Исследовательская работа

***Влияние эндотоксиновой толерантности на экспрессию факторов транскрипции PPARß в астроцитах***

**Автор:** Расчетнова Наталья Игоревна,

ученица 10 класса СУНЦ МГУ

**Руководитель:** Астахова Алина Анатольевна,

м.н.с. НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова,

**Место выполнения работы:** ФББ МГУ

МОСКВА

СУНЦ МГУ

2014-2015

Оглавление

[Общая характеристика работы 2](#_Toc419903563)

[1.Литературный обзор 3](#_Toc419903564)

[2.Цели и задачи исследования 4](#_Toc419903565)

[3.Методы исследования 4](#_Toc419903566)

[Результаты работы 5](#_Toc419903567)

[Выводы 6](#_Toc419903568)

[Список литературы 6](#_Toc419903569)

# Общая характеристика работы

В развитии воспалительных процессов в мозге ключевая роль принадлежит клеткам глии. Среди глиальных клеток следует выделить астроциты, которые являются основным элементом, поддерживающим гомеостаз в нервной ткани. Кроме того, астроциты наделены свойствами иммунокомпетентности; они являются источником провоспалительных веществ. Рецепторы PPAR являются транскрипционными факторами - белками, регулирующими экспрессию генов, участвующих в воспалительных и других процессах, протекающих в организме. Все эти эффекты реализуются посредством регулирования PPAR транскрипции множества генов. Благодаря большой роли PPAR в этих процессах, они исследуются как мишени для ряда лекарственных препаратов, способных регулировать уровень липидов и углеводов, подавлять воспаления в клетке. В настоящее время лиганды PPAR используются для лечения гиперлипидемии, диабета 2 типа, их предлагают как противовоспалительные средства. Наиболее интересен PPARβ, однако, он изучен меньше всего. PPARβ является мишенью для разных лекрственных средств (росиглитазон, L-165041), поэтому его изучение важно для понимания механизмов фармакологических эффектов лекарственных препаратов и борьбы с их побочными эффектами. [Chistyakov et al., 2014].

Показана эффективность PPARβ в регуляции важных провоспалительных функций в астроцитах: он стоит на пересечении факторов транскрипции PPARα и PPARγ и регулирует их эффект на экспрессию провоспалительного агента COX2. (Рис.1) А COX2 – это главная фармакологическая мишень для противовоспалительных средств. Однако совершенно неясно, как ведет себя PPARβ в условиях изменения воспалительного ответа - в модели эндотоксиновой толерантности.

Эндотоксиновая толерантность представляет собой состояние, при котором иммунная система, обнаружив чужеродный антиген, не запускает воспалительные процессы. Если при обычном состоянии клетка сразу же активируется и отвечает на воспалительную реакцию, то в модели эндотоксиновой толерантности клетка не способна вырабатывать вещества для осуществления иммунного ответа. Воспалительные сигналы, запуск которых регулируют воспалительные молекулы (факторы транскрипции PPAR) в наивных клетках при многократной стимуляции эндотоксином, могут быть подавлены, что особенно важно в механизмах защиты головного мозга. Хотя первоначальные воспалительные реакции, запускаемые в астроцитах, являются необходимыми для ответа на травмы, инфекции, но они могут вызывать угнетение нейронных функций, и как следствие – возникновение многих нейродегенеративных заболеваний. Показано влияние PPARβ при эндотоксиновой толерантности на экспрессию важного провоспалительного фактора COX2. [Данные находятся на этапе публикации.] Как изменяется экспрессия самих факторов транскрипции PPAR при воспалении в состоянии клеток эндотоксиновой толерантности, ранее изучено не было.

# 1.Литературный обзор

Для распознавания патогена на мембране клеток есть сигнальные рецепторы воспаления Toll – like receptors (TLR). Они распознают патогены и подают сигналы в ядро для экспрессии генов, участвующих в осуществлении иммунного ответа. Одним из сигнальных рецепторов является TLR4 – рецептор липополисахарида (ЛПС). При попадании воспалительного агента ЛПС в организм происходит активация ряда белков, которые участвуют в индукции провоспалительных медиаторов - веществ, передающих возбудительный сигнал другим клеткам.

