

НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ  
СУНЦ МГУ

# Регуляция ростиглитазоном воспалительных процессов в глиальных клетках мозга

Курсовая работа

Автор работы: Сорокин Егор Дмитриевич

Научный руководитель: Панкевич Евгения

Вадимовна, студент ФББ МГУ

Москва 2016 год

## Оглавление

Список сокращений .....	2
Литературный обзор .....	2
Воспаление .....	3
Астроциты.....	4
Росиглитазон .....	5
Цель исследования.....	6
Экспериментальная часть.....	6
Материалы и методы .....	6
Перечень веществ.....	6
Выделение и культивирование клеток.....	6
Клеточный эксперимент.....	7
Выделение РНК из культуры клеток.....	7
Обратная транскрипция.....	7
ОТ-ПЦР в реальном времени.....	8
Праймеры, использовавшиеся в работе .....	8
Вестерн Блоттинг .....	9
Статистика .....	10
Результаты исследования.....	10
Результаты и обсуждение.....	10
Влияние росиглитазона на экспрессию генов COX-2, IL-10 и TNF $\alpha$ . .....	10
Влияние ингибирования p38 МАПК на противовоспалительные эффекты росиглитазона	12
Заключение и Выводы .....	14
Литература .....	14

## Список сокращений

- PPAR $\gamma$  – рецептор, активируемый пролифератором пероксисом
- LPS –липополисахарид

- ЦНС – центральная нервная система
- COX-2 –циклооксигеназа 2
- TNF $\alpha$ –фактор некроза опухоли альфа
- IL-10 – интерлейкин 10
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- RG – росиглитазон

## Литературный обзор

Росиглитазон – лекарство группы тиазолидиндионов, широко используемое при лечении диабета второго типа. Увеличивая чувствительность тканей к инсулину, он позволяет контролировать уровень глюкозы в крови. Известно, что росиглитазон, как и другие тиазолидиндионы, действуют в организме путем активации особой разновидности ядерных рецепторов – PPAR $\gamma$ . Росиглитазон был зарегистрирован как лекарственное средство в США в 1999 году. Его мировые продажи к 2006 году составили 2,2 млрд долларов.

В последнее время предлагается использовать росиглитазон для лечения различных нейродегенеративных заболеваний с воспалительной компонентой, такие, например, как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. Предполагается, что положительный эффект росиглитазона в экспериментальных моделях данных заболеваний на животных связан с его противовоспалительным действием [1]. Для потенциального применения росиглитазона при терапии этих заболеваний, прежде всего необходимо изучить молекулярный механизм его действия.

Нейродегенеративные заболевания характеризуются нарушениями в работе нейронов, при этом важнейшую роль в этих процессах играет воспаление на клеточном уровне [2]. В настоящее время фокус исследования взаимосвязи воспаления и нейродегенеративных заболеваний направлен на исследование клеточных процессов в астроцитах, которые играют важную роль в метаболизме нервных клеток и образовании защитного гематоэнцефалического барьера, а также участвуют непосредственно в проведении нервного импульса.

Таким образом, понимание молекулярного механизма действия росиглитазона на астроцитах в ходе развития воспалительного ответа позволит разработать новые подходы в терапии системных заболеваний мозга.

## Воспаление

Воспалительный процесс сам по себе является эволюционно выработанной защитной реакцией организма. Медицинское определение воспаления на уровне организма вывел древнеримский ученый Авл Корнелий Цельс в 1 веке нашей эры. Он охарактеризовал воспалительный процесс четырьмя классическими признаками: *tumor* (покраснение), *tumor* (опухоль), *calor* (жар), *dolor* (боль). В последствии Клавдий Гален дополнил его еще одним признаком – потерей функции органом. Эти пять признаков не изменялись более полутора тысяч лет. При этом в настоящее время выделяют воспаление на уровне организма, воспаление на уровне органов, воспаление на уровне ткани и воспаление на клеточном уровне. Воспаление на клеточном и молекулярном уровне характеризуются выделением клеткой белков и сигнальных молекул, а также изменением внутриклеточных процессов, направленных на борьбу с инфекцией. На молекулярном уровне выделяют стадию инициации, развития и завершения воспалительного ответа.

На стадии инициации стимул связывается с рецептором и запускает внутриклеточные сигнальные процессы, которые приводят к высвобождению провоспалительных молекул различного типа. Эти молекулы – цитокины, хемокины, другие белки, простагландины [3]. Задача этой стадии – усилить ответ, мобилизовать защитные ресурсы организма. Одновременно или через некоторое время клетка начинает производить противовоспалительные белки и сигнальные молекулы, уменьшающие интенсивность ответа и ограничивают продолжительность стадии инициации [4]. На стадии развития воспалительного ответа эти два процесса идут параллельно и находятся в равновесии.

Восстановление системы до исходного состояния происходит на стадии разрешения ответа. Избыточная реакция организма или клетки на стадии инициации приводит к гибели организма (например, сепсис), нарушения стадии восстановления приводит к возникновению хронических воспалительных процессов, которые и составляют «воспалительную компоненту» многих системных заболеваний [4].

