроглиальных клетках в условиях длительной предварительной провоспалительной стимуляции посредством TLR-4 независимой стимуляции? Для ответа на этот вопрос мы обработали клетки анизомицином (10/A) в течение 30 минут и 2 часов, после чего проанализировали изменение экспрессии фосфобелка p38. Получено, что анизомицин приводил к усилению экспрессии фосфорилированной формы белка и при добавлении к нестимулированным клеткам (0/A), и при стимуляции клеток в условиях предварительной обработки эндотоксином (10/A) (рис. 3.19).

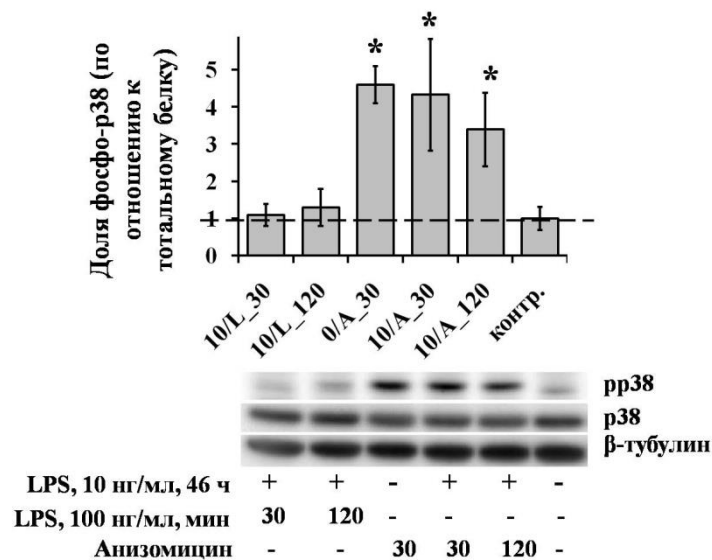


Рис. 3.19. Влияние длительной провоспалительной стимуляции на индуцированное LPS и анизомицином фосфорилирование p38. Астроциты инкубировали с LPS 10 нг/мл в течение 46 часов, после чего стимулировали LPS (100 нг/мл) или анизомицином (1 мкг/мл) в течение 30 минут (L_30, A_30) или 2 часов (L_120, A_120). После этого посредством иммуноблоттинга определяли уровни фосфобелка и тотального белка p38 в культурах. Значения, полученные при измерении уровней фосфобелка, нормировали на значения, полученные для тотального белка. Приведена типичная электрофореграмма и результаты денситометрии. Уровень белка в контрольных клетках принят за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками.

Путь передачи сигнала от анизомицина к p38, как ни странно, практически не исследован. Известно, впрочем, что активация фосфорилирования p38 под

воздействием анизомицина задействует МКК3/6 (Lee et al., 2003). При этом, по-видимому, активация МКК3/6 идет в TAK1 независимой манере (Cheung et al., 2003b; Wolf et al., 2011). Принимая во внимание эти данные и наши результаты, мы предполагаем, что длительная стимуляция астроцитов эндотоксином нарушает индукцию фосфорилирования p38 ниже рецепторного комплекса и выше МКК3/6.

3.3.5. Регуляция экспрессии COX-2 и IL10 при двукратной провоспалительной стимуляции астроглиальных клеток

Далее мы проверили, какие из каскадов воспалительного ответа астроглиальных клеток сохраняют свое регуляторное значение в условиях двукратной провоспалительной стимуляции?

Получено, что ингибирование MAP киназ p38 и JNK перед второй стимуляцией клеток эндотоксином не влияло на уровень белка COX-2 (рис. 3.20. 10/SB/100, 10/SP/100, 10/SB/SP/100). Это согласуется с данными об отсутствии фосфорилирования p38 и JNK. Сочетанное ингибирование MAP киназ также не оказывало влияния на прирост белка COX-2. Любопытно, однако, что ингибирование MAP киназы p38, тем не менее, приводило к снижению высвобождаемого PGE₂, что аналогично эффекту, который наблюдали в условиях однократной провоспалительной стимуляции (рис. 3.5). Это интересный результат. Он указывает на существование механизмов дифференциального контроля экспрессии и активности COX-2, которые не требуют обязательного фосфорилирования p38. При этом регуляция высвобождения PGE₂ задействует SB203580-регулируемые пути. На данный момент наших данных недостаточно для того, чтобы однозначно утверждать, что этот механизм зависит исключительно от комплекса TAK1/TAB2/TAB1 киназ, поскольку SB203580 может также участвовать в регуляции других сигнальных каскадов, например, PKB/AKT сигнальную ветвь (Lali et al., 2000a; Takahashi et al., 2007).

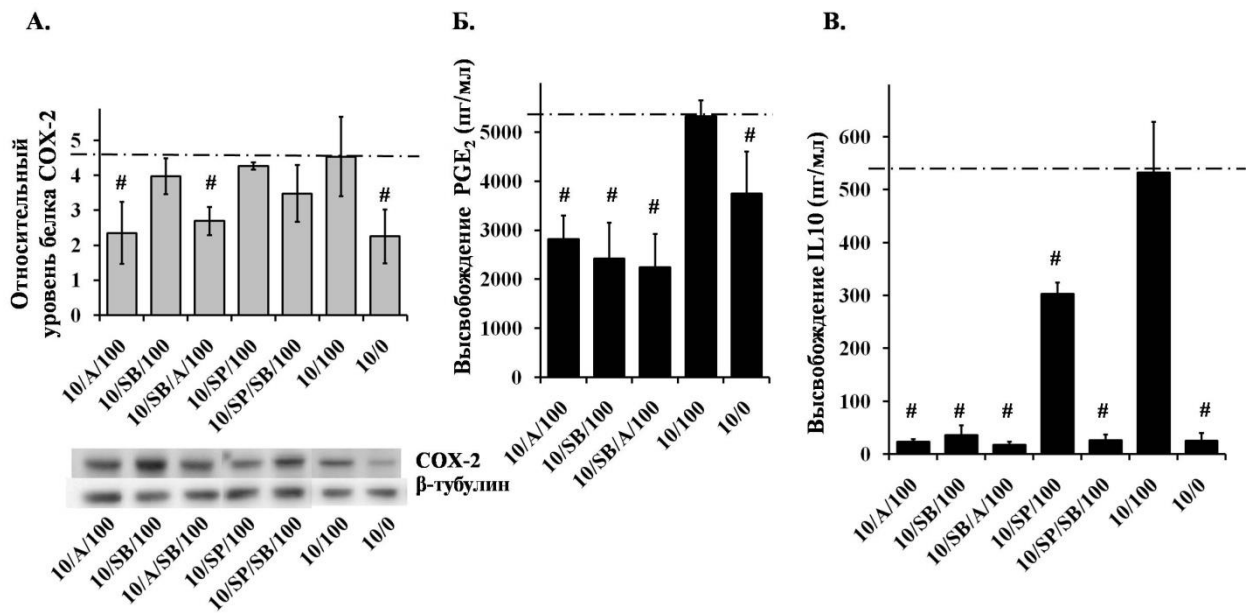


Рис. 3.20. Влияние двукратной провоспалительной стимуляции и модуляторов MAP киназ p38 и JNK на синтез и активность белка COX-2, синтез белка IL10. Астроциты инкубировали с LPS 10 нг/мл в течение 46 часов, после чего обрабатывали SB203580 (ингибитор p38, 20 мкМ, за 30 мин до LPS), SP600125 (ингибитор JNK, 10 мкМ, за 30 мин до LPS), аннизомицином (активатор p38 и JNK, 1 мкМ, за 15 мин до LPS), или их комбинациями, после чего стимулировали LPS в течение 4 часов. (А) Посредством иммуноблоттинга определяли уровень белка COX-2. Значения экспрессии нормировали на показатели экспрессии β -тубулина. Уровень белка в контрольных клетках (не стимулированных клетках) принят за 1. За положительный контроль принят уровень белка в культурах, двукратно стимулированных LPS (10/100), отмеченный на рис. штрихованной линией. (Б) Посредством иммуноферментного анализа определяли концентрацию PGE₂ в культуральной среде. Все эксперименты воспроизводили не менее трех раз. # $p < 0,05$ по сравнению с положительным контролем. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Как и в случае однократной стимуляции, обработка клеток аннизомицином блокировала индукцию COX-2 на уровне экспрессии и на уровне активности, а добавление ингибитора MAPK p38 SB203580 не снимало эффект аннизомицина на экспрессию и активность COX-2 (рис. 3.20.).

