

УДК 577.2

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ 2 АГОНИСТАМИ ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ PPAR В МОДЕЛИ ЭНДОТОКСИНОВОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ НА АСТРОЦИТАХ*

© 2015 А.А. Астахова^{1**}, Д.В. Чистяков¹,
Е.В. Панкевич², М.Г. Сергеева¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
119991 Москва; факс: +7(495)939-0338,
электронная почта: alina_astakhova@yahoo.com

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики,
119991 Москва; факс: +7(495)939-4195

Поступила в редакцию 08.04.15
После доработки 20.05.15

Эндотоксиновая толерантность (ЭТ) представляет собой изменение иммунного ответа при многократной стимуляции организма, ткани или клетки липополисахаридом (ЛПС). Характеристиками ЭТ служат снижение индукции провоспалительных медиаторов (TNF α , IL6 и др.) и усиление индукции противовоспалительных маркеров (IL10, TGF β). ЭТ в целом является защитным механизмом, однако может приводить к дефициту врожденного иммунного ответа и иметь отрицательные для организма последствия. Актуальной задачей является выявление механизмов регуляции уровня воспалительного ответа при эндотоксиновой толерантности. В работе исследовано изменение экспрессии циклооксигеназы 2 (COX2) в модели эндотоксиновой толерантности на астроцитах и проанализирована возможность регуляции экспрессии этого фермента с помощью агонистов ядерных рецепторов группы PPAR. Результаты показывают, что 1) в астроцитах развивается эндотоксиновая толерантность, что приводит к понижению при вторичной стимуляции экспрессии мРНК TNF α и COX2; 2) толерантность проявляется на уровне высвобождения TNF α и синтеза белка COX2; 3) агонисты разных подтипов PPAR – GW7647, L-165041, росиглитазон – могут регулировать экспрессию COX2 в условиях развития эндотоксиновой толерантности. При этом росиглитазон (агонист PPAR γ) индуцирует экспрессию COX2, а GW7647 (агонист PPAR α) и L-165041 (агонист PPAR β) – снижают. Результаты проведенного исследования указывают на то, что в условиях эндотоксиновой толерантности в астроцитах сохраняется возможность повышения и понижения экспрессии COX2, и агонисты PPAR могут быть эффективны в регуляции этой мишени в условиях многократной стимуляции эндотоксином в тканях мозга.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: циклооксигеназа 2, ядерные рецепторы, агонисты PPAR, росиглитазон, эндотоксиновая толерантность, врожденный иммунитет, астроциты.

Эндотоксиновая толерантность (ЭТ) представляет собой изменение ответа врожденного иммунитета на острую провоспалительную стимуляцию при предварительной экспозиции организма, ткани или клетки к эндотоксину [1, 2].

Принятые сокращения: ЦНС – центральная нервная система; ЭТ – эндотоксиновая толерантность; PPAR – рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором; TNF α – фактор некроза опухолей альфа; ЛПС – липополисахарид (эндотоксин); COX2 – циклооксигеназа 2; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; IL – интерлейкин; Ros. – росиглитазон.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, VM15-110, 02.08.2015.

** Адресат для корреспонденции.

Это изменение характеризуется снижением индукции провоспалительных медиаторов (TNF α , IL6, IL1 β и др.) и усилением экспрессии противовоспалительных маркеров (IL10, TGF β) в ответ на повторную стимуляцию липополисахаридом (ЛПС) [1, 3]. ЭТ может иметь как благоприятные, так и негативные последствия для организма. Уже первые исследования показали, что предварительная стимуляция животных эндотоксином повышает выживаемость при последующем воздействии на них летальными концентрациями ЛПС [1]. Было также установлено, что предварительная обработка нервной ткани ЛПС снижает негативные эффекты последующего инсульта: уменьшает степень повреждения и сокращает время восстановления функцио-

нальных параметров [4, 5]. С другой стороны, известно, что на поздних этапах сепсиса действуют механизмы, аналогичные ЭТ, которые считают важными факторами, обуславливающими летальные исходы при сепсисе [6]. В связи с этим актуальной задачей представляется выявление механизмов контроля воспалительных ответов клеток при эндотоксиновой толерантности.

Астроциты являются вспомогательными клетками центральной нервной системы и участвуют в процессах метаболизма, проведения сигналов в нервной ткани, а также наделены иммунокомпетентными свойствами [7, 8]. Астроциты экспрессируют сенсоры врожденного иммунитета (рецепторы групп TLR, NLR, PAR и др.), которые индуцируют производство медиаторов иммунного ответа (IL6, TNF α , IL10 и др.) в ответ на воздействие провоспалительных стимулов (ЛПС, тромбина и других веществ) [9–12] и участвуют в осуществлении иммунных функций в тканях ЦНС в условиях воспалительных реакций, в т.ч. в процессах, сопровождающих инсульты [13]. Следует отметить, что ранее на астроцитах было исследовано изменение реактивности клеток на ЛПС при многократной стимуляции [14, 15]. Показано, что ЭТ в астроглиальных культурах характеризуется неполным подавлением индукции экспрессии IL6, а также дифференциальным изменением экспрессии ряда важных медиаторов воспаления (TNFR, TGF β и др.). Однако вопрос регуляции воспалительного ответа при ЭТ в астроцитах остался неисследованным.

Циклооксигеназа 2 (COX2) отвечает за синтез простагландинов и индуцируется в ответ на воспалительные стимуляции в тканях мозга [16, 17]. Фермент играет двойную роль в регуляции иммунного ответа [17, 18]. На начальных этапах COX2 обуславливает развитие провоспалительных реакций, и ингибирование COX2 лежит в основе действия аспирина, ибупрофена и других нестероидных противовоспалительных препаратов. Однако на более поздних этапах воспалительного ответа COX2 меняет свою роль и участвует в производстве противовоспалительных медиаторов [17, 18]. Инактивация фермента при этом может приводить к нарушениям процессов разрешения воспаления [19, 20]. Таким образом, представляется перспективным исследование механизмов и последствий усиления и подавления активности COX2 в условиях разных моделей нарушения воспаления, в т.ч. в рамках модели эндотоксиновой толерантности. Для ряда клеток ранее было показано подавление индукции экспрессии COX2 в условиях эндотоксиновой толерантности [21, 22]. Данные об участии

COX2 в эндотоксиновой толерантности в астроцитах в настоящее время отсутствуют.