Особый интерес представляет воспаление в центральной нервной системе (ЦНС). В исследованиях последних десятилетий показано, что воспалительные процессы характерны для различных заболеваний ЦНС, таких как рассеянный склероз, вирус-ассоциированная деменция иммунодефицита человека, вторичные травмы, болезни Альцгеймера и Паркинсона. Исследования показывают, что ингибирование воспалительных процессов является одним из наиболее важных механизмов в предотвращении повреждения ЦНС в ходе развития нейродегенеративных процессов [5].

Таким образом, понимание на молекулярном уровне регуляции системы воспалительного ответа и ее взаимосвязи с различными нарушениями в организме является актуальной задачей современных исследований.

Стимуляция клеток гликолипополисахаридом (LPS) служит общепризнанной моделью для имитации нейровоспалительных условий *in vitro* [6]. LPS – основной компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Клетки животных с помощью толл-подобных рецепторов распознают LPS как антиген и инициируют воспалительный ответ.

При исследовании воспалительных процессов на клеточном уровне, наиболее часто в качестве маркеров воспаления используются изменения экспрессии генов и белков COX-2, TNF $\alpha$  и IL-10. COX-2 – фермент, участвующий в синтезе простагландинов, резольвинов, тромбоксанов. COX-2, в отличие от COX-1 является индуцибельной, то есть начинает функционировать при определённых ситуациях, например, при воспалении. COX-2 индуцируется в ответ на воспалительные стимуляции в тканях мозга и играет двойную роль в регуляции иммунного ответа. На начальных этапах COX-2 обуславливает развитие провоспалительных реакций, однако на более поздних этапах воспалительного ответа COX-2 меняет свою роль и участвует в производстве противовоспалительных медиаторов. Инактивация фермента при этом может приводить к нарушениям процессов разрешения воспаления. TNF $\alpha$  – сигнальный гликопротеин, имеющий сильное провоспалительное действие. TNF $\alpha$  относится к цитокинам и активно выделяется клетками глии под влиянием воспалительных процессов [7]. IL-10 – цитокин с выраженным противовоспалительным действием [8].

Клеточный сигнальный каскад состоит из множества элементов. В настоящее время активно изучается роль МАПК – митоген активируемых протеинкиназ, т.к. для этих белков разработаны низкомолекулярные ингибиторы. Особый интерес представляет p38 МАПК, которая вовлечена в передачу стрессовых сигналов, активирующихся цитокинами, тепловым шоком, осмотическим шоком, ультрафиолетом. Показана ее важная роль и в воспалительных процессах [9]. Ингибиторы данной МАПК предлагаются как противовоспалительные и противоопухолевые вещества широкого спектра действия [10].

### Астроциты

Нервная ткань состоит из нейронов, передающих нервные импульсы, и нейроглии, обеспечивающей передачу сигнала и жизнедеятельность нейронов. Астроциты - глиальные клетки ЦНС, которые играют важную роль в поддержании жизнеобеспечения нейронов, участвуя в формировании гематоэнцефалического барьера и являясь основным звеном на пути продвижения веществ от кровеносных сосудов к нейронам. В последнее время их стали считать равноправными участниками нервной системы, вплоть до регуляции проведения

сигналов в синоптических контактах. Также астроциты участвуют в синтезе некоторых физиологически активных веществ, необходимых для развития иммунного и воспалительного ответов в ткани головного мозга и играют важную роль на ранних стадиях любых травм ЦНС и развитии патологических состояний [11]. Действительно, любые повреждения головного мозга ведут к развитию так называемого реактивного астроглиоза, процесса, при котором наблюдается резкое усиление метаболической и пролиферативной активности астроцитов. Реактивный астроглиоз оказывает защитное влияние на ткань головного мозга (формирование защитных глиальных структур, обособление повреждённого участка мозга, усиление синтеза биологически активных веществ, способствующих поддержке и восстановлению нейронов, генерация адаптивного воспалительного ответа) [12].

Однако предполагается, что избыточное развитие этого процесса приводит к нарушению регенерации нервной ткани, формированию глиальных рубцов, а также к переходу воспаления в хроническую стадию. Поэтому контроль астроглиоза очень важен и является необходимым для уменьшения таких отрицательных последствий, как гибель нейронов в зоне ишемического поражения, усиление нейродегенеративных изменений в ткани мозга, а также формирование астроглиом, опухолей мозга, которые в настоящее время практически не лечатся медикаментозными методами. Развитие воспалительного ответа – одна из основных составляющих реактивного астроглиоза. Изучение этого процесса на клеточном уровне и исследование возможности его регуляции является важным направлением современных нейробиологических исследований.

Помимо их роли при воспалительных реакциях, астроциты также важны в регуляции энергетического и метаболического гомеостаза в мозгу. Эти клетки очень чувствительны к метаболическим изменениям в окружающей среде. Развитие воспалительного процесса в астроцитах тесно связано с такими сигнальными молекулами как TNF $\alpha$  и интерлейкинами (в том числе IL-10) [13]. Для астроцитов характерно, что в их активации и реализации воспалительного ответа важную роль играет арахидоновая кислота и ее оксипроизводные – простагландины. В их синтезе активное участие принимает фермент COX-2 [1].