Наши результаты продемонстрировали существенное снижение экспрессии IL10 в астроглиальных клетках при обработке клеток аннизомицином и

ингибиторами p38 и JNK. При этом ингибирование JNK лишь частично снижало синтез IL10 (10/SP/100), в то время как ингибирование p38 (10/SB/100, 10/SB/SP/100) полностью блокировало прирост IL10 при второй стимуляции LPS (рис. 3.20). Эти результаты подтверждают участие фосфо-p38 независимых сигнальных каскадов, регулируемых SB203580 в контроле экспрессии IL10.

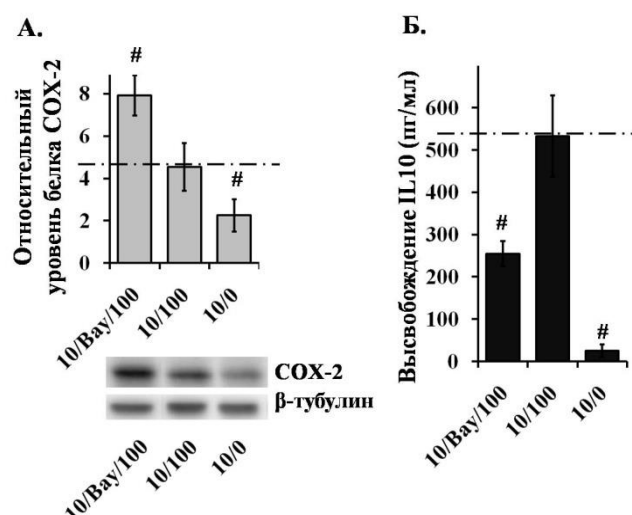


Рис. 3.21. Влияние двукратной провоспалительной стимуляции и Bay-11-7085 на синтез белка COX-2 и IL10. Астроциты инкубировали с LPS 10 нг/мл в течение 46 часов, после чего обрабатывали Bay-11-7085 (ингибитор NF- κ B, 5 мкМ, за 30 мин до LPS), после чего стимулировали LPS в течение 4 часов. (А) Посредством иммуноблоттинга определяли уровень белка COX-2. Уровень белка в контрольных клетках (не стимулированных клетках) принят за 1. За положительный контроль принят уровень белка в культурах, двукратно стимулированных LPS (10/100), отмеченный на рис. штрихованной линией. (Б) Посредством иммуноферментного анализа определяли концентрацию IL10 в культуральной среде. Все эксперименты воспроизводили не менее трех раз. # $p < 0,05$ по сравнению с положительным контролем. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Далее мы проверили, как влияет на экспрессию COX-2 обработка клеток Bay-11-7085 в рамках модели двукратной стимуляции. Примечательно, обработка клеток ингибитором NF- κ B приводила к усилению экспрессии COX-2 при второй стимуляции (рис. 3.21, 10/B/100). Это довольно любопытный результат, поскольку Bay-11-7085 известен как ингибитор синтеза COX-2, опосредованного через

активацию NF-κB (Chistyakov et al., 2014; Chistyakov et al., 2015; Font-Nieves et al., 2012). Противоположный эффект вещества подразумевает наличие отрицательного регулятора экспрессии COX-2, активного в астроцитах при двукратной провоспалительной стимуляции и регулируемого посредством NF-κB. Данные также указывают на роль NF-κB в качестве переключателя между положительной и отрицательной регуляцией экспрессии COX-2 в разных условиях воспалительного ответа.

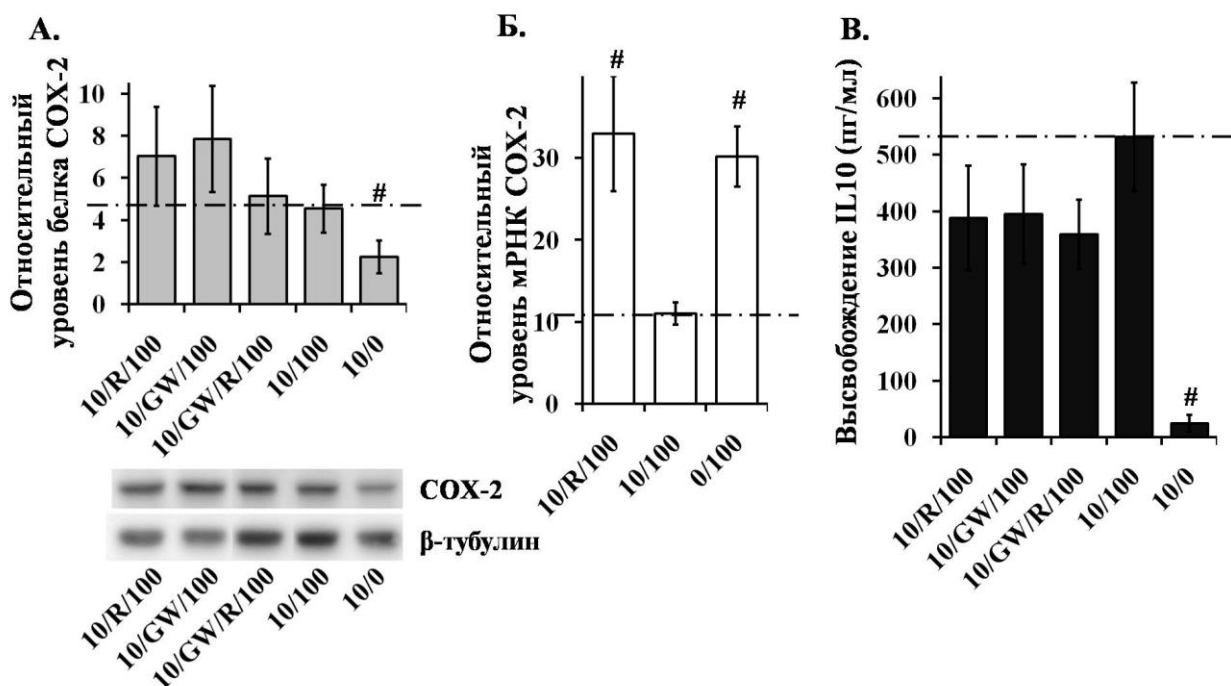


Рис. 3.22. Влияние двукратной провоспалительной стимуляции и модуляторов PPAR γ на синтез белка COX-2. Астроциты инкубировали в присутствии LPS 10 нг/мл (А) или без LPS (Б) в течение 46 часов, после чего обрабатывали росиглитазоном (агонист PPAR γ , 20 мкМ, за 15 мин до LPS), GW9662 (антагонист PPAR γ , 10 мкМ, за 30 минут до LPS) или их комбинацией после чего стимулировали LPS в течение 4 часов. Посредством иммуноблоттинга определяли уровень белка COX-2. Значения экспрессии нормировали на показатели экспрессии β -тубулина. Уровень белка в контрольных клетках (не стимулированных клетках) принят за 1 и отмечен на рис. Б штрихованной линией. За положительный контроль принят уровень белка в культурах, двукратно стимулированных LPS (10/100), отмеченный на рис. штрихованной линией (А) или однократно стимулированных LPS (0/100) (Б). Все эксперименты воспроизводили не менее трех раз. # $p < 0,05$ по сравнению с положительным контролем. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Полученные результаты также подтвердили вовлеченность NF-κB в регуляцию экспрессии IL10 в условиях модели 10/100. Однако при ингибировании фактора транскрипции мы наблюдали лишь частичное подавление экспрессии под воздействием второго стимула LPS (рис. 3.21).