Среди регуляторов иммунного ответа в ЦНС пристальное внимание уделяется ядерным рецепторам группы PPAR: PPAR α , PPAR β и PPAR γ . Эти факторы транскрипции участвуют в контроле экспрессии многих медиаторов воспаления, в т.ч. COX2. Для всех изоформ PPAR известны агонисты, обладающие противовоспалительной активностью. Ряд агонистов, таких как росиглитазон и вещества группы фибратов, уже используется в клинической практике в качестве гиполипидемических препаратов и для лечения диабета II типа. Многие агонисты проходят испытания в качестве претендентов для лечения нейродегенеративных состояний, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и др. [23–26]. Ранее наша группа показала участие рецепторов PPAR в развитии воспаления в астроцитах и возможность регуляции агонистами ядерных рецепторов PPAR ферментов класса фосфолипаза A2, поставляющих арахидоновую кислоту – ключевой субстрат COX2 [27], а также модулирующих экспрессию COX2 [9, 11]. Стоит подчеркнуть, что для астроцитов возможно не только подавление, но и индуцирование экспрессии COX2 под воздействием агонистов PPAR. Так, стимуляция PPAR γ приводит к усилению экспрессии COX2 в PPAR β -зависимой форме, а добавление к клеткам агонистов PPAR α и PPAR β снижает ЛПС-индуцированное воспаление в клетках [9]. Однако указанные эффекты были получены при острой стимуляции клеток ЛПС, и остается невыясненным, сохраняется ли возможность регуляции экспрессии COX2 в астроцитах в условиях ЭТ.

В данной работе мы исследовали развитие эндотоксиновой толерантности в условиях продолжительной стимуляции астроцитов ЛПС, проследили изменение экспрессии COX2 в условиях ЭТ и проанализировали возможность регуляции экспрессии COX2 на уровне мРНК с использованием GW7647 (агониста PPAR α), L-165041 (агониста PPAR β) и росиглитазона (агониста PPAR γ). Наши данные впервые демонстрируют, что индукция экспрессии COX2 при стимуляции астроцитов ЛПС в условиях эндотоксиновой толерантности является пониженной и может регулироваться с помощью агонистов PPAR α , PPAR β и PPAR γ .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы и реактивы. Культуральная среда DMEM, эмбриональная телячья сыворотка, стрептомицин, пенициллин, трипсин с ЭДТА

(«ПанЭко», Россия); липополисахарид («Sigma Aldrich», США); GW7647, L-165041, росиглитазон: Caymann, mAb против циклооксигеназы 2 (E1412), β -тубулина (L0512), HRP-конъюгированные антитела (L1510) («Santa Cruz», США); субстрат SuperSignal™ West Pico («Pierce», США); набор для анализа высвобождения TNF α (Rat TNF alpha ELISA Kit), набор First Strand cDNA Synthesis Kit, набор Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2 \times) («Thermo Scientific», США); набор PowerLyzer RNA Isolation, набор Cytotoxicity Detection Kit (LDH) («Roche», США).

Получение первичных культур астроцитов и стимуляции. Первичные культуры астроцитов были получены от новорожденных крысят линии Wistar в соответствии с ранее опубликованной методикой [11]. Животным проводили декапитацию в асептических условиях, из головного конца извлекали мозг. Мозг промывали в ледяном буферном растворе Puck's (137,0 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,2 mM KH_2PO_4 , 0,17 mM Na_2HPO_4 , 5,0 mM глюкоза, 58,4 mM сахароза, pH 7,4) 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 глюкозы, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), антибиотики: стрептомицин 50 ед/мл, пенициллин 50 мкг/мл) и инкубировали при 37°, 5%-ном CO_2 , влажности 10%. Спустя 5 сут после выделения культуры отряхивали для удаления микроглии и меняли среду на свежую среду того же состава. Далее клетки культивировали еще в течение 6 сут со сменой среды каждые 2 сут. После получения монослоя культуры промывали теплым (37°) фосфатно-солевым буфером (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) и инкубировали с раствором трипсина с ЭДТА. Трипсинизацию останавливали добавлением среды с сывороткой, клетки отмывали от раствора фермента. Клетки рассаживали на шестилуночные культуральные планшеты в количестве 750 тыс. клеток на лунку и оставляли для прикрепления на 24 ч. После этого клеткам меняли среду на свежие порции DMEM. Для создания модели эндотоксиновой толерантности к клеткам добавляли ЛПС в концентрации 10 нг/мл. Далее клетки инкубировали в течение 46 ч. После этого среду во всех лунках заменяли на DMEM с 1%-ным содержанием FBS. Через 2 ч после смены среды клетки стимулировали согласно протоколам экспериментов (рис. 1).

Иммуноблоттинг. После окончания периода стимуляции из планшетов удаляли среду, клетки промывали ледяным фосфатно-солевым буфером и в течение 10 мин лизировали в буфере

RIPA (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA , 1%-ный Nonidet P-40, 1%-ный $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$), лизаты клеток центрифугировали (10 000 об/мин, 10 мин). Далее определяли концентрацию общего белка в пробах в соответствии с классическим протоколом Брэдфорд и добавляли к лизатам буфер Лэммли для Ds-Na-электрофореза. Процедуры Ds-Na-электрофореза по Лэммли и переноса белка на нитроцеллюлозную мембрану (0,2 мкм) проводили в соответствии с общепринятым протоколом. Качество переноса белка определяли посредством окрашивания мембраны раствором Ponceau S («Helicon», Россия). Мембраны блокировали в буфере TBS (40 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris, pH 7,4) с 5% обезжиренного молока и 0,05%-ным Tween. Далее мембраны помещали в раствор TBST с первичными антителами против COX2 в разведении 1 : 500 и инкубировали в течение 8 ч в холоде на шейкере. После отмывки и мечения мембран вторичными антителами их проявляли с использованием хемилюминесцентного субстрата («Thermo Scientific», США). После анализа экспрессии COX2 мембраны обрабатывали буфером Restore Buffer («Thermo Scientific», США) и использовали для анализа экспрессии β -тубулина. Фотосъемку мембран проводили с применением камер BioRad (Gel Doc™ XR+ System, «BioRad», США). Количественный анализ экспрессии проводили в приложении QuantityOne (BioRad 4.6.9).