### Росиглитазон

Росиглитазон - лекарство группы тиазолидиндионов, широко используемое при лечении диабета второго типа. Росиглитазон снижает содержание глюкозы в крови, повышая чувствительность к инсулину жировой ткани, скелетных мышц и ткани печени, улучшает течение метаболических процессов, снижает уровень глюкозы, инсулина и свободных жирных кислот в крови. Также он способствует сохранению функции  $\beta$ -клеток, о чем свидетельствует увеличение массы островков Лангерганса в поджелудочной железе и

содержания инсулина и предупреждает развитие выраженной гипергликемии. Установлено также, что росиглитазон значительно замедляет развитие почечной дисфункции и систолической артериальной гипертензии. Росиглитазон не стимулирует секрецию инсулина поджелудочной железой и не вызывает гипогликемию. Росиглитазон – агонист ядерного рецептора PPAR $\gamma$ , регулирующего экспрессию большого количества генов [14].

В 2007 году FDA (управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) занесло росиглитазон в список опасных и подлежащих к запрещению медикаментов в связи с повышенной смертностью пациентов, принимающих его, из-за нарушений в работе сердца. Попутно FDA ввело ограничения по его распространению и продаже. В 2013 году FDA сняло их и вынесло росиглитазон из списка опасных, однако до сих пор идут судебные разбирательства за запрещение лекарства и возмещение убытков родственникам умерших пациентов [2].

Рецепторы активаторов пролиферации пероксисом (PPAR, peroxisome proliferator-activated receptors) – семейство ядерных рецепторов, состоящее из трех подтипов: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  и PPAR $\gamma$ . Ядерные рецепторы PPAR активируются молекулами метаболитических путей, такими как липиды и жирные кислоты. PPAR играют важную регуляторную роль в различных клеточных процессах, относящихся к метаболизму, воспалению, дифференциации. PPAR $\gamma$  играет важную роль в противовоспалительных и противоопухолевых сигнальных путях. PPAR $\gamma$  оказывает значительное противовоспалительное действие в экспериментах *in vitro* [14]. Стимулированные LPS клетки выбрасывают множество провоспалительных молекул, и активация PPAR $\gamma$  ингибирует синтез многих из них. Секреция провоспалительных цитокинов, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-12 макрофагами ингибируется при активации PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  так же подавляет выработку NO. PPAR $\gamma$  играет важнейшую роль в регуляции липидного и глюкозного метаболизма в норме, а также в регуляции воспалительного ответа [12].

На уровне организма росиглитазон может оказывать положительное влияние в терапии различных нейродегенеративных заболеваний, таких, например, как болезнь Альцгеймера. Последние клинические испытания росиглитазона показали значительное улучшение памяти и сознания пациентов с болезнью Альцгеймера [15].

## Цель исследования

Проверить, возможна ли регуляция воспалительного ответа росиглитазоном в глиальных клетках мозга на клеточном уровне и исследовать вовлеченность в передаче сигнала MAPK p38.

## Экспериментальная часть

### Материалы и методы

#### Перечень веществ

Буферный раствор SB 10мМ сток ДМСО (Sigma-Aldrich, США), липополисахарид (LPS) (Sigma-Aldrich, США), росиглитазон (RG) (Cayman, Германия), DNaseI/RNase-free (supplied with  $MnCl_2$ , 1 U/ $\mu$ L) (ThermoScientific, США), стрептомицин, пенициллин, эмбриональная телячья сыворотка, раствор Хэнкса, среда DMEM (Панэко, Россия).

#### Выделение и культивирование клеток

Эксперименты по выделению астроцитов были одобрены комиссией по биоэтике НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ. Крысы линии Wistar были получены из вивария ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН.

Выделение астроцитов проводилось по методике, разработанной ранее в нашей лаборатории [8].

Новорожденным детенышам крысы (2-3 дня) отсекали головы. С помощью пинцета из голов выдавливали мозг и переносили его в чашку Петри, содержащую буфер Рукк's. Мозги промывали и удаляли остатки кровеносной системы, после чего мозги измельчались протираем через нейлоновое ситечко с размером отверстий 250 мкм. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновое ситечко с диаметром отверстий 163 мкм. Полученную суспензию переносили в центрифужную пробирку. Далее, суспензию центрифугировали 5 мин при 500g (4°C). После центрифугирования жидкую фазу сливали, а клетки ресуспендировали в 2 мл DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС), пенициллина (20 ед/мл) и стрептомицина (20 мкг/мл). Суспензию разводили до концентрации  $6 \times 10^5$  кл/мл и помещали по 10 мл в 75 - см<sup>2</sup> культуральные флаконы. Клетки культивировали в DMEM с 10% FBS в стерильных условиях при 37°C в атмосфере с 10% CO<sub>2</sub>. Через 5 дней культуральную среду заменяли на свежую. Через 2 дня после этого клеточную среду выливали, клетки промывали фосфатносолевым буфером (PBS). Затем к промытым клеткам добавляли 3 мл раствора трипсина с ЭДТА (0,05%/0,02%) и инкубировали 5 мин при 37°C. Затем в культуральные флаконы вносили по 3 мл DMEM, содержащей 10% FBS, для остановки трипсинолиза. Гомогенизировали полученную суспензию и центрифугировали в течение 5 мин при 500g (4°C). Осадок ресуспендировали в 5 мл DMEM/10% FBS. Количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева после окраски трипановым синим. После разведения клеточной суспензии в DMEM/10% FBS до концентрации  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл они рассеивались по 3 мл в одну лунку шестилуночной