В поисках возможных регуляторов сигнальных путей при повторных стимуляциях, мы проверили, как влияет на экспрессию COX-2 обработка клеток росиглитазоном и GW9662. Обработка клеток росиглитазоном в сочетании с двукратной обработкой LPS не влияла на уровень экспрессии белка. Таким образом, как и в случае с моделью острого воспаления, в модели двукратной провоспалительной стимуляции нам не удалось выявить участия росиглитазона в индукции экспрессии COX-2 на уровне белка. В то же время, следует отметить, что добавление росиглитазона оказывало влияние на рост экспрессии COX-2 на уровне мРНК. Экспрессия COX-2 в астроглиальных клетках, подвергнутых сочетанной обработке LPS и росиглитазоном достигала уровней, наблюдаемых в образцах положительного контроля (рис. 3.21). Добавление модуляторов активности PPARγ росиглитазона и GW9662 не влияло на экспрессию IL10 (рис. 3.22).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о дифференциальном контроле экспрессии COX-2 и IL10 при двукратной провоспалительной стимуляции астроцитов.

Проведенные исследования позволили построить обобщенную схему дифференциальной регуляции экспрессии COX-2 и IL10 в условиях однократной и повторных провоспалительных стимуляций, которая представлена на рис. 3.23.

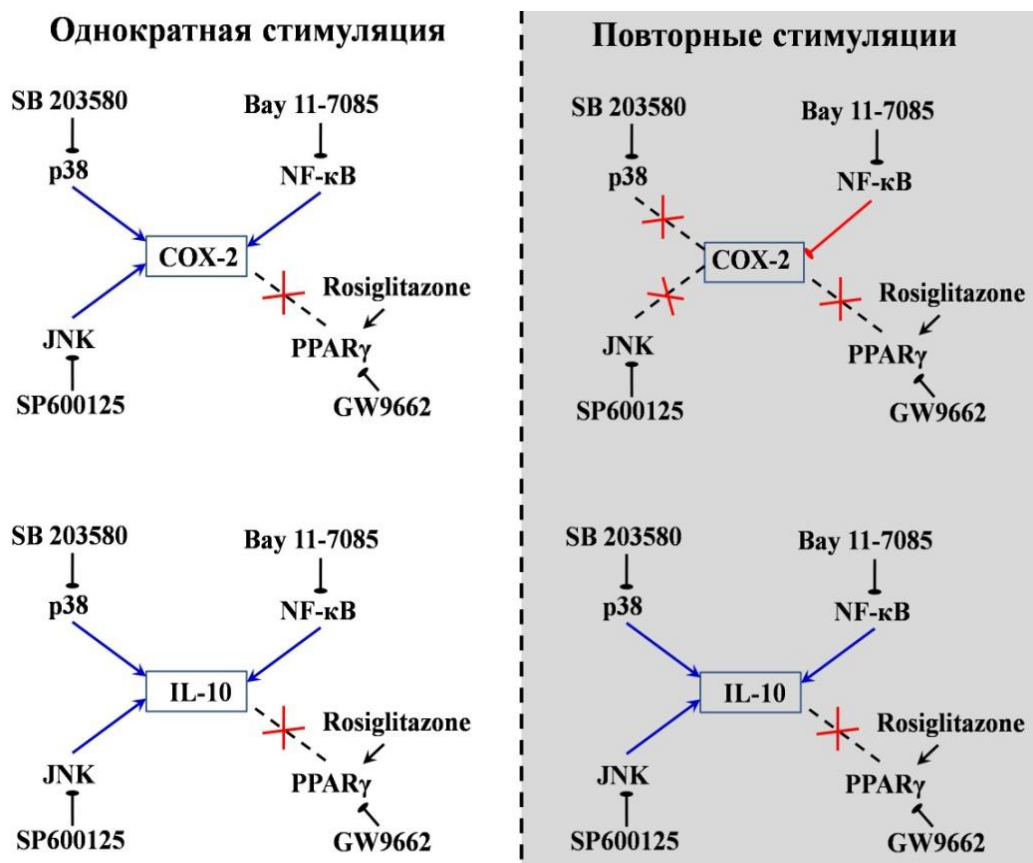


Рис. 3.23. Обобщенная схема регуляции COX-2 и IL10 в условиях однократной и повторных провоспалительных стимуляций. Стрелками показаны активирующие воздействия. Линиями с тупым окончанием показаны ингибирующие взаимодействия. Прерывистые линии указывают на отсутствие эффекта соответствующей обработки.

Таким образом, полученные в работе данные свидетельствуют о том, что в воспалительный ответ астроглиальных клеток вовлечены специализированные процессы регуляции активности провоспалительных и противовоспалительных молекулярных медаторов. Некоторые из этих механизмов значительно отличаются от механизмов, работающих в клетках лимфоидного и миелоидного происхождения, что делает актуальным дальнейшее участие астроглии в процессах врожденного воспаления в мозге.

Результаты экспериментов третьего этапа исследования позволили сделать следующие выводы:

6. Повторные обработки астроцитов LPS не являются токсичными для клеток и не меняют морфологию клеток в культуре.

7. В ответ на повторную стимуляцию наблюдается снижение индукции $\text{TNF}\alpha$ на уровне мРНК и белка, COX-2 на уровне мРНК, но не на уровне белка. Повторная стимуляция клеток вызывает усиление выброса PGE_2 . Также происходит усиление синтеза и высвобождения IL10. При этом, интенсивность выброса IL10 зависит от величины концентрации LPS, использованного при первичной длительной стимуляции.

8. При повторных стимуляциях клеток происходит подавление фосфорилирования p38. В то же время, индукция фосфорилирования p38 возможна при добавлении анизомицина.

9. В регуляцию экспрессии IL10 при двукратной стимуляции астроцитов вовлечены каскады MAP киназ и сигнальный путь NF- κ B. Обработка клеток росиглитазоном усиливает экспрессию мРНК COX-2 при повторной стимуляции клеток, однако не влияет на уровень белка COX-2 или белка IL10.

4. ВЫВОДЫ

1. Обработка астроцитов LPS в течение 4 часов приводит к усилению экспрессии COX-2, TNF α и IL10. Усиление экспрессии COX-2 сопровождается увеличением выброса PGE₂, что указывает на провоспалительный характер ранних этапов клеточного ответа.

2. MAP киназы p38 и JNK активируются в ответ на стимуляцию TLR-4; фосфатаза MKP1 не изменяется под воздействием обработки LPS.

3. В регуляцию экспрессии IL10 и COX-2 на ранних этапах обработки вовлечены механизмы сигнальных каскадов MAP киназ и NF- κ B; росиглитазон не оказывает влияния на экспрессию исследованных молекул.

4. В ходе воспалительного ответа в астроцитах усиливается экспрессия мРНК TTP, однако не происходит ее трансляции в белок. Экспрессия мРНК HUR остается неизменной в ходе воспалительного ответа, но высокие концентрации LPS могут стимулировать экспрессию белка HUR. Обработка LPS стимулирует выход белка HUR из ядра.