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в режиме реального времени. Выделение тотальной мРНК производили с помощью набора PowerLyzer RNA Isolation. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически. Для получения первой цепи кДНК использовали набор для обратной транскрипции First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Scientific», США). Реакция проводилась в соответствии с рекомендациями производителя, использовались oligo(dT) праймеры. Относительный уровень мРНК COX2 определяли методом ПЦР в реальном времени с помощью амплификатора DTlite 4 («ДНК-Технология», Россия) и набора Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix («Thermo Scientific», США). В одну реакционную смесь объемом 25 мкл брали 70 нг кДНК. В качестве конститутивного гена для нормализации данных использовали ген β -актина. Для наработки фрагментов генов использовали следующие праймеры:

COX2: FW 5'-TGTACAAGCAGTGGCAAAGG-3';
RV 5'-TAGCATCTGGACGAGGCTTT-3';

TNF α : FW 5'-ACGTCGTAGCAAACCACCAA-3';
RV 5'-AAATGGCAAATCGGCTGAC-3';

β -актин: FW 5'-TCATCACTATCGGCAATGAGCGGT-3';
RV 5'-ACAGCACTGTGTTGGCATAGAGGT-3'.

Анализ высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Среду отбирали из лунок и сохраняли для последующего анализа высвобождения ЛДГ. Уровень высвобождения ЛДГ определяли с помощью коммерческого набора Cytotoxicity Detection Kit (LDH) («Roche», США) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ высвобождения TNF α . Среду отбирали из лунок и сохраняли для последующего анализа высвобождения цитокинов. Уровень высвобождения TNF α определяли с помощью коммерческого набора TNF alpha ELISA Kit, Rat («Thermo Scientific», США) в соответствии с инструкциями производителя.

Статистическая обработка. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности, 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, $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Условия эндотоксиновой толерантности не-токсичны для культур астроцитов. Общая схема стимуляций клеток в экспериментах приведена на рис. 1.

Для выявления цитотоксического эффекта кратковременной и длительной стимуляции астроцитов эндотоксином мы провели анализ высвобождения ЛДГ в экспериментальных и контрольных условиях. Во всех исследованных условиях высвобождение ЛДГ составляло 8–10% от общего количества ЛДГ в клетках (рис. 2). Значения, полученные при исследовании модели ЭТ и модели острой стимуляции, не отличались от значений, выявленных в контрольных культурах (0/0). В целом данные указывают на то, что острая стимуляция культур ЛПС, а также условия эндотоксиновой толерантности не являются токсичными для клеток.

Повторная стимуляция клеток липополисахаридом приводит к эндотоксиновой толерантности. Классической характеристикой эндотоксиновой толерантности считается снижение индукции экспрессии TNF α в ответ на повторный

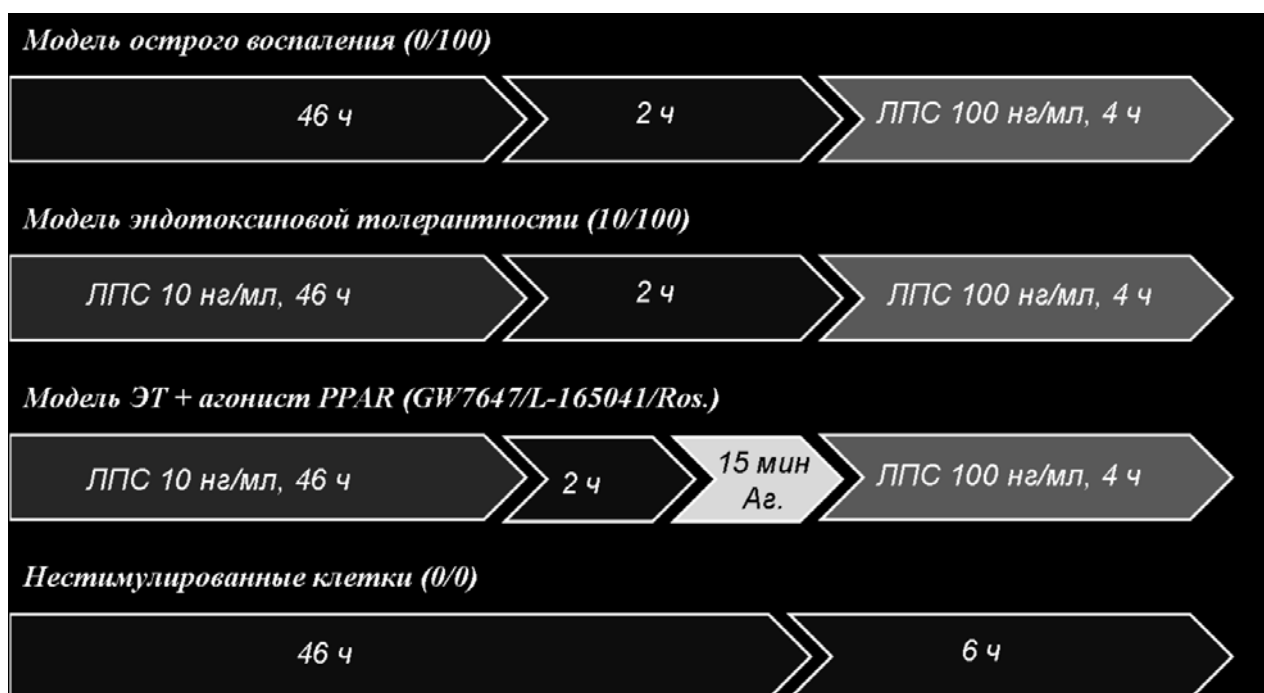


Рис. 1. Схема стимуляций для получения клеточных моделей. Клетки рассаживали в культуральные планшеты и оставляли на 24 ч (37°, 5%-ный CO₂, влажность 10%). После этого клеткам меняли культуральную среду на свежую того же состава (DMEM, 10%-ная FBS) с добавлением 10 нг/мл ЛПС (модель 10/100 и модели GW7647/L-165041/Ros.) или без добавления ЛПС (модель 0/100 и модель 0/0). Через 46 ч среду заменяли на свежую (DMEM, 1%-ная FBS). Спустя 2 ч клетки стимулировали ЛПС (100 нг/мл) или агонистами PPAR и ЛПС, агонисты (на схеме обозначены Аг.) добавляли за 15 мин до ЛПС

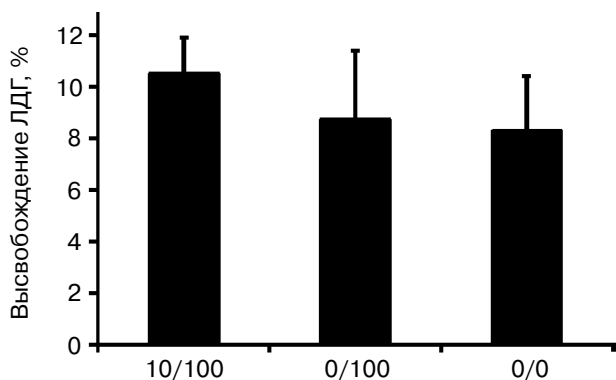


Рис. 2. Высвобождение ЛДГ в культурах астроцитов в условиях модели острого воспаления и эндотоксиновой толерантности. Культуры астроцитов были обработаны в соответствии со схемами стимуляций, приведенными на рис. 1. Культуральную среду от экспериментальных и контрольных образцов собирали для анализа высвобождения ЛДГ. За 100% принят уровень ЛДГ в лизатах клеток