культуральной плашки. Через 2 дня культуральная среда заменялась на свежую и клетки использовались в дальнейшей работе.

#### Клеточный эксперимент

Клетки стимулировали LPS в течении 4-х часов, или инкубировали с SB в течение 30 мин, или обрабатывали росиглитазоном в течение 30 минут и затем стимулировали LPS в течении 4-х часов, или предварительно инкубировали с SB в течение 30 мин и затем культивировали в течении 4-х часов с LPS, или предварительно инкубировали с SB в течение 30 мин, обрабатывали росиглитазоном в течение 30 минут и затем культивировали в течении 4-х часов с LPS.

#### Выделение РНК из культуры клеток

Для выделения РНК из культуры клеток использовался ThermoScientificGeneJETRNAPurificationKit (#K0732). Перед первым использованием к WashBuffer<sup>1/2</sup> был добавлен 96% спирт. Готовился лизирующий буфер: на 1 лунку, до 10<sup>6</sup> клеток смешивались 600 мкл LysisBuffer и 12 мкл 14,3 М β-меркаптоэтанола. Из флакона удалялась питательная среда, клетки промывались PBS один раз. Клетки отделялись с помощью трипсина: добавляли 1 мл трипсина, инкубировали 5 мин, собирали клетки в пробирку, центрифугировали 5 мин с ускорением в 250 g, удаляли жидкую фазу (после можно хранить при -70°C).

Клетки ресуспендировали в 600 мкл лизирующего буфера, мешали с помощью центрифуги – вортекса 10 сек. После лизиса добавлялось 350 мкл этанола (96-100%), смесь перемешивалась пипеткой. До 700 мкл лизата перемещали в колонку, вставленную в пробирку, центрифугировали 1 минуту с максимальной скоростью. Затем последовательно мембрана с осажденным препаратом центрифугировалась с 700 мкл промывочного буфера №1 (1 минута на максимальной скорости), с 600 мкл промывочного буфера №2 (1 минута на максимальной скорости), с 250 мкл промывочного буфером №2 (2 минуты на максимальной скорости). Если в колонке оставался раствор, колонка центрифугировалась 1 минуту на максимальной скорости. затем колонка переносилась в стерильную пробирку, и РНК смывалась с мембраны очищенной по технологии MiliQ водой объемом 50мкл (центрифугировалась минуту на 12000g). Чистота выделенной РНК определялась методом спектрофотометрии.

#### Обратная транскрипция

Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью коммерческого набора ThermoScientificRevertAidFirstStrandcDNASynthesisKit #K1622 согласно инструкции производителя. В реакцию на пробу брали 70 нг РНК, добавляли 0,05 мкл олигопраймеров,

0,2 мкл 5x концентрированного в 5 раз реакционного буфера, 0,05 мкл ингибитора РНКазы, 0,05 RevertAidM-MuLVRT (200 частиц/мкл). Добавлялась вода MiliQ для доведения объема до 1 мкл. После пробы инкубировались в течение 60 минут при 42 градусах Цельсия в амплификаторе MyCycler (производство BIO-RAD, США). Реакция прекращалась 5-минутным инкубированием при 70 градусах.

#### ОТ-ПЦР в реальном времени

Переработанные пробы разбавлялись MiliQ до 5,2 мкл. Реакция проводилась на амплификаторе для ПЦР в реальном времени DTlite4 (производство ДНК-технология, Россия).

Праймеры, использовавшиеся в работе				
Производитель – «ДНК - синтез», Россия				
№	Название	Последовательность 5'-3'	Длина	Молекулярная масса
1	COX2-EP-Forward	TACGTGTTGACGTCCAGATC	20	6170
2	COX2-EP-Reverse	TGGAGAAAGCTTCCCAACTT	20	6163
3	COX2-EP-Probe	FAM-TGACAGCCCACCAACTTACAATGT-BHQ1	24	7328
4	$\beta$ -actin-EP-Forward	AGATGACCCAGATCATGTTTGAG	23	7150
5	$\beta$ -actin-EP-Reverse	GGCATACAGGGACAACACAG	20	6231
6	$\beta$ -actin-EP-Probe	VIC-CCCAGCCATGTACGTAGCCATCC-BHQ1	23	6992
7	TNF $\alpha$ -EP-Forward	CAAGGAGGAGAAGTTCCCAA	20	6246
8	TNF $\alpha$ -EP-Reverse	TGATCTGAGTGTGAGGGTCTG	21	6610
9	TNF $\alpha$ -EP-Probe	ROX-TCCCTCTCATCAGTTCCATGGCC-BHQ2	23	6949
10	IL10-EP-	CCCAGAAATCAAGGAGCATTTG	22	6815