5. Экспрессии мРНК TTP зависит от активности MAP киназы p38, HUR и TTP регулируются на уровне стабилизации мРНК в ходе воспалительного ответа.

6. Повторные обработки астроцитов LPS не являются токсичными для клеток и не меняют морфологию клеток в культуре.

7. В ответ на повторную стимуляцию наблюдается снижение индукции TNF α на уровне мРНК и белка, COX-2 на уровне мРНК, но не на уровне белка. Повторная стимуляция клеток вызывает усиление выброса PGE₂. Также происходит усиление синтеза и высвобождения IL10. При этом, интенсивность выброса IL10 зависит от величины концентрации LPS, использованного при первичной длительной стимуляции.

8. При повторных стимуляциях клеток происходит подавление фосфорилирования p38. В то же время, индукция фосфорилирования p38 возможна при добавлении анизомицина.

9. В регуляцию экспрессии IL10 при двукратной стимуляции астроцитов вовлечены каскады MAP киназ и сигнальный путь NF-κB. Обработка клеток росиглитазоном усиливает экспрессию мРНК COX-2 при повторной стимуляции клеток, однако не влияет на уровень белка COX-2 или белка IL10.

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сергеева М.Г., Варфоломеева А.Т. Каскад арахидоновой кислоты. М.: Народное образование. 2006. 256 с.
- Akira S., Saitoh T., Matsushita K., Takeuchi O. Negative regulators in Toll-like receptor responses. *Cornea*. 2010. 29. Suppl 1. P:S13-S19.
- Al-Ahmadi W., Al-Ghamdi M., Al-Haj L., Al-Saif M., Khabar K.S. Alternative polyadenylation variants of the RNA binding protein, HuR: abundance, role of AU-rich elements and auto-Regulation. *Nucleic Acids Res*. 2009. 37. P:3612-3624.
- Aleshin S., Grabeklis S., Hanck T., Sergeeva M., Reiser G. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma positively controls and PPARalpha negatively controls cyclooxygenase-2 expression in rat brain astrocytes through a convergence on PPARbeta/delta via mutual control of PPAR expression levels. *Mol. Pharmacol*. 2009. 76. P:414-424.
- Aleshin S., Stokin M., Sergeeva M., Reiser G. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)beta/delta, a possible nexus of PPARalpha- and PPARgamma-dependent molecular pathways in neurodegenerative diseases: Review and novel hypotheses. *Neurochem. Int*. 2013. 63. P:322-330.
- Alexander C., Rietschel E.T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res*. 2001. 7. P:167-202.
- Amit I., Citri A., Shay T. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat. Genet*. 2007. 39. P:503-512.
- Amor S., Peferoen L.A., Vogel D.Y. Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. *Immunology*. 2014. 142. P:151-166.
- Amor S., Puentes F., Baker D., van V der. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2010. 129. P:154-169.
- Anderson P. Intrinsic mRNA stability helps compose the inflammatory symphony. *Nat. Immunol*. 2009. 10. P:233-234.
- Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 1999. P:208-215.
- Arthur J.S., Ley S.C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol*. 2013. 13. P:679-692.
- Bakheet T., Frevel M., Williams B.R., Greer W., Khabar K.S. ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res*. 2001. 29. P:246-254.

- Beeson P.B. Tolerance to bacterial pyrogens: II. Role of the reticulo-endothelial system. *J. Exp. Med.* 1947; 86. P:39-44.
- Bennett B.L., Sasaki D.T., Murray B.W. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA.* 2001. 98. P:13681-13686.
- Bensaude O. Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription.* 2011. 2. P:103-108.
- Beurel E., Joep R.S. Glycogen synthase kinase-3 regulates inflammatory tolerance in astrocytes. *Neuroscience.* 2010. 169. P:1063-1070.
- Beurel E. HDAC6 regulates LPS-tolerance in astrocytes. *PLoSOne.* 2011. 6. P: e25804.
- Bhattacharyya S., Brown D.E., Brewer J.A., Vogt S.K., Muglia L.J. Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood.* 2007. 109. P:4313-4319.
- Bhattacharyya S.N., Habermacher R, Martine U, Closs E.I., Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell.* 2006; 125. P:1111-1124.
- Biswas S.K., Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 2009. 30. P:475-487.
- Blackshear P.J. Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *BiochemSocTrans.* 2002. 30. P:945-952.
- Bogoyevitch M.A. The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting. *Bioessays.* 2006.
- Boldrick J.C., Alizadeh A.A., Diehn M. Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99. P:972-977.
- Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004. 25. P:280-288.
- Brennan C.M., Steitz J.A. HuR and mRNA stability. *Cell MolLife Sci.* 2001. 58. P:266-277.
- Brook M, Tchen C.R., Santalucia T. Posttranslational regulation of tristetraprolin subcellular localization and protein stability by p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Mol.Cell.Biol.* 2006. 26. P:2408-2418.
- Brudecki L, Ferguson D.A., McCall C.E., El G.M. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 disrupts proinflammatory protein synthesis in endotoxin-adapted monocytes. *Clin.Vaccine Immunol.* 2013. 20. P:1396-1404.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort J.M. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2002. 61. P:1013-1021.

- Campbell J, Ciesielski C.J. A novel mechanism for TNF- α regulation by p38 MAPK: involvement of NF- κ B with implications for therapy in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 2004.
- Capone C., Fabrizi C., Piovesan P. 2-Aminotetraline derivative protects from ischemia/reperfusion brain injury with a broad therapeutic window. *Neuropsychopharmacology.* 2007. 32. P:1302-1311.
- Carpenter S, Ricci E.P., Mercier B.C., Moore M.J., Fitzgerald K.A. Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 2014. 14. P:361-376.
- Caruso C., Durand D., Schioth H.B., Rey R., Seilicovich A., Lasaga M. Activation of melanocortin 4 receptors reduces the inflammatory response and prevents apoptosis induced by lipopolysaccharide and interferon- γ in astrocytes. *Endocrinology.* 2007. 148. P:4918-4926.
- Cauwels A., Rogge E., Vandendriessche B., Shiva S., Brouckaert P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. *Cell Death.Dis.* 2014. 5. P:e1102.
- Cavaillon J.M., Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care.* 2006. 10. P:233.
- Cavaillon J.M., Adrie C., Fitting C., Adib-Conquy M. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? *J. Endotoxin.Res.* 2003. 9. P:101-107.
- Chan E.D., Riches D.W. IFN- γ + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am.J.Physiol. Cell Physiol.* 2001. 280. P:C441-C450.
- Chan M.M., Moore A.R. Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production. *J. Immunol.* 2010; 184. P:6418-6426.
- Chang L.T., Yuen C.M., Liou C.W. Link between interleukin-10 level and outcome after ischemic stroke. *Neuroimmunomodulation.* 2010; 17. P:223-228.
- Chen C.Y., Shyu A.B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem.* 1995. 20. P:465-470.
- Chen Y, Swanson R.A. Astrocytes and brain injury. *J.Cereb.Blood. Flow Metab.* 2003. 23. P:137-149.
- Chen Y.L., Jiang Y.W., Su Y.L., Lee S.C., Chang M.S., Chang C.J. Transcriptional regulation of tristetraprolin by NF- κ B signaling in LPS-stimulated macrophages. *Mol.Biol.Rep.* 2013. 40. P:2867-2877.
- Cheung P.C., Campbell D.G., Nebreda A.R., Cohen P. Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38 α . *EMBO J.* 2003. 22. P:5793-5805.
- Chi H, Barry S.P., Roth R.J. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc .Natl .Acad. Sci. USA.* 2006. 103. P:2274-2279.