провоспалительный стимул [1–3]. Для того чтобы оценить, вызывают ли используемые в нашей работе условия эндотоксиновую толерантность, мы проверили изменение экспрессии TNF α в ответ на острую стимуляцию астроцитов ЛПС (100 нг/мл) в условиях, когда клетки были предварительно обработаны ЛПС в меньших концентрациях (10 нг/мл, модель 10/100). В качестве положительного контроля мы использовали уровень экспрессии TNF α в культурах

клеток, стимулированных ЛПС без предварительной адаптации к меньшим концентрациям эндотоксина (модель 0/100). Наши результаты показали значительное снижение уровня экспрессии TNF α при повторной обработке культур ЛПС. Однако уровень экспрессии TNF α при эндотоксиновой толерантности примерно в 25 раз превышал базовый уровень экспрессии цитокина в нестимулированных клетках (модель 0/0) (рис. 3). Этот эффект был также выявлен на уровне высвобождения TNF α в культуральную среду: в условиях модели острой стимуляции (0/100) концентрация TNF α составила ~750 пг/мл (754 ± 13); в то же время соответствующие показатели составили 280 ± 12 пг/мл в условиях без стимуляции клеток (0/0) и 333 ± 9 для клеток, стимулированных ЛПС в условиях ЭТ (10/100). Данные результаты указывают на развитие ЭТ.

Эндотоксиновая толерантность частично блокирует индукцию циклооксигеназы 2. Далее мы проанализировали изменение экспрессии COX2 в условиях нашей модели. Показано, что острая стимуляция астроцитов ЛПС (100 нг/мл, без предварительной адаптации к ЛПС) индуцирует ~30-кратное увеличение экспрессии мРНК COX2 по сравнению с контролем (нестимулированными клетками). Обработка клеток ЛПС в концентрациях 10 нг/мл снижала индуцированный большими концентрациями ЛПС (100 нг/мл) уровень экспрессии мРНК COX2 примерно в 6 раз. Подавление индукции COX2 в ответ на

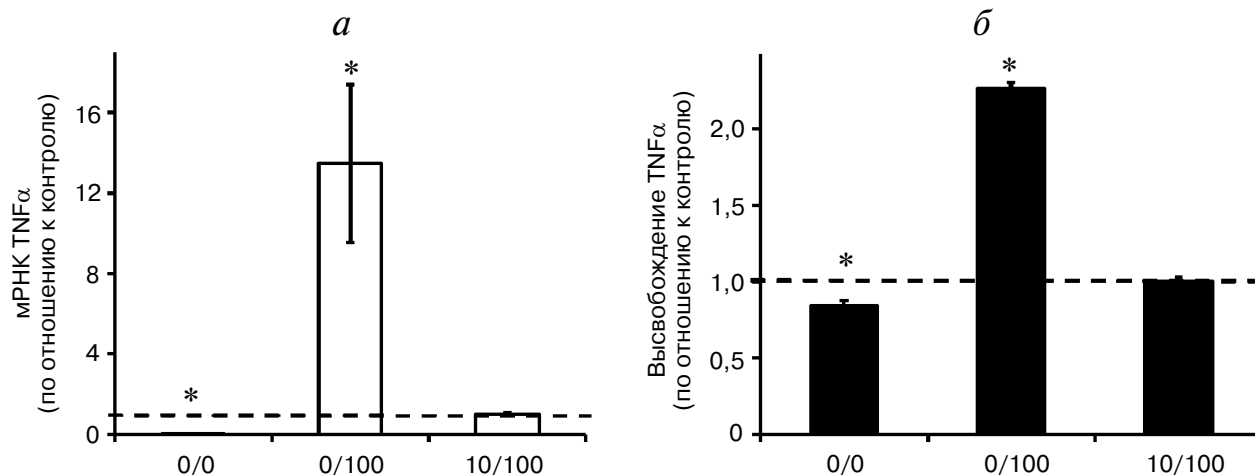


Рис. 3. Изменение экспрессии мРНК (а) и уровня высвобождения в культуральную среду из клеток (б) фактора некроза опухолей альфа (TNF α) в астроцитах при стимуляции ЛПС в условиях модели острого воспаления (0/100) и эндотоксиновой толерантности (10/100). Культуры астроцитов обработаны в соответствии со схемами стимуляций, приведенными на рис. 1. а – Из лизатов клеток выделена РНК, методами обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени определены уровни экспрессии TNF α , значения нормированы на показатели экспрессии актина; б – культуральную среду от экспериментальных и контрольных образцов собирали для анализа высвобождения TNF α . В качестве контроля использованы уровни экспрессии TNF α в культурах астроцитов, стимулированных ЛПС в условиях модели ЭТ (10/100)

стимуляцию ЛПС при ЭТ было выявлено и на уровне белка (рис. 4). Полученные данные указывают на то, что эндотоксиновая толерантность частично, но не полностью блокирует индукцию экспрессии COX2 в астроцитах.

Агонисты PPAR регулируют экспрессию мРНК COX2 в условиях эндотоксиновой толерантности. Ранее было показано, что индукция COX2 при стимуляции астроцитов ЛПС селективно модулируется агонистами ядерных рецепторов PPAR. При этом активация PPAR γ с помощью росиглитазона индуцирует экспрессию COX2, в то время как агонисты PPAR β и PPAR α снижают экспрессию циклооксигеназы [9–11, 28]. Возник вопрос, возможна ли регуляция экспрессии COX2 под воздействием агонистов PPAR в астроцитах в модели эндотоксиновой толерантности. Для ответа на этот вопрос астроциты обрабатывали эндотоксином, проинкубировали клетки с GW7647 (агонистом PPAR α , 1 мкМ), L-165041 (агонистом PPAR β , 1 мкМ) и росиглитазоном (агонистом PPAR γ , 20 мкМ) и простимулировали их