	Forward			
11	IL10-EP- Reverse	TCATTCTTCACCTGCTCCAC	20	6001
12	IL10-EP- Probe	Cy5-CTGCGACGCTGTCATCGATTTTC-BHQ3	22	6739

В пробы добавлялись необходимые праймеры: 0,45 мкл Forward праймера, 0,45 мкл Reverse, 0,45 мкл зонда. Затем добавлялось 13,45 мкл MiliQ и 5 мкл qPCRmix-HS (производство Евроген, Россия).

После пробы помещались в амплификатор для ПЦР в реальном времени, инкубировались 10 минут при температуре 94°C, затем проходили 40 циклов: 94°C – 15 секунд, 57°C - 30 сек, 72°C - 30 сек.

## Вестерн Блоттинг

### *Разделение белков*

Для проведения белкового иммуноблоттинга измерялась концентрация выделенного белка в пробах методом Брэдфорда.

Электрофорез проводили с помощью прибора для электрофореза Mini-PROTEAN TetraCell (Biorad, USA). На заливочный столик устанавливались стекла. После готовился разделяющий гель (Tris – 90,855 г на 500 мл) и концентрирующий гель (Tris – 15,1425 г на 250 мл). После этого разделяющий гель заливался на сантиметр ниже уровня карманов, уровень выравнивался изопропанолом. Когда залитый гель застывал, изопропанол сливался, гель промывался дистиллированной водой и протирался насухо. После оставшееся пространство заливалось концентрирующим гелем, убирались пузыри, устанавливалась гребенка.

Затем собиралась ячейка, внутренняя камера заполнялась электродным буфером (Tris – 30,285 г, Glycin – 187,675 г, SDS - 100 мл 10% на 1 литр), во внешнюю камеру заливалось минимальное количество буфера. При протекании ячейка пересобиралась, или, если образцы были добавлены, внешняя полость заливалась буфером полностью. После этого добавлялось по 20 мкл образцов в лунку (20 мкг/мл). Ячейка подключалась к источнику тока 200 мА.

### *Перенос на мембрану*

По формату геля вырезалась нитроцеллюлозная мембрана и фильтровальная бумага, в течении 30 минут мембрана вымачивалась в буфере для переноса (Tris-GlycineBuffer 10X - 50 ml, метанол - 100 мл, H<sub>2</sub>O - 350 мл), в течение 30 минут губки вымачивалась в

дистиллированной воде. После этого собиралась следующая стопка: губка – 2 бумажки – мембрана – гель – 2 бумажки – губка. Вся стопка помещалась мембраной вниз в ячейку, ячейка подключалась на час к источнику тока с постоянным напряжением 100 В. После этого единообразно и общая эффективность переноса белков из геля на мембрану проверялась покраской 0,3% раствором Ронсеау S в 1% уксусной кислоте. Краситель отмывался 30 минут на орбитальном шейкере дистиллятом. Затем готовилось 10 мл 5% раствора молока в буфере TBST. Раствор инкубировался час при комнатной температуре на шейкере с мембраной.

#### *Окрашивание белков*

Для блокирования мест неспецифического связывания антител мембрану инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течении 30 минут в растворе TBST, содержащем 10% сухое обезжиренное молоко. После блокировки мембрану инкубировали в течении 1 часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании в 3 мл TBST, содержащих 1 мл специфичных антител. По окончании инкубации мембрана промывалась 3 раза по 10 минут TBST и переносилась в раствор 1 мкл вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, в 10 мкл TBST. В растворе вторичных антител мембрана инкубировалась 1 час при постоянном перемешивании. По окончании инкубации мембрана промывалась 3 раза по 10 минут TBST.

#### *Измерение концентрации*

Использовали метод хемилюминесцентной детекции: взаимодействие люминола и пероксида в присутствии пероксидазы хрена, конъюгированной с вторичными антителами, приводит к образованию окисленного люминола, обладающего люминесцентным свечением при длине волны 425 нм. Интенсивность хемилюминесценции прямо пропорциональна количеству исследуемого белка. Детекция хемилюминесценции осуществляется с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP, обладающей высоким разрешением и чувствительностью. Система ChemiDoc MP снабжена CDD камерами высокого разрешения.