- Chistyakov D.V., Aleshin S., Sergeeva M.G., Reiser G. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta expression and activity levels by toll-like receptor agonists and MAP kinase inhibitors in rat astrocytes. *J. Neurochem.* 2014. 130. P:563-574.
- Chistyakov D.V., Aleshin S.E., Astakhova A.A., Sergeeva M.G., Reiser G. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) alpha and -gamma of rat brain astrocytes in the course of activation by toll-like receptor agonists. *J. Neurochem.* 2015. 134. P:113-124.
- Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. IL10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 2008. 180. P:5771-5777.
- Croons V., Martinet W., Herman A.G., De Meyer G.R. Differential effect of the protein synthesis inhibitors puromycin and cycloheximide on vascular smooth muscle cell viability. *J. Pharmacol.Exp.Ther.* 2008. 325. P:824-832.
- Croons V., Martinet W., Herman A.G., Timmermans J.P., De Meyer G.R. The protein synthesis inhibitor anisomycin induces macrophage apoptosis in rabbit atherosclerotic plaques through p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009. 329. P:856-864.
- Cross A.S. Endotoxin tolerance-current concepts in historical perspective. *J. Endotoxin Res.* 2002. 8. P:83-98.
- Cuadrado A., Nebreda A.R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* 2010. 429. P:403-417.
- Cuenda A., Rouse J., Doza Y.N. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 1995; 364. P:229-233.
- Cuenda A., Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim.Biophys.Acta.* 2007; 1773. P:1358-1375.
- Cuschieri J., Billigren J., Maier R.V. Endotoxin tolerance attenuates LPS-induced TLR-4 mobilization to lipid rafts: a condition reversed by PKC activation. *J LeukocBiol.* 2006. 80. P: 1289-1297.
- D'Elia R.V., Harrison K., Oyston P.C., Lukaszewski R.A., Clark G.C. Targeting the "cytokine storm" for therapeutic benefit. *Clin.Vaccine Immunol.* 2013. 20. P:319-327.
- Diaz-Munoz M.D., Bell S.E., Fairfax K. The RNA-binding protein HuR is essential for the B cell antibody response. *Nat Immunol.* 2015. V.16. P:415-425.
- Dillingh M., van Poelgeest E., Malone K. Characterization of inflammation and immune cell modulation induced by low-dose LPS administration to healthy volunteers. *Journal of Inflammation.* 2014. 11. 28.
- Doller A., Pfeilschifter J., Eberhardt W. Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cell Signal.* 2008. 20. P:2165-2173.

- Du C.S., Yang R.F., Song S.W. Magnesium Lithospermate B Protects Cardiomyocytes from Ischemic Injury Via Inhibition of TAB1-p38 Apoptosis Signaling. *Front Pharmacol.* 2010. 1. P:111.
- Endo Y., Blinova K., Romantseva T., Golding H., Zaitseva M. Differences in PGE2 production between primary human monocytes and differentiated macrophages: role of IL-1beta and TRIF/IRF3. *PLoSOne.* 2014. 9. P:98517.
- England R.N., Preston K.J., Scalia R., Autieri M.V. Interleukin-19 decreases leukocyte-endothelial cell interactions by reduction in endothelial cell adhesion molecule mRNA stability. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2013. 305. P:C255-C265.
- Ennis B.W., Fultz K.E., Smith K.A. Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and tumor cell proliferation by a small molecule inhibitor of c-Jun N-terminal kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005. 313. P:325-332.
- Erridge C., Pridmore A., Eley A., Stewart J., Poxton I.R. Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via toll-like receptor 2. *J. Med. Microbiol.* 2004. 53. P:735-740.
- Faggioli L., Costanzo C., Merola M., Furia A., Palmieri M. Protein synthesis inhibitors cycloheximide and anisomycin induce interleukin-6 gene expression and activate transcription factor NF-kappaB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. 233. P:507-513.
- Fan H., Cook J.A. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J. Endotoxin Res.* 2004. 10. P:71-84.
- Farina C., Aloisi F., Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 2007. 28. P:138-145.
- Farooq F., Balabanian S., Liu X., Holcik M., MacKenzie A. p38 Mitogen-activated protein kinase stabilizes SMN mRNA through RNA binding protein HuR. *HumMolGenet.* 2009. 18. P:4035-4045.
- Feifel E., Obexer P., Andratsch M, et al. p38 MAPK mediates acid-induced transcription of PEPCK in LLC-PK(1)-FBPase(+) cells. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 2002. 283. P: 678-F688.
- Font-Nieves M., Sans-Fons M.G., Gorina R. Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 2012. 287. P:6454-6468.
- Fouda A.Y., Kozak A., Alhusban A., Switzer J.A., Fagan S.C. Anti-inflammatory IL10 is upregulated in both hemispheres after experimental ischemic stroke: Hypertension blunts the response. *Exp. Transl. Stroke Med.* 2013. 5. P:12.
- Fraker D.L., Stovroff M.C., Merino M.J., Norton J.A. Tolerance to tumor necrosis factor in rats and the relationship to endotoxin tolerance and toxicity. *J.Exp.Med.* 1988. 168. P:95-105.

- Freudenberg M.A., Galanos C. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *InfectImmun.* 1988. 56. P:1352-1357.
- Giraudon P., Bernard A. Chronic viral infections of the central nervous system: Aspects specific to multiple sclerosis. *Rev. Neurol.* 2009. 165. P: 789-795.
- Gorina R., Font-Nieves M., Marquez-Kisinousky L., Santalucia T., Planas A.M. Astrocyte TLR-4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFkappaB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia.* 2011. 59. P:242-255.
- Gourine A.V., Dale N., Llaudet E., Poputnikov D.M., Spyer K.M., Gourine V.N. Release of ATP in the central nervous system during systemic inflammation: real-time measurement in the hypothalamus of conscious rabbits. *J Physiol.* 2007. 585. P:305-316.
- Grollman A.P. Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin. *J. Biol. Chem.* 1967. 242. P:3226-3233.
- Gustin A., Kirchmeyer M., Koncina E. NLRP3 Inflammasome Is Expressed and Functional in Mouse Brain Microglia but Not in Astrocytes. *PLoSOne.* 2015. 10. P:e0130624.
- Hassan S., Biswas M.H., Zhang C., Du C., Balaji K.C. Heat shock protein 27 mediates repression of androgen receptor function by protein kinase D1 in prostate cancer cells. *Oncogene.* 2009. 28. P:4386-4396.
- Hayden M.S., Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 2008. 132. P:344-362.
- Hazzalin C.A., Le P.R., Cano E., Mahadevan L.C. Anisomycin selectively desensitizes signalling components involved in stress kinase activation and fos and jun induction. *Mol. Cell. Biol.* 1998. 18. P:1844-1854.
- Herculano-Houzel S., Lent R. Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *JNeurosci.* 2005. 25. P:2518-2521.
- Herculano-Houzel S., Manger P.R., Kaas J.H. Brain scaling in mammalian evolution as a consequence of concerted and mosaic changes in numbers of neurons and average neuronal cell size. *Front Neuroanat.* 2014. 8. P:77.
- Herman A.G., Hayano M., Poyurovsky M.V. Discovery of Mdm2-MdmX E3 ligase inhibitors using a cell-based ubiquitination assay. *Cancer Discov.* 2011. 1. P:312-325.
- Hershko D.D., Robb B.W., Wray C.J., Luo G.J., Hasselgren P.O. Superinduction of IL-6 by cycloheximide is associated with mRNA stabilization and sustained activation of p38 map kinase and NF-kappaB in cultured caco-2 cells. *J. Cell. Biochem.* 2004. 91. P:951-961.
- Hirohashi N., Morrison D.C. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *InfectImmun.* 1996. 64. P:1011-1015.