Регуляторами воспаления являются PPAR. Рецепторы PPAR являются семейством ядерных рецепторов, регулирующих транскрипцию генов. В настоящее время существует три типа PPARs: альфа, бета и гамма. Каждый тип кодируется в разных генах, имеет различное действие и распределение в тканях. Вследствие активации рецепторов PPAR начинается экспрессия провоспалительного агента – Cyclooxygenase2 (COX2). На этом основано действие многих медикаментов: они угнетают активацию COX2 в результате чего подавляется воспаление, снижается боль. Примером таких ингибиторов являются аспирин и ибупрофен.

Избыточная активация иммунитета опасна для организма, поэтому существуют механизмы, препятствующие избыточному синтезу воспалительных факторов. Одним из таких механизмов является эндотоксиновая толерантность, при которой клетки или ткани не начинают продуцировать прововоспалительные цитокины в ответ на многократное воздействие провоспалительных стимулов. Эндотоксиновая толерантность может быть достигнута предварительной обработкой животного низкой дозой эндотоксина перед стимуляцией большой дозой. Исследователями были проведены экспериментальные опыты на мышах, целью которого было установить влияние эндотоксиновой толерантности на здоровье мышей при инсульте. Одну группу мышей стимулировали небольшой дозой воспалительного агента ЛПС, а затем вызывали инсульт; и сравнили с контролем - группой мышек, у которых вызвали просто инсульт. Выяснилось, что мыши, предварительно стимулированные ЛПС, лучше выживают, менее тяжко переносят, быстрее восстанавливаются (Рис.2).

 Т.е. клетки получили воспалительный стимул, а далее на него реагировали слабо – это действие эндотоксиновой толерантности. При эндотоксиновой толерантности часть генов, которые в норме активируются в ответ на воспалительный сигнал, оказываются неспособны индуцироваться в толерантных к эндотоксину клетка, а часть генов активируется в большей степени, чем в наивных клетках.

Установить как меняется уровень экспрессии ядерных рецепторов PPARβ, основного регулятора воспаления в астроцитах, в модели эндотоксиновой толерантности и будет целью нашего исследования.

# 2.Цели и задачи исследования

Целью данной работы является исследовать как изменяется экспрессия ядерных рецепторов PPARβ в астроцитах, стимулированных липополисахаридом (ЛПС) в модели клеток эндотоксиновой толерантности.

Задачи: 1. Проанализировать изменение экспрессии PPARβ в клетках, подвергнутых длительной стимуляцией ЛПС 10 нг/мл с уровнем, выявляемом при стимуляции клеток ЛПС 100 нг/мл в течение 4 часов.

2. Проанализировать изменение экспрессии PPARβ в клетках, подвергнутых длительной стимуляцией ЛПС 10 нг/мл и последующей стимуляцией ЛПС 100 нг/мл с уровнем, выявляемом при стимуляции клеток ЛПС 100 нг/мл в течение 4 часов.

# 3.Методы исследования

В лабораторных условиях для проведения исследований мы выделили клетки – предшественники астроцитов из мозга новорожденной крысы. Из этих клеток через две недели получили зрелые астроциты. Стимуляцию эндотоксином первых лунок не проводили - в них у нас наивные клетки – контроль. Провели стимуляцию вторых, третьих и четвертых лунок провоспалительным эндотоксином ЛПС (липополисахаридом). Стимуляцию ЛПС (10 нг/мл) вторых лунок провели на 4 часа. Провели стимуляцию ЛПС (10 нг/мл) на 48 часов третьих и четвертых лунок. Через 48 часов мы получили модель клеток эндотоксиновой толерантности. Третьи лунки стимулировали второй дозой ЛПС (100 нг/мл на 4 часа). Получили модель клеток ЭТ + ЛПС. (Рис.3.)