## **Статистика**

Значения представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Данные анализировали с помощью метода критерия Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

## Результаты исследования

### Результаты и обсуждение

#### Влияние росиглитазона на экспрессию генов COX-2, IL-10 и TNF $\alpha$ .

Для характеристики противовоспалительного действия росиглитазона мы исследовали его эффект на экспрессию COX-2, IL-10 и TNF $\alpha$  на уровне мРНК в нативных и стимулированных LPS клетках. В работе использовались концентрации LPS (100 нг/мл) и росиглитазона (10 мкМ), для которых ранее был показан биологический эффект и отсутствие цитотоксичности при выбранных концентрациях [16]. Клетки инкубировали в течение 30 минут с росиглитазоном (10 мкМ), затем инкубировали без дополнительной стимуляции или стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 часов. Уровень мРНК измерялся методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Контролем служили клетки без обработки, уровень экспрессии исследуемых генов в которых был принят за 1.

Получено, что LPS повышает экспрессию COX-2 в 3,5 раза, TNF $\alpha$  более чем в 2 раза, IL-10 в 3 раза. Воздействие росиглитазоном в LPS-стимулированных клетках повышает экспрессию COX-2 в 5 раз, TNF $\alpha$  более чем в 6 раз, IL-10 в 8 раз (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о смешанном действии росиглитазона. Несмотря на то, что на уровне организмов росиглитазон обладает противовоспалительным эффектом, на уровне мРНК он стимулирует экспрессию как воспалительного маркера TNF $\alpha$ , так и противовоспалительных генов COX-2 и IL-10. Возможно, это связано с тем, что росиглитазон увеличивает экспрессию противовоспалительных генов сильнее, чем провоспалительных.

Также разница между уровнями экспрессии генов может быть связана с изменением уровня экспрессии мРНК исследуемых нами генов во времени (исследуемые нами гены имеют разное время достижения наблюдаемых максимумов экспрессии). Для проверки этой гипотезы в дальнейшей работе планируется исследовать развитие воспалительного ответа и эффекта росиглитазона во времени.

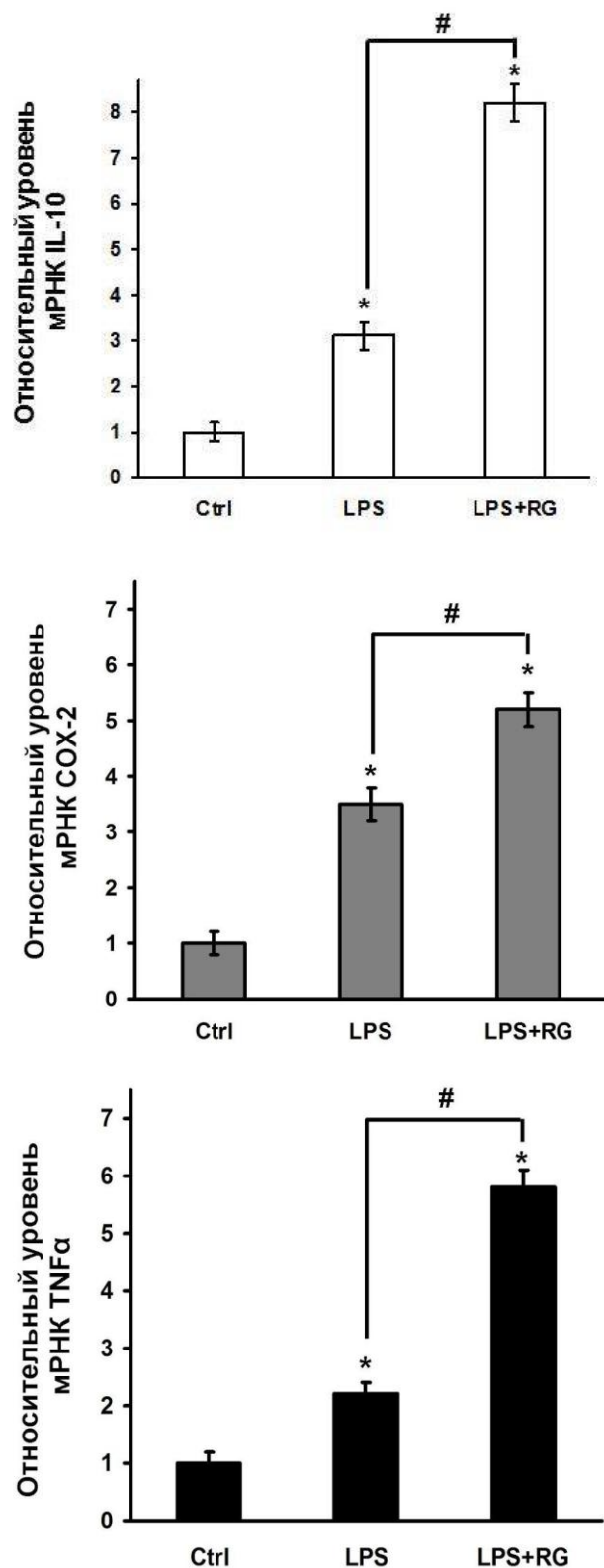


Рис. 1. Влияние росиглитазона (RG) на уровень мРНК COX-2, TNF $\alpha$  и IL-10 в LPS-стимулированных и не обработанных LPS астроцитах. Клетки обрабатывали RG (10 мкМ) в течение 30 минут, стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 часов. Относительный уровень мРНК определяли с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени, значения нормированы на уровень мРНК актина.