- Hirschfeld M., Ma Y., Weis J.H., Vogel S.N., Weis J.J. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 2000. 165. P:618-622.
- Hunter C.A., Jones S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* 2015. 16. P:448-457.
- Jack C.S., Arbour N., Manusow J. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J. Immunol.* 2005. 175. P:4320-4330.
- Jensen C.J., Massie A., De K.J. Immune players in the CNS: the astrocyte. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2013. 8. P:824-839.
- Jiang Y., Wu J., Hua Y. Thrombin-receptor activation and thrombin-induced brain tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002. 22. P:404-410.
- Kalis C., Kanzler B., Lembo A., Poltorak A., Galanos C., Freudenberg M.A. Toll-like receptor 4 expression levels determine the degree of LPS-susceptibility in mice. *Eur J Immunol.* 2003. 33. P:798-805.
- Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. 1754. P:253-262.
- Katsanou V., Milatos S., Yiakouvaki A. The RNA-binding protein Elavl1/HuR is essential for placental branching morphogenesis and embryonic development. *Mol. Cell Biol.* 2009. 29. P:2762-2776.
- Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011. 34. P:637-650.
- Kaya N., Tanaka S., Koike T. ATP selectively suppresses the synthesis of the inflammatory protein microglial response factor (MRF)-1 through Ca(2+) influx via P2X(7) receptors in cultured microglia. *Brain Res.* 2002. 952. P:86-97.
- Keene J.D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* 2007. 8. P:533-543.
- Kielian T. Overview of toll-like receptors in the CNS. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009. 336. P:1-14.
- Kielian T. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J. Neurosci. Res.* 2006. 83. P:711-730.
- Kim B., Yang M.S., Choi D. Impaired inflammatory responses in murine Lrrk2-knockdown brain microglia. *PLoS One.* 2012. 7. P:e34693.
- Kim H.H., Abdelmohsen K., Lal A. Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1. *Genes Dev.* 2008. 22. P:1804-1815.
- Kim I.D., Ha B.J. Paeoniflorin protects RAW 264.7 macrophages from LPS-induced cytotoxicity and genotoxicity. *Toxicol. In Vitro.* 2009. 23. P:1014-1019.

- Kohli P., Levy B.D. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 2009. 158. P:960-971.
- Kondo T., Kawai T., Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol.* 2012. 33. P:449-458.
- Kondoh K., Nishida E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. 1773. P:1227-1237.
- Kong Q., Hua H., Cui A., Shao T., Song P., Jiang Y. SP600125 induces Src and type I IGF receptor phosphorylation independent of JNK. *Int. J. Mol. Sci.* 2014. 15. P:16246-16256.
- Kraatz J., Clair L., Rodriguez J.L., West M.A. Macrophage TNF secretion in endotoxin tolerance: role of SAPK, p38, and MAPK. *J. Surg. Res.* 1999. 83. P:158-164.
- Krasowska-Zoladek A., Banaszewska M., Kraszpulski M., Konat G.W. Kinetics of inflammatory response of astrocytes induced by TLR 3 and TLR-4 ligation. *J. Neurosci. Res.* 2007. 85. P:205-212.
- Kratochvill F., Machacek C., Vogl C. Tristetraprolin-driven regulatory circuit controls quality and timing of mRNA decay in inflammation. *Mol. Syst. Biol.* 2011. 7. P:560.
- Kuma Y., Sabio G., Bain J., Shpiro N., Marquez R., Cuenda A. BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 2005. 280. P:19472-19479.
- Kumar H., Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. 388. P:621-625.
- Lali F.V., Hunt A.E., Turner S.J., Foxwell B.M. The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated prot. *J. Biol. Chem.* 2000. 275. P:7395-7402.
- Lebedeva S., Jens M, Theil K, et al. Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol. Cell.* 2011. 43. P:340-352.
- Ledeboer A., Breve J.J., Wierinckx A. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur. J. Neurosci.* 2002. 16. P:1175-1185.
- Lee H.M., Jin H.S., Park J.W., Park S.M., Jeon H.K., Lee T.H. IL-4 augments anisomycin-induced p38 activation via Akt pathway in a follicular dendritic cell (FDC)-like line. *FEBS Lett.* 2003. 549. P:110-114.
- Lee J.D., Kato K., Tobias P.S., Kirkland T.N., Ulevitch R.J. Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J. Exp. Med.* 1992. 175. P:1697-1705.

- Lee J.H., Kim H., Woo J.H., Joe E.H., Jou I. 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid suppresses CCL2/MCP-1 expression in IFN-gamma-stimulated astrocytes by increasing MAPK phosphatase-1 mRNA stability. *J. Neuroinflammation*. 2012. 9. P:34.
- Lee J.H., Woo J.H., Woo S.U. The 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 suppresses monocyte chemoattractant protein-1 expression in IFN-gamma-stimulated astrocytes through induction of MAPK phosphatase-1. *J Immunol*. 2008. 181. P:8642-8649.
- Leyva-Illades D., Cherla R.P., Lee M.S., Tesh V.L. Regulation of cytokine and chemokine expression by the ribotoxic stress response elicited by Shiga toxin type 1 in human macrophage-like THP-1 cells. *Infect. Immun*. 2012. 80. P:2109-2120.
- Li X., Lin W.J., Chen C.Y. KSRP: a checkpoint for inflammatory cytokine production in astrocytes. *Glia*. 2012. 60. P:1773-1784.
- Limburg M., Wijdicks E.F., Li H. Ischemic stroke after surgical procedures: clinical features, neuroimaging, and risk factors. *Neurology*. 1998. 50. P:895-901.
- Lin F.Y., Chen Y.H., Lin Y.W. The role of human antigen R, an RNA-binding protein, in mediating the stabilization of toll-like receptor 4 mRNA induced by endotoxin: a novel mechanism involved in vascular inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2006. 26. P:2622-2629.
- Lin F.Y., Tsai Y.T., Lee C.Y. TNF-alpha-decreased thrombomodulin expression in monocytes is inhibited by propofol through regulation of tristetraprolin and human antigen R activities. *Shock*. 2011. 36. P:279-288.
- Lisi L., Navarra P., Feinstein D.L., Dello R.C. The mTOR kinase inhibitor rapamycin decreases iNOS mRNA stability in astrocytes. *J. Neuroinflammation*. 2011.8. P:1.
- Liu X., Wang Q., Chen W., Wang C. Dynamic regulation of innate immunity by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013. 24. P:559-570.
- Lopez-Collazo E., del F.C.. Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Crit Care*. 2013. 17. P:242.
- Lu J.Y., Schneider R.J. Tissue distribution of AU-rich mRNA-binding proteins involved in regulation of mRNA decay. *J. Biol. Chem*. 2004. 279. P:12974-12979.
- Lu N., Liu J., Liu J. Antagonist effect of triptolide on AKT activation by truncated retinoid X receptor-alpha. *PLoSOne*. 2012. 7. P:e35722.
- Ma W.J., Cheng S., Campbell C., Wright A., Furneaux H. Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J. Biol. Chem*. 1996. 271. P:8144-8151.
- Martial S., Giorgelli J.L., Renaudo A., Derijard B., Soriani O. SP600125 inhibits Kv channels through a JNK-independent pathway in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2008. 366. P:944-950.