ЛПС (100 нг/мл, 4 ч). Анализ методом ПЦР в реальном времени позволил выявить рост экспрессии мРНК COX2 в клетках, простимулированных ЛПС в присутствии росиглитазона, и снижение экспрессии COX2 в клетках, простимулированных ЛПС в присутствии GW7647 (агониста PPAR α) и, в меньшей степени, в присутствии L-165041 (агониста PPAR β) в условиях эндотоксиновой толерантности (рис. 5). Полученные данные указывают на то, что в условиях эндотоксиновой толерантности в астроцитах возможна регуляция экспрессии COX2 посредством модуляции активности ядерных рецепторов группы PPAR.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Активация врожденного иммунитета оказывает неселективное цитотоксическое воздействие на собственные ткани организма и крайне опасна для структур ЦНС, обладающих ограни-

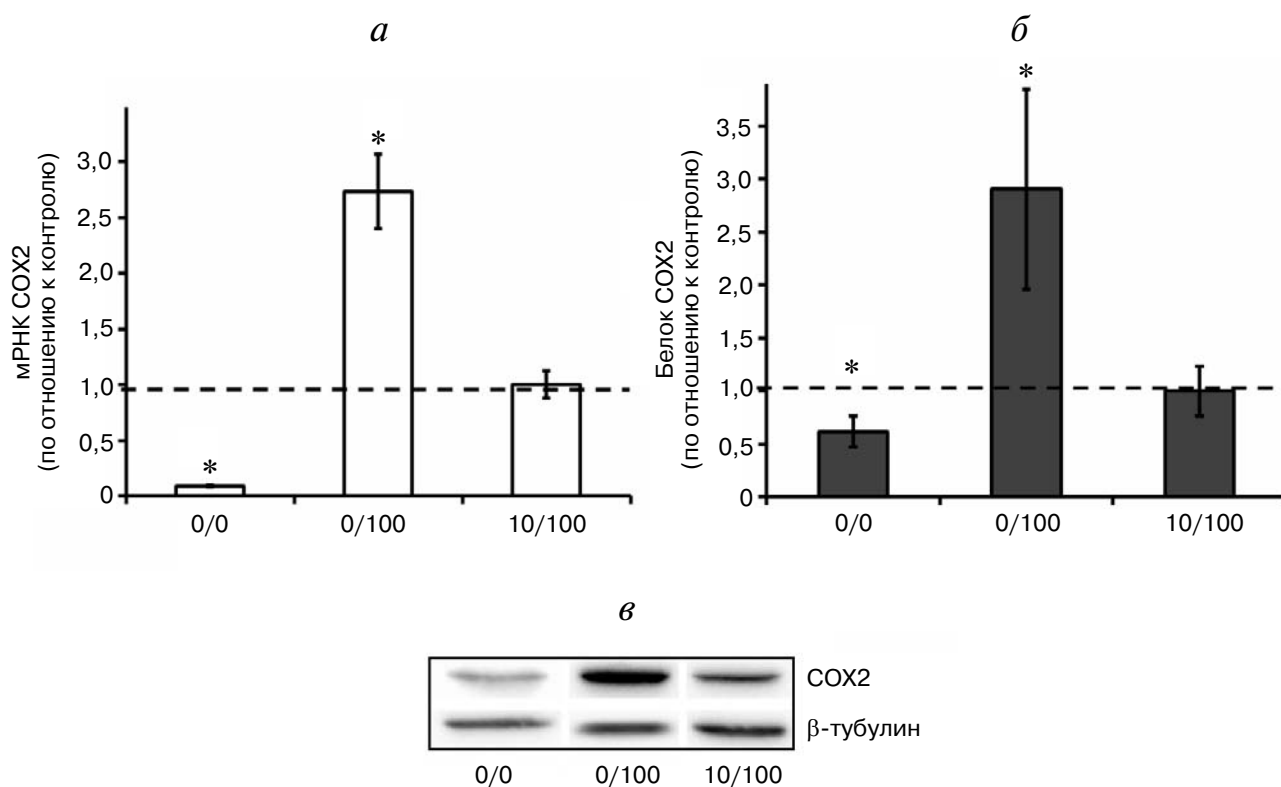


Рис. 4. Изменение экспрессии мРНК (а) и белка (б, в) COX2 в культурах астроцитов при стимуляции клеток ЛПС в условиях моделей острого воспаления и эндотоксиновой толерантности. Культуры астроцитов обработаны в соответствии со схемами стимуляций, приведенными на рис. 1. а – Из лизатов клеток выделена РНК, методами обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени определены уровни экспрессии COX2, значения нормированы на показатели экспрессии актина; б, в – из лизатов клеток выделен белок, уровни экспрессии белка COX2 и β -тубулина определены посредством стандартных методов иммуноблоттинга. В качестве контроля использованы уровни экспрессии COX2 в культурах астроцитов, стимулированных ЛПС в условиях модели ЭТ (10/100)

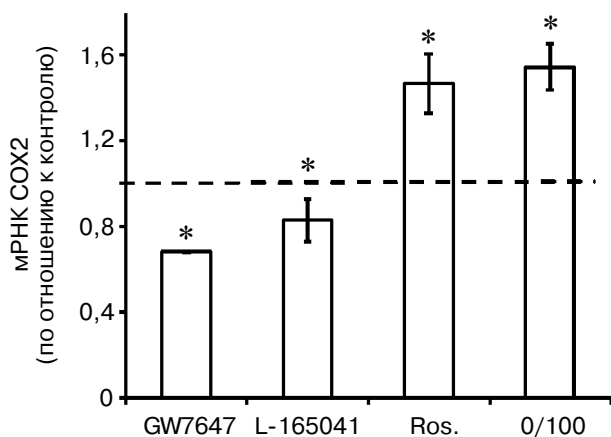


Рис. 5. Влияние GW7647 (агониста PPAR α), L-165041 (агониста PPAR β) и росиглитазона (агониста PPAR γ) на индуцированную ЛПС экспрессию COX2 в культурах астроцитов в условиях модели эндотоксиновой толерантности. Культуры астроцитов были обработаны в соответствии со схемами стимуляций, приведенными на рис. 1. Из лизатов клеток выделена РНК, методами обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени определены уровни экспрессии COX2, значения нормированы на показатели экспрессии актина. В качестве контроля использованы уровни экспрессии COX2 в культурах астроцитов, стимулированных ЛПС в условиях модели ЭТ (10/100)