Из полученных образцов астроцитов выделили на колонках РНК и провели обратную транскрипцию РНК. Уровни экспрессии PPAR определили методом ПЦР в реальном времени. (В качестве контроля использовали уровни PPARβ, полученные в наивных астроцитах (из первых лунок), а также в клетках, стимулированных ЛПС (100 нг/мл) в течение 4 часов (без предварительной обработки PPARβ, полученные в наивных астроцитах (из первых лунок), а также в клетках, стимулированных ЛПС (100 нг/мл) в течение 4 часов (без предварительной обработки ЛПС 10 нг/мл в течение 48 часов) - астроциты вторых лунок. )

Последовательности ПЦР-праймеров для COX2: sense, 5’-TGTACAAGCAGTGGCAAAGG-3’; antisense, 5’-TAGCATCTGGACGAGGCTTT-3’; для PPARβ: sense, 5’-CTCCTGCTCACTGACAGATG-3’; antisense, 5’-TCTCCTCCTGTGGCTGTTC-3’; для актина: sense, 5’-CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG-3’; antisense, 5’-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3’

# Результаты работы

К началу нашей работы было известно, что уровень экспрессии PPARβ может меняться под воздействием провоспалительных стимулов. Но ничего не было известно об изменении уровня экспрессии PPARβ под действием провоспалительных стимулов в модели клеток эндотоксиновой толерантности.

Влияние эндотоксиновой толерантности на экспрессию факторов транскрипции PPARβ. При исследовании изменения экспрессии PPARβ установили, что уровень экспрессии PPARβ в астроцитах, стимулированных на 4 часа (ЛПС) в 4,5 раза больше, чем в наивных клетках. Астроцитам дали воспалительный стимул ЛПС – начался запуск иммунного ответа - синтез провоспалительных медиаторов и уровень экспрессии факторов транскрипции PPARβ повысился. Уровень экспрессии PPARβ в клетках, стимулированных ЛПС на 48 часов, (ЭТ) приблизительно равен контролю. Это объясняется тем, что в клетках прошла воспалительная реакция (на уровне экспрессии факторов транскрипции PPARβ), и экспрессия PPARβ уменьшилась – клетки в состоянии эндотоксиновой толерантности. Уровень экспрессии PPARβ в астроцитах, стимулированных ЛПС дважды - на 48 часов, затем на 4 часа (ЭТ+ЛПС) больше, чем в модели клеток эндотоксиновой толерантности (стимулированных на 48 часов) (ЭТ), но меньше, чем в модели клеток, стимулированных ЛПС на 4 часа (ЛПС). Т.е. при повторной стимуляции воспалительным агентом экспрессия ядерных рецепторов PPAR возрастает меньше, чем в наивных клетках, стимулированных этим же воспалительным стимулом. (Рис.4.)

# Выводы

Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень экспрессии факторов транскрипции PPARβ в состоянии клеток эндотоксиновой толерантности существенно ниже, чем в наивных клетках, стимулированных эндотоксином; индукция экспрессии PPARβ частично подавляется в условиях модели эндотоксиновой толерантности в астроцитах крыс. Данные результаты согласуются с результатами исследований изменения индукции экспрессии других провоспалительных медиаторов (например, IL6) и подтверждают гипотезу об общей провоспалительной активности рецептора PPARβ . Кроме того, данные результаты указывают на возможность регуляции воспаления с помощью агонистов PPARβ в астроцитах в условиях эндотоксиновой толерантности. Данное предположение требует дальнейших исследований.

# Список литературы

1. Aleshin S., Grabeklis S., Hanck T., Sergeeva M. and Reiser G. (2009) Peroxisome Proliferator-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. 76, 414-424.
2. Aleshin S., Strokin 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. 63, 322-330.
3. Biswas S. K. and Lopez-Collazo E. (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. 30, 475-487.
4. Cavaillon J. M. and Adib-Conquy M. (2006) Bench-to-bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. 10.
5. Chen Y. M. and Swanson R. A. (2003) Astrocytes and brain injury. 23, 137-149.
6. 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. 130, 563-574.
7. Farina C., Aloisi F. and Meinl E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. 28, 138-145.
8. Font-Nieves M., Gloria Sans-Fons M., Gorina R., Bonfill-Teixidor E., Salas-Perdomo A., Marquez-Kisinousky L., Santalucia T. and Planas A. M. (2012) Induction of COX-2 Enzyme and Down-regulation of COX-1 Expression by Lipopolysaccharide (LPS) Control Prostaglandin E-2 Production in Astrocytes. 287, 6454-6468.
9. Chistyakov D., Aleshin S., Astakhova A., Sergeeva M. 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. 2015 Mar 25.
10. Akira S., Takeda K. (2004) Toll – like receptor signaling. Nature Reviews Immunology 4 July, 499-511