- Mathison J.C., Virca G.D., Wolfson E., Tobias P.S., Glaser K., Ulevitch R.J. Adaptation to bacterial lipopolysaccharide controls lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in rabbit macrophages. *J. Clin. Invest.* 1990. 85. P:1108-1118.
- Medvedev A.E., Piao W., Shoenfelt J. Role of TLR-4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. *J. Biol. Chem.* 2007. 282. P:16042-16053.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008. 454. P:428-435.
- Medzhitov R., Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat. Rev. Immunol.* 2009. 9. P:692-703.
- Medzhitov R., Schneider D.S., Soares M.P. Disease tolerance as a defense strategy. *Science.* 2012. 335. P:936-941.
- Mizuno T., Sawada M., Marunouchi T., Suzumura A. Production of interleukin-10 by mouse glial cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. 205. P:1907-1915.
- Moller T., Hanisch U.K., Ransom B.R. Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J. Neurochem.* 2000. 75. P:1539-1547.
- Morris M., Li L. Molecular mechanisms and pathological consequences of endotoxin tolerance and priming. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2012. 60. P:13-18.
- Morris M.C., Gilliam E.A., Button J., Li L. Dynamic modulation of innate immune response by varying dosages of lipopolysaccharide (LPS) in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 2014. 289. P:21584-21590.
- Morris M.C., Gilliam E.A., Li L. Innate immune programming by endotoxin and its pathological consequences. *Front Immunol.* 2014. 5. P:680.
- Murakami K., Nakamura Y., Yoneda Y. Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes. *Neuroscience.* 2003. 117. P:37-42.
- Murphy K. Janeway's Immunobiology. 8th edition. New York: Garland Science, 2011. 888 p.
- Nadeau S., Filali M., Zhang J. Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF: implications for neuropathic pain. *J. Neurosci.* 2011. 31. P:12533-12542.
- Nahid M.A., Satoh M., Chan E.K. Mechanistic role of microRNA-146a in endotoxin-induced differential cross-regulation of TLR signaling. *J. Immunol.* 2011. 186. P:1723-1734.
- Nakayama K., Okugawa S., Yanagimoto S. Involvement of IRAK-M in peptidoglycan-induced tolerance in macrophages. *J. Biol. Chem.* 2004. 279. P:6629-6634.
- Newton K., Dixit V.M. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. 4.

- Newton R., Stevens D.A., Hart L.A., Lindsay M., Adcock I.M., Barnes P.J. Superinduction of COX-2 mRNA by cycloheximide and interleukin-1 β involves increased transcription and correlates with increased NF-kappaB and JNK activation. *FEBS Lett.* 1997. 418. P:135-138.
- Niego B., Samson A.L., Petersen K.U., Medcalf R.L. Thrombin-induced activation of astrocytes in mixed rat hippocampal cultures is inhibited by soluble thrombomodulin. *Brain Res.* 2011. 1381. P:38-51.
- Nimah M., Zhao B., Denenberg A.G. Contribution of MKP-1 regulation of p38 to endotoxin tolerance. *Shock.* 2005. 23. P:80-87.
- Nishino A., Suzuki M., Ohtani H. Thrombin may contribute to the pathophysiology of central nervous system injury. *JNeurotrauma.* 1993. 10. P:167-179.
- Norden D.M., Fenn A.M., Dugan A., Godbout J.P. TGF β produced by IL10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia.* 2014. 62. P:881-895.
- Owen J.A., Kuby J. *Kuby Immunology*. 7th edition. New York: W.H. Freeman, 2013. 692 p.
- Patenaude J., D'Elia M., Cote-Maurais G., Bernier J. LPS response and endotoxin tolerance in Flt-3L-induced bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol.* 2011. 271. P:184-191.
- Peirce M.J., Brook M., Morrice N. Themis2/ICB1 is a signaling scaffold that selectively regulates macrophage Toll-like receptor signaling and cytokine production. *PLoSOne.* 2010. 5. P:11465.
- Penas F., Mirkin G.A., Vera M. Treatment in vitro with PPAR α and PPAR γ ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T. cruzi-infected mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. 1852. P:893-904.
- Peng T., Lu X., Lei M., Moe G.W., Feng Q. Inhibition of p38 MAPK decreases myocardial TNF- α expression and improves myocardial function and survival in endotoxemia. *Cardiovasc. Res.* 2003. 59. P:893-900.
- Perea G., Navarrete M., Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 2009. 32. P:421-431.
- Plotnikov A., Zehorai E., Procaccia S., Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. 1813. P:1619-1633.
- Prabhala P., Bunge K., Rahman M.M., Ge Q., Clark A.R., Ammit A.J. Temporal regulation of cytokine mRNA expression by tristetraprolin: dynamic control by p38 MAPK and MKP-1. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2015. 308. P:L973-L980.
- Pulendran B., Kumar P., Cutler C.W., Mohamadzadeh M., Van D.T., Banchereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *JImmunol.* 2001.167. P:5067-5076.

- Purwana I.N., Kanasaki H., Oride A., Miyazaki K. Induction of dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and the role for gonadotropin subunit gene expression in mouse pituitary gonadotroph L beta T2 cells. *Biol. Reprod.* 2010. 82. P:352-362.
- Rabani M., Levin J.Z., Fan L. Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells. *NatBiotechnol.* 2011. 29. P:436-442.
- Raghavan A., Bohjanen P.R. Microarray-based analyses of mRNA decay in the regulation of mammalian gene expression. *Brief Funct. Genomic Proteomic.* 2004. 3. P:112-124.
- Rajakariar R., Yaqoob M.M., Gilroy D.W. COX-2 in inflammation and resolution. *Mol. Interv.* 2006. 6. P:199-207.
- Ramilo O., Allman W., Chung W. Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections. *Blood.* 2007. 109. P:2066-2077.
- Rasley A., Tranguch S.L., Rati D.M., Marriott I. Murine glia express the immunosuppressive cytokine, interleukin-10, following exposure to *Borrelia burgdorferi* or *Neisseria meningitidis*. *Glia.* 2006. 53. P:583-592.
- Rhee W.J., Ni C.W., Zheng Z., Chang K., Jo H., Bao G. HuR regulates the expression of stress-sensitive genes and mediates inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. 107. P:6858-6863.
- Ricciotti E., FitzGerald G.A. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. 31. P:986-1000.
- Rock R.B., Gekker G., Hu S. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004. 17. P:942-964.
- Rosenzweig H.L., Lessov N.S., Henshall D.C., Minami M., Simon R.P., Stenzel-Poore M.P. Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice. *Stroke.* 2004. 35. P:2576-2581.
- Rosenzweig H.L., Minami M., Lessov N.S. Endotoxin preconditioning protects against the cytotoxic effects of TNFalpha after stroke: a novel role for TNFalpha in LPS-ischemic tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007. 27. P:1663-1674.
- Saitoh T., Akira S. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J. Cell Biol.* 2010. 189. P:925-935.
- Sarvas J.L., Khaper N., Lees S.J. The IL-6 Paradox: Context Dependent Interplay of SOCS3 and AMPK. *J. Diabetes Metab.* 2013. 13.
- Schoenberg D.R., Maquat L.E. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 2012. 13. P:246-259.