ченным регенеративным потенциалом [29, 30]. Эндотоксиновую толерантность относят к защитным механизмам, препятствующим избыточной активации иммунитета как в периферических тканях, так и в ЦНС [4, 31–33]. Обработка клеток и тканей эндотоксином в концентрациях от 1 до 1000 нг/мл в течение нескольких часов приводит к подавлению процессов индукции провоспалительных маркеров в ответ на последующий провоспалительный стимул, что, в свою очередь, препятствует повреждению тканей [3, 34]. Хотя о развитии ЭТ в тканях мозга известно достаточно давно, вклад разных клеточных типов в этот феномен изучен ограниченно [4, 5]. Ранее было показано, что в моделях эндотоксиновой толерантности наблюдается снижение индукции экспрессии IL6 в астроглиальных культурах [14, 15]. Однако авторы использовали модель с экспозицией клеток с ЛПС в концентрации 100 нг/мл в течение 24 ч, а далее стимулировали клетки эндотоксином в меньшей концентрации (10 нг/мл) в течение 1 или 24 ч [14, 15]. Снижение экспрессии IL6 в данной клеточной модели могло быть связано с недостаточностью концентрации стимула при второй стимуляции вследствие понижения чувствительности клеток к действию стимула. Обычно используют такие модели ЭТ, в которых дли-

тельная экспозиция с умеренной концентрацией стимула сопровождается более высокой концентрацией при второй стимуляции клеточного ответа [1–3]. Поэтому в рамках нашей модели ЭТ астроглиальных культур мы применили схему, при которой меньшая концентрация ЛПС (10 нг/мл) была использована в качестве адаптационной обработки (48 ч), а большую концентрацию ЛПС (100 нг/мл) применяли для острой стимуляции клеток (4 ч). Анализ экспрессии TNF α , классического маркера толерантности, и COX2 в рамках нашей модели ЭТ (10/100) выявил подавление индукции экспрессии при повторной стимуляции клеток по сравнению с ответом, наблюдаемым при стимуляции контрольных клеток (0/100). Однако, как и в случае IL6 [14, 15], повторная стимуляция повышала уровень экспрессии маркеров по сравнению с нестимулированными наивными клетками (0/0). Данные эффекты были выявлены как на уровне экспрессии мРНК, так и на уровне синтеза готовых белковых продуктов TNF α и COX2. Это указывает на то, что на астроцитах наблюдается явление ЭТ.

Ранее в условиях эндотоксиновой толерантности был продемонстрирован цитотоксический эффект ЛПС при стимуляции клеточной линии макрофагов [35]. Поэтому мы проверили, не являлись ли использованные условия токсичными для клеток. Полученные результаты указывают на отсутствие цитотоксического воздействия кратковременной (0/100) и комбинированной (10/100) обработки астроглиальных культур эндотоксином. Следовательно, наблюдаемые нами феномены отражают общую реорганизацию воспалительного ответа, а не являются следствием повреждения клеток.

В настоящее время общей стратегией управления воспалительными состояниями является подавление иммунного ответа. Однако в долгосрочной перспективе такой подход может иметь негативные последствия. В ряде работ, в т.ч. на мозге, были продемонстрированы отрицательные последствия выключения провоспалительных медиаторов, таких как TNF α , IL6, фактор транскрипции NF- κ B [36–38]. Действительно, вместо ожидаемого улучшения прогноза (за счет снижения индуцированного цитокинами повреждения тканей) выключение провоспалительных генов вело к более тяжелому протеканию процесса, задержке фазы терминации иммунного ответа, худшей регенерации сайтов повреждения и сдвигу общего паттерна воспаления к хронической форме [36–38]. Сходные результаты были получены и в исследованиях длительного ингибирования COX2 в периферических тканях организма [19, 20]. Нарушение протекания вос-

палительного ответа вследствие инактивации COX2 продемонстрировано и в тканях мозга [39, 40]. Паллиативный, а не излечивающий эффект стратегий подавления воспалительного ответа в тканях ЦНС демонстрирует взаимосвязь между процессами развития и терминации иммунного ответа и ставит вопросы о долгосрочных последствиях ЭТ и механизмах для регуляции воспаления в ЦНС в условиях ЭТ.

Фермент COX2 может быть перспективной мишенью в рамках решения указанных задач вследствие 1) ключевой роли фермента в регуляции развития и терминации воспаления [19, 20], 2) вовлеченности COX2 в процессы воспаления в нервной ткани [41–43] и 3) наличия большого количества препаратов, в т.ч. одобренных для применения в клинической практике и способных регулировать уровень активности фермента [26]. Ранее нами и другими исследователями была показана регуляция ЛПС-индуцированной экспрессии COX2 в астроглиальных клетках посредством стимуляции ядерных рецепторов группы PPAR разными агонистами [9–11, 28, 44–46]. Рецепторы PPAR участвуют в регуляции экспрессии многих медиаторов воспаления и являются мишенями для ряда лекарственных противовоспалительных препаратов [23–25, 47]. Известны три изоформы PPAR: PPAR α , PPAR β , PPAR γ , все они вовлечены в контроль воспаления в астроцитах и могут дифференциально регулировать активность COX2 [9, 28, 44, 46, 48]. Так, было показано, что стимуляция клеток агонистами PPAR γ стимулировала COX2. При этом были выявлены регуляторные взаимоотношения между самими ядерными рецепторами и их согласованная регуляция [9, 11, 28]. В настоящей работе мы показали, что в условиях эндотоксиновой толерантности астроциты сохраняют способность индуцировать экспрессию COX2 под воздействием росиглитазона (агониста PPAR γ) и обладают способностью подавлять экспрессию фермента при стимуляции GW7647 (агониста PPAR α), L-165041 (агониста PPAR β). Обобщенная схема регуляции COX2 в астроглиальных культурах в условиях ЭТ под воздействием GW7647, L-165041 и росиглитазона представлена на рис. 6. Добавление к культурам росиглитазона усиливала экспрессию COX2 в условиях модели ЭТ. Сходные эффекты были ранее показаны для астроцитов в условиях острой провоспалительной стимуляции. Следует, однако, отметить, что стимуляция астроглиальных культур агонистами PPAR α и PPAR β в условиях ЭТ приводила к некоторому снижению уровня экспрес-

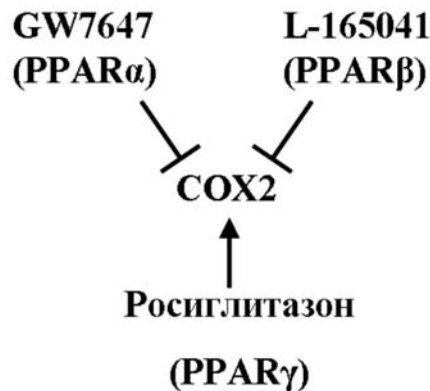


Рис. 6. Схема регуляции экспрессии COX2 агонистами ядерных рецепторов PPAR: GW7647 (PPAR α), L-165041 (PPAR β) и росиглитазоном (PPAR γ). Обозначения: ↑ – стимулирующее влияние, ⊥ – ингибирующее влияние

сии COX2, что не было выявлено в условиях острого воспалительного ответа в астроцитах [9, 11, 28]. Данные изменения в поведении клеток могут указывать на противовоспалительную активность рецепторов PPAR, активируемую в условиях ЭТ, но не в клетках в условиях острой стимуляции, и вовлеченность дополнительных факторов в регуляцию иммунного ответа в астроцитах посредством PPAR β . Это объяснение согласуется с наблюдениями об участии PPAR β в процессах резолюции иммунного ответа в тканях спинного мозга и ранее высказанным предположением о двойной роли PPAR β в воспалении в астроцитах [10, 11, 49]. Участие рецепторов PPAR в роли противовоспалительных факторов в условиях ЭТ требует дальнейших исследований.