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с нестимулированными клетками (Ctrl), # –  $p < 0,05$ .

## Влияние ингибирования p38 МАПК на противовоспалительные эффекты росиглитазона

Предложенные ранее молекулярные механизмы регуляторного действия росиглитазона[17] позволили предположить, что в реализацию эффекта росиглитазона на экспрессию COX-2, IL-10 и TNF $\alpha$  в LPS-стимулированных клетках важный вклад вносит p38 МАПК. Клетки инкубировали с SB в течение 30 мин, инкубировали в течение 30 минут с росиглитазоном (10 мкМ), затем инкубировали без дополнительной стимуляции или стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 часов.

В результате было получено, что ингибирование p38 МАПК в нативных клетках не приводит к изменению экспрессии генов COX-2 и TNF $\alpha$ , и немного повышает уровень экспрессии IL-10. Ингибирование p38 МАПК в LPS-стимулированных клетках не изменяет уровень экспрессии IL-10, более чем в 2 раза повышает уровень экспрессии TNF $\alpha$  и понижает уровень экспрессии COX-2 в 1,5 раз (относительно уровня экспрессии в LPS-стимулированных клетках без ингибирования p38 МАПК) (рис. 2).

Воздействие росиглитазоном в LPS-стимулированных клетках при ингибировании p38 МАПК не изменяет экспрессию COX-2 и TNF $\alpha$  относительно контроля и понижает уровень экспрессии IL-10 более чем в 2 раза относительно уровня экспрессии в LPS-стимулированных клеток, обработанных росиглитазоном – приводит к блокированию LPS-стимулированной экспрессии исследуемых нами генов.

Полученные результаты могут быть связаны с изменением экспрессии мРНК исследуемых нами генов во времени. Профиль экспрессии генов имеет колоколообразную форму с наблюдаемыми максимумами экспрессии COX-2 через 2-4 часа после стимуляции клеток LPS, TNF $\alpha$  через приблизительно 2 часа и IL-10 через 4-6 часов соответственно. Возможно, сочетание применения SB и росиглитазона смещает максимум экспрессии мРНК исследуемых генов в область 1 часа, или, наоборот, смещает ее в сторону увеличения времени максимального пика. Таким образом, в точке через 4 часа после стимуляции клеток LPS, которая изучалась в данной работе, мы наблюдали снижение уровня мРНК исследуемых генов. В дальнейшей работе планируется исследовать развитие воспалительного ответа и эффекты росиглитазона и SB во времени.