- Schroder M., Meisel C., Buhl K. Different modes of IL10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. *J. Immunol.* 2003. 170. P:5260-5267.
- Sergeeva M.G., Aleshin S.E., Grabeklis S., Reiser G. PPAR activation has dichotomous control on the expression levels of cytosolic and secretory phospholipase A2 in astrocytes; inhibition in naive, untreated cells and enhancement in LPS-stimulated cells. *J. Neurochem.* 2010. 115. P:399-410.
- Serhan C.N., Hong S., Gronert K. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J. Exp. Med.* 2002. 196. P:1025-1037.
- Shafer L.M., Slice L.W. Anisomycin induces COX-2 mRNA expression through p38 (MAPK) and CREB independent of small GTPases in intestinal epithelial cells. *BiochimBiophysActa.* 2005. 1745. P:393-400.
- Sharifi A.M., Hoda F.E., Noor A.M. Studying the effect of LPS on cytotoxicity and apoptosis in PC12 neuronal cells: role of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 protein expression. *Toxicol. Mech. Methods.* 2010. 20. P:316-320.
- Sharifpour M., Moore L.E., Shanks A.M., Didier T.J., Kheterpal S., Mashour G.A. Incidence, predictors, and outcomes of perioperative stroke in noncarotid major vascular surgery. *Anesth. Analg.* 2013. 116. P:424-434.
- Shichita T., Sakaguchi R., Suzuki M., Yoshimura A. Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol.* 2012. 3. P:132.
- Sidhu J.S., Omiecinski C.J. Protein synthesis inhibitors exhibit a nonspecific effect on phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1998. 273. P:4769-4775.
- Simone L.E., Keene J.D. Mechanisms coordinating ELAV/Hu mRNA regulons. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2013. 23. P:35-43.
- Smoak K., Cidlowski J.A. Glucocorticoids regulate tristetraprolin synthesis and posttranscriptionally regulate tumor necrosis factor alpha inflammatory signaling. *Mol. Cell. Biol.* 2006. 26. P:9126-9135.
- Sofroniew M.V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015. 16. P:249-263.
- Sofroniew M.V. Astrogliosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015. 7. P:a020420.
- Sofroniew M.V. Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist.* 2014. 20. P:160-172.
- Sofroniew M.V., Vinters H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010. 119. P:7-35.

- Spera P.A., Ellison J.A., Feuerstein G.Z., Barone F.C.. IL10 reduces rat brain injury following focal stroke. *NeurosciLett*. 1998. 251. P:189-192.
- Starakis I., Panos G., Koutras A., Mazokopakis E.E. Pathogens and chronic or long-term neurologic disorders. *Cardiovasc Targets*. 2011. 11. P:40-52.
- Stockl S., Bauer R.J., Bosserhoff A.K., Gottl C., Grifka J., Grassel S. Sox9 modulates cell survival and adipogenic differentiation of multipotent adult rat mesenchymal stem cells. *J. Cell. Sci*. 2013. 126. P:2890-2902.
- Stoecklin G., Stubbs T., Kedersha N. MK2-induced tristetraprolin: 14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J*. 2004. 23. P:1313-1324.
- Suk K, Lee J, Hur J, et al. Activation-induced cell death of rat astrocytes. *Brain Res*. 2001. 900. P:342-347.
- Suo Z, Wu M, Ameenuddin S, et al. Participation of protease-activated receptor-1 in thrombin-induced microglial activation. *J. Neurochem*. 2002. 80. P:655-666.
- Takahashi A, Mikami M, Yang J. p38 mitogen-activated protein kinase independent SB203580 block of H2O2-induced increase in GABAergic mIPSC amplitude. *Neuroreport*. 2007. 18. P:963-967.
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol*. 2004. 16. P:3-9.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol*. 2015. 109. P:14.
- Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010. P:805-820.
- Tarassishin L., Suh H.S., Lee SC. LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: role of CD14. *Glia*. 2014. 62. P:999-1013.
- Taylor G.A, Carballo E., Lee D.M. A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity*. 1996. 4. P:445-454.
- Taylor G.A., Thompson M.J., Lai W.S., Blackshear P.J. Mitogens stimulate the rapid nuclear to cytosolic translocation of tristetraprolin, a potential zinc-finger transcription factor. *Mol. Endocrinol*. 1996. 10. P:140-146.
- Tchen C.R., Brook M., Saklatvala J., Clark A.R. The stability of tristetraprolin mRNA is regulated by mitogen-activated protein kinase p38 and by tristetraprolin itself. *J. Biol. Chem*. 2004. 279. P:32393-32400.
- Thangavel J., Samanta S., Rajasingh S. Epigenetic modifiers reduce inflammation and modulate macrophage phenotype during endotoxemia-induced acute lung injury. *J. Cell Sci*. 2015. 128. P:3094-3105.
- Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P., Farrar J., Martin T.R., Katze M.G. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2012. 76. P:16-32.

- Titov D.V., Gilman B., He Q.L. XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nat. Chem. Biol.* 2011. 7. P:182-188.
- Tsai C.F., Kuo Y.H., Yeh W.L. Regulatory effects of caffeic acid phenethyl ester on neuroinflammation in microglial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2015. 16. P:5572-5589.
- Ulivi V., Cancedda R., Cancedda F.D. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J(2) inhibits the synthesis of the acute phase protein SIP24 in cartilage: Involvement of COX-2 in resolution of inflammation. *J. Cell Physiol.* 2008. 217. P:433-441.
- Ulivi V., Giannoni P., Gentili C., Cancedda R., Descalzi F. p38/NF-kB-dependent expression of COX-2 during differentiation and inflammatory response of chondrocytes. *J. Cell Biochem.* 2008. 104. P:1393-1406.
- Vila N., Castillo J., Davalos A., Esteve A., Planas A.M., Chamorro A. Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2003. 34. P:671-675.
- Wang H., Uhl J.J., Stricker R., Reiser G. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002. 283. P:C1351-C1364.
- Wang J., Dore S. Inflammation after intracerebral hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007. 27. P:894-908.
- Wang J., Ford H.R., Grishin A.V. NF-kappaB-mediated expression of MAPK phosphatase-1 is an early step in desensitization to TLR ligands in enterocytes. *Mucosal Immunol.* 2010. 3. P:523-534.
- West M.A., Heagy W. Endotoxin tolerance: a review. *Crit. Care Med.* 2002. 30. P:S64-S73.
- West M.A., Koons A. Endotoxin tolerance in sepsis: concentration-dependent augmentation or inhibition of LPS-stimulated macrophage TNF secretion by LPS pretreatment. *J. Trauma.* 2008. 65. P:893-898.
- Wolf A., Beuerlein K., Eckart C. Identification and functional characterization of novel phosphorylation sites in TAK1-binding protein (TAB)1. *PLoS One.* 2011. 6. P:e29256.
- Woo J.H., Lee J.H., Kim H. MAP kinase phosphatase-1 expression is regulated by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 via a HuR-dependent post-transcriptional mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. P:612-625.
- Xi G., Reiser G., Keep R.F. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *J. Neurochem.* 2003. 84. P:3-9.
- Yang H., Feng G.D., Liang Z. In vitro beneficial activation of microglial cells by mechanically-injured astrocytes enhances the synthesis and secretion of BDNF through p38MAPK. *Neurochem. Int.* 2012. 61. P:175-186.

- Yang R.B., Mark M.R., Gray A. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*. 1998. 395. P:284-288.
- Yang Y., Kim S.C., Yu T. Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *MediatorsInflamm*. 2014. P:352371.
- Yoshizawa T., Hammaker D., Sweeney S.E., Boyle D.L., Firestein G.S. Synoviocyte innate immune responses: I. Differential regulation of interferon responses and the JNK pathway by MAPK kinases. *J. Immunol*. 2008. 181. P:3252-3258.
- Yuk J.M., Shin D.M., Lee H.M. The orphan nuclear receptor SHP acts as a negative regulator in inflammatory signaling triggered by Toll-like receptors. *NatImmunol*. 2011. 12. P:742-751.
- Zhao Q., Shepherd EG, Manson ME, Nelin LD, Sorokin A, Liu Y. The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *J. Biol. Chem*. 2005; 280. P:8101-8108.