В целом полученные результаты впервые демонстрируют возможность дифференциальной регуляции экспрессии COX2 в астроглиальных клетках в условиях эндотоксиновой толерантности агонистами ядерных рецепторов PPAR, что может быть перспективным в рамках изучения феномена ЭТ, а также иметь прикладное значение для разработки терапевтических подходов к применению агонистов PPAR – фибратов и глицазонов.

Авторы выражают благодарность д.б.н. Горбачевой Л.Р. (МГУ им. М.В. Ломоносова) за помощь в получении клеточного материала для проведения исследования.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-00833).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Biswas, S.K., and Lopez-Collazo, E. (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance, *Trends Immunol.*, **30**, 475–487.
2. West, M.A., and Heagy, W. (2002) Endotoxin tolerance: a review, *Crit. Care Med.*, **30**, 64–73.
3. Nahid, M.A., Satoh, M., and Chan, E.K. (2011) MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance, *Cell Mol. Immunol.*, **8**, 388–403.
4. Rosenzweig, H.L., Lessov, N.S., Henshall, D.C., Minami, M., Simon, R.P., and Stenzel-Poore, M.P. (2004) Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice, *Stroke*, **35**, 2576–2581.
5. Vartanian, K.B., Stevens, S.L., Marsh, B.J., Williams-Karnesky, R., Lessov, N.S., and Stenzel-Poore, M.P. (2011) LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury, *J. Neuroinflammation*, **8**, 160.
6. Cavaillon, J.M., and Adib-Conquy, M. (2006) Bench-to bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis, *Crit. Care*, **10**, 233.
7. Farina, C., Aloisi, F., and Meinl, E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity, *Trends Immunol.*, **28**, 138–145.
8. Gorina, R., Font-Nieves, M., Marquez-Kisinousky, L., Santalucia, T., and Planas, A.M. (2011) Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NF kappa B signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways, *Glia*, **59**, 242–255.
9. Aleshin, S., Grabeklis, S., Hanck, T., Sergeeva, M., and Reiser, G. (2009) Activated receptor (PPAR)-gamma positively controls and PPAR alpha negatively controls cyclooxygenase-2 expression in rat brain astrocytes through a convergence on PPAR beta/delta via mutual control of PPAR expression levels, *Mol. Pharmacol.*, **76**, 414–424.
10. Chistyakov, D.V., Aleshin, S.E., Astakhova, A.A., Sergeeva, M.G., and Reiser, G. (2015) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) α and γ of rat brain astrocytes in the course of activation by toll-like receptor agonists, *J. Neurochem.*, DOI: 10.1111/jnc.13101.
11. Chistyakov, D.V., Aleshin, S., Sergeeva, M.G., and Reiser, G. (2014) 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.*, **130**, 563–574.
12. Donovan, F.M., Pike, C.J., Cotman, C.W., and Cunningham, D.D. (1997) Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities, *J. Neurosci.*, **17**, 5316–5326.
13. Chen, Y.M., and Swanson, R.A. (2003) Astrocytes and brain injury, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **23**, 137–149.
14. Beurel, E., and Jope, R.S. (2010) Glycogen synthase kinase-3 regulates inflammatory tolerance in astrocytes, *Neuroscience*, **169**, 1063–1070.
15. Beurel, E. (2011) HDAC6 Regulates LPS-tolerance in astrocytes, *PLoS One*, **6**, e25804.
16. Kaufmann, W.E., Andreasson, K.I., Isakson, P.C., and Worley, P.F. (1997) Cyclooxygenases and the central nervous system, *Prostaglandins*, **54**, 601–624.
17. Варфаломеева А.Т., Сергеева М.Г. (2006) Каскад арахидоновой кислоты, Народное образование, Москва.
18. Ricciotti, E., and FitzGerald, G.A. (2011) Prostaglandins and inflammation, *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.*, **31**, 986–1000.
19. Chan, M.M., and Moore, A.R. (2010) Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E-2-mediated lipoxin A(4) production, *J. Immunol.*, **184**, 6418–6426.
20. Rajakariar, R., Yaqoob, M.M., and Gilroy, D.W. (2006) COX-2 in inflammation and resolution, *Mol. Interv.*, **6**, 199–207.
21. Learn, C.A., Mizel, S.B., and McCall, C.E. (2000) mRNA and protein stability regulate the differential expression of pro- and anti-inflammatory genes in endotoxin-tolerant THP-1 cells, *J. Biol. Chem.*, **275**, 12185–12193.
22. Spitzer, J.A., Zheng, M.Q., Kolls, J.K., Stouwe, C.V., and Spitzer, J.J. (2002) Ethanol and LPS modulate NF-kappaB activation, inducible NO synthase and COX-2 gene expression in rat liver cells *in vivo*, *Front. Biosci.*, **7**, 99–108.
23. Bensinger, S.J., and Tontonoz, P. (2008) Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors, *Nature*, **454**, 470–477.
24. Heneka, M.T., and Landreth, G.E. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease, PPARs in the brain, *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 1031–1045.
25. Michalik, L., and Wahli, W. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 991–998.
26. Rainsford, K.D. (2007) Anti-inflammatory drugs in the 21st century, *Subcell. Biochem.*, **42**, 3–27.
27. Sergeeva, M.G., Aleshin, S.E., Grabeklis, S., and Reiser, G. (2010) 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.*, **115**, 399–410.
28. Aleshin, S., Strokina, M., Sergeeva, M., and Reiser, G. (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)beta/delta, a possible nexus of PPAR alpha- and PPAR gamma-dependent molecular pathways in neurodegenerative diseases: Review and novel hypotheses, *Neurochem. Int.*, **63**, 322–330.
29. Fitch, M.T., and Silver, J. (2008) CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure, *Exp. Neurol.*, **209**, 294–301.
30. Siniscalchi, A., Gallelli, L., Malferrari, G., Pirritano, D., Serra, R., Santangelo, E., and De, S.G. (2014) Cerebral stroke injury: the role of cytokines and brain inflammation, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, **25**, 131–137.
31. Dirnagl, U., Becker, K., and Meisel, A. (2009) Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use, *Lancet Neurol.*, **8**, 398–412.
32. Hafenrichter, D.G., Roland, C.R., Mangino, M.J., and Flye, M.W. (1994) The Kupffer cell in endotoxin tolerance: mechanisms of protection against lethal endotoxemia, *Shock*, **2**, 251–256.
33. Pena, O.M., Pistolic, J., Raj, D., Fjell, C.D., and Hancock, R.E. (2011) Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells, *J. Immunol.*, **186**, 7243–7254.
34. Lopez-Collazo, E., and del Fresno, C. (2013) Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences, *Crit. Care*, **17**, 242.
35. Karahashi, H., and Amano, F. (2003) Endotoxin-tolerance to the cytotoxicity toward a macrophage-like cell line, J774.1, induced by lipopolysaccharide and cycloheximide: role of p38 MAPK in induction of the cytotoxicity, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1249–1259.