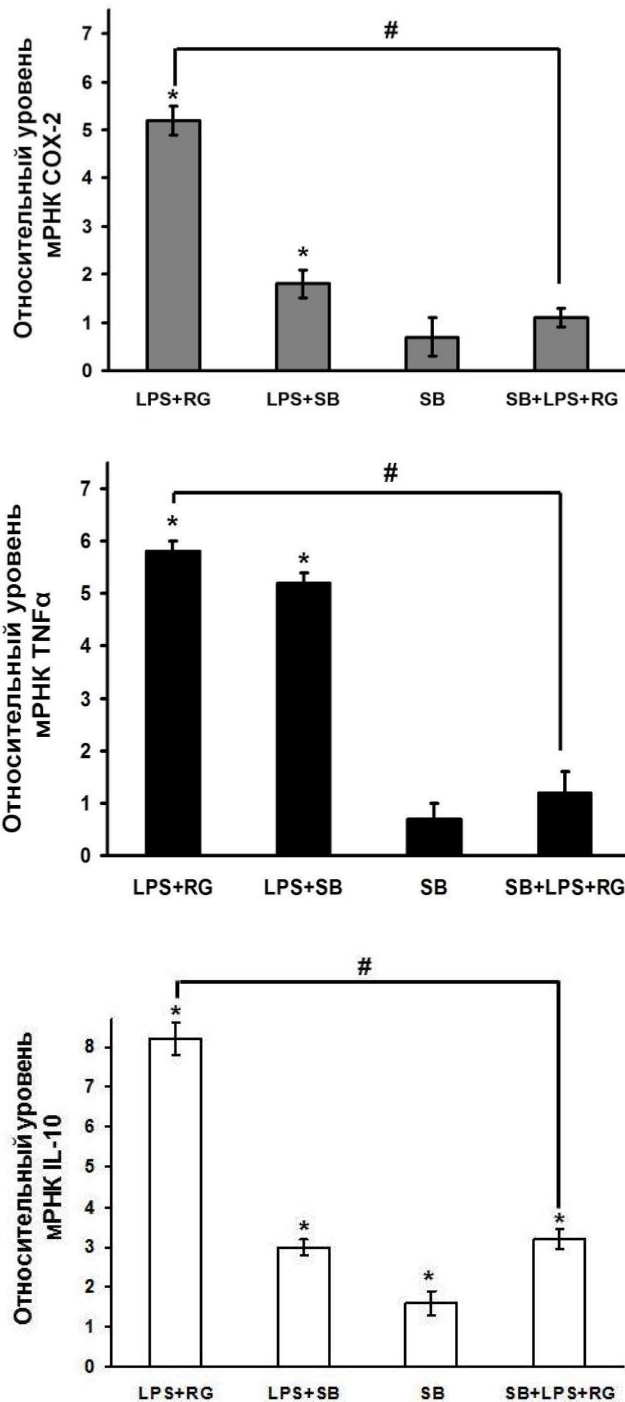


Рис. 2. Влияние росиглитазона (RG) на уровень мРНК COX-2, TNF $\alpha$  и IL-10 в LPS-стимулированных и не обработанных LPS астроцитах при блокировании МАПК p38. Клетки инкубировали с SB в течение 30 мин, обрабатывали RG (10 мкМ) в течение 30 минут, стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 часов. Относительный уровень мРНК определяли с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени, значения нормированы на уровень мРНК актина.

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с нестимулированными клетками (Ctrl), # –  $p < 0,05$ .



## Заключение и выводы

В результате исследования было показано, что росиглитазон увеличивает экспрессию всех трех исследуемых генов развития воспалительного ответа. Блокировка МАПК p38 при воздействии росиглитазона в условиях воспаления снижала экспрессию генов до уровня экспрессии в нейтральных условиях, что показывает вовлеченность этой МАПК в передачу сигнала. Показанная нами возможность использования для модуляции экспрессии противовоспалительных генов росиглитазона, который является уже используемым лекарственным веществом, открывает новые терапевтические перспективы применения этого соединения.

## Литература

- [1] J. M. Madeira, S. M. Schindler, and A. Klegeris, “A new look at auranofin, dextromethorphan and rosiglitazone for reduction of glia-mediated inflammation in neurodegenerative diseases,” *Neural Regeneration Research*, vol. 10, no. 3. pp. 391–393, 2015.
- [2] B. Bettcher and J. Kramer, “Inflammation and clinical presentation in neurodegenerative disease: a volatile relationship,” *Neurocase*, vol. 19, no. 2, pp. 1–19, 2012.
- [3] M. Font-Nieves, M. G. Sans-Fons, R. Gorina, E. Bonfill-Teixidor, A. Salas-Perdomo, L. Marquez-Kisinousky, T. Santalucia, and A. M. Planas, “Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E 2 production in astrocytes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 9, pp. 6454–6468, 2012.
- [4] C. N. Serhan, “Systems approach to inflammation resolution: Identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators,” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 7, no. SUPPL. 1. pp. 44–48, 2009.
- [5] S.-M. Lucas, N. J. Rothwell, and R. M. Gibson, “The role of inflammation in CNS injury and disease.,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 147 Suppl , pp. S232–40, Jan. 2006.
- [6] S. Aleshin and G. Reiser, “Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)- $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$  triad in regulation of reactive oxygen species signaling in brain.,” *Biol. Chem.*, vol. 394, no. 12, pp. 1553–70, Dec. 2013.
- [7] R. M. Locksley, N. Killeen, and M. J. Lenardo, “The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.,” *Cell*, vol. 104, no. 4, pp. 487–501, Feb. 2001.

- [8] D. V Chistyakov, S. Aleshin, M. G. Sergeeva, and G. Reiser, "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.*, vol. 130, no. 4, pp. 563–74, Aug. 2014.
- [9] G. L. Johnson and R. Lapadat, "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.," *Science*, vol. 298, no. 5600, pp. 1911–1912, 2002.
- [10] A. Igea and A. R. Nebreda, "The stress kinase p38 as a target for cancer therapy," *Cancer Research*, vol. 75, no. 19. pp. 3997–4002, 2015.
- [11] C. Farina, F. Aloisi, and E. Meinl, "Astrocytes are active players in cerebral innate immunity," *Trends in Immunology*, vol. 28, no. 3. pp. 138–145, 2007.
- [12] S. Mandrup and A. Bugge, "Molecular mechanisms and genome-wide aspects of PPAR subtype specific transactivation," *PPAR Research*. Article ID 169506, 2010.
- [13] T. Kielian, "Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis.," *J. Neurosci. Res.*, vol. 83, no. 5, pp. 711–30, Apr. 2006.
- [14] P. Mohanty, A. Aljada, H. Ghanim, D. Hofmeyer, D. Tripathy, T. Syed, W. Al-Haddad, S. Dhindsa, and P. Dandona, "Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone," in *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2004, vol. 89, no. 6, pp. 2728–2835.
- [15] G. Landreth, Q. Jiang, S. Mandrekar, and M. Heneka, "PPAR $\gamma$  Agonists as Therapeutics for the Treatment of Alzheimer's Disease," *Neurotherapeutics*, vol. 5, no. 3, pp. 481–489, 2008.
- [16] Z. J. Zhang, L. X. Zhao, D. L. Cao, X. Zhang, Y. J. Gao, and C. Xia, "Curcumin inhibits LPS-induced CCL2 expression via JNK Pathway in C6 rat astrocytoma cells," *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 32, no. 6, pp. 1003–1010, 2012.