36. Erta, M., Quintana, A., and Hidalgo, J. (2012) Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system, *Int. J. Biol. Sci.*, **8**, 1254–1266.
37. Lawrence, T., Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., and Willoughby, D.A. (2001) Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation, *Nature Med.*, **7**, 1291–1297.
38. Nadeau, S., Filali, M., Zhang, J., Kerr, B.J., Rivest, S., Soulet, D., Iwakura, Y., de Rivero Vaccari, J.P., Keane, R.W., and Lacroix, S. (2011) Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1beta and TNF: implications for neuropathic pain, *J. Neurosci.*, **31**, 12533–12542.
39. Aid, S., Langenbach, R., and Bosetti, F. (2008) Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase-2, *J. Neuroinflammation*, **5**, 17.
40. Blais, V., Turrin, N.P., and Rivest, S. (2005) Cyclooxygenase 2 (COX-2) inhibition increases the inflammatory response in the brain during systemic immune stimuli, *J. Neurochem.*, **95**, 1563–1574.
41. Gupta, A., Kumar, A., and Kulkarni, S.K. (2011) Targeting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammatory signaling by selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors mitigates MPTP-induced neurotoxicity in mice, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.*, **35**, 974–981.
42. Phillis, J.W., Horrocks, L.A., and Faroqui, A.A. (2006) Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders, *Brain Res. Rev.*, **52**, 201–243.
43. Trepanier, C.H., and Milgram, N.W. (2010) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: are NSAIDs and selective COX-2 inhibitors the next line of therapy? *J. Alzheimers Dis.*, **21**, 1089–1099.
44. Luna-Medina, R., Cortes-Canteli, M., Alonso, M., Santos, A., Martinez, A., and Perez-Castillo, A. (2005) Regulation of inflammatory response in neural cells *in vitro* by thiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation, *J. Biol. Chem.*, **280**, 21453–21462.
45. Pahan, K., Jana, M., Liu, X., Taylor, B.S., Wood, C., and Fischer, S.M. (2002) Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, inhibits the induction of nitric-oxide synthase in human astrocytes, *J. Biol. Chem.*, **277**, 45984–45991.
46. Xu, J., Chavis, J.A., Racke, M.K., and Drew, P.D. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of astrocytes, *J. Neuroimmunol.*, **176**, 95–105.
47. Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J.P., Chatterjee, V.K., Glass, C.K., Gonzalez, F.J., Grimaldi, P.A., Kadowaki, T., Lazar, M.A., O'Rahilly, S., Palmer, C.N., Plutzky, J., Reddy, J.K., Spiegelman, B.M., Staels, B., and Wahli, W. (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors, *Pharmacol. Rev.*, **58**, 726–741.
48. Cristiano, L., Cimini, A., Moreno, S., Ragnelli, A.M., and Paola, C.M. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and related transcription factors in differentiating astrocyte cultures, *Neuroscience*, **131**, 577–587.
49. Paterniti, I., Impellizzeri, D., Crupi, R., Morabito, R., Campolo, M., Esposito, E., and Cuzzocrea, S. (2013) Molecular evidence for the involvement of PPAR-delta and PPAR-gamma in anti-inflammatory and neuroprotective activities of palmitoylethanolamide after spinal cord trauma, *J. Neuroinflammation*, **10**, 20.

REGULATION OF CYCLOOXYGENASE 2 EXPRESSION BY AGONISTS OF PPAR NUCLEAR RECEPTORS IN THE MODEL OF ENDOTOXIN TOLERANCE IN ASTROCYTES

A. A. Astakhova*, D. V. Chistyakov, E. V. Pankevich, M. G. Sergeeva

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-0338, E-mail: alina_astakhova@yahoo.com

² M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-4195

Received April 8, 2015

Revision received May 20, 2015

Endotoxin tolerance (ET) is a state of an altered immune response induced by multiple stimulations of a cell, tissue, or organism with lipopolysaccharide (LPS). The characteristics of ET include downregulation of induction of proinflammatory genes (TNF α , IL, and others) and enhancement of induction of antiinflammatory genes (IL10, TGF β). ET generally has protective functions; nevertheless, it can result in a state of innate immune deficiency and bring negative outcomes. A current issue is the search for mechanisms to control the level of inflammation in the course of endotoxin tolerance. In this work, we investigated changes in cyclooxygenase 2 (COX2) expression in a model of endotoxin tolerance in astrocytes and analyzed the possibility of regulating this process by applying nuclear receptor PPAR agonists. Our results indicate that: 1) endotoxin tolerance can be induced in astrocytes and results in TNF α and COX2 mRNA induction decrease upon secondary stimulation; 2) tolerance is revealed on the level of TNF α release and COX2 protein expression; 3) PPAR agonists GW7647, L-165041, and rosiglitazone control COX2 mRNA expression levels under conditions of endotoxin tolerance. In particular, rosiglitazone (a PPAR γ agonist) induces COX2 mRNA expression, while GW7647 (PPAR α agonist) and L-165041 (PPAR β agonist) suppress the expression. Our results demonstrate that COX2 retains its regulatory mechanisms during endotoxin tolerance in astrocytes, and PPAR agonists might be effective in controlling this target under conditions of multiple proinflammatory stimulations of brain tissues with endotoxin.

Key words: cyclooxygenase 2, nuclear receptors, PPAR agonists, rosiglitazone, endotoxin tolerance, innate immunity, astrocytes