

УДК 57.085.23

О. Е. ПОЛУЛЯХ, Т. А. МИТЮКОВА, Е. Ф. ПОЛУКОШКО, Т. И. ТЕРПИНСКАЯ
**ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ АСТРОЦИТОВ В
МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ ВИРУСНОГО ГЕНЕЗА**

*Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии
наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

Нейропсихические последствия вирусных инфекций могут быть связаны с активацией астроцитов, которая опосредована взаимодействием вирусного агента с толл-подобными рецепторами 3 типа (TLR3). Одним из наиболее часто используемых лигандов TLR3 является полиинозиновая:полицитидиловая кислота (Poly I:C), которая воспроизводит эффекты вирусного воздействия на клеточном уровне. Целью исследования было определение характера воздействия различных концентраций Poly I:C на выделение про- и противовоспалительных цитокинов, а также маркеров активации астроцитов – белка S100b и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в первичной культуре клеток астроглии крыс. Работа проводилась на первичной культуре астроцитов мозга новорожденных крыс. Моделирование воздействия вирусной инфекции осуществляли с использованием Poly I:C в интервале концентраций 6,25–100 мкг/мл. Определение цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10) и маркеров активации астроцитов S100b и GFAP в супернатантах культуры клеток проводили методом иммуноферментного анализа. Выявлено усиление синтеза провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 β и ИЛ-6 в диапазоне доз Poly I:C 6,25–100 мкг/мл и 25–100 мкг/мл, соответственно. Показано синхронное повышение концентрации противовоспалительного ИЛ-10 при низких дозах лиганда, а также активация наработки астроглиальных белков S100b и GFAP при дозах Poly I:C 6,25–12,5 мкг/мл и подавление астроглиоза при нарастании концентрации лиганда TLR3. Таким образом, установлен дозозависимый характер эффектов влияния Poly I:C на культуру астроцитов.

Ключевые слова: астроциты, толл-подобные рецепторы 3 типа, астроглиальные белки, Poly I:C.

Введение. В настоящее время известно, что вирусные инфекции могут оказывать влияние на функциональное состояние мозга [1]. Установлены нейропсихиатрические последствия вирусных инфекций, такие как делирий, энцефалит, инсульт, нарушение обоняния и вкуса [1, 2]. Вирусные инфекции в период пренатального и раннего постнатального развития повышают риск возникновения шизофрении и аутизма [3]. На сегодняшний день патогенетические механизмы формирования нарушений функций мозга при вирусных инфекциях до конца не выяснены. Вирусы способны повреждать ЦНС как путем прямой инвазии, так и посредством активации иммунной системы [4]. Регуляция врожденного иммунного ответа в ЦНС зависит не только от микроглии, которая является основным компонентом иммунной защиты ЦНС, но и от астроцитов. В последнее время появляется все больше доказательств, указывающих на ряд изменений в структуре и функциях астроцитов, связанных с нейропсихическими заболеваниями: изменение морфологии клеток, экспрессии маркеров активации (глиального фибриллярного кислого белка, протеина S100b), а также опосредованной астроцитами синаптической пластичности [5]. При этом показано, что целый ряд вирусов, включая SARS-Cov-2, имеет тропизм к астроцитарным клеткам [6]. При попадании вируса в организм происходит его распознавание иммунными клетками посредством расположенных на них толл-подобных рецепторов (TLR). При этом происходит инициация внутриклеточного сигнального каскада, включающего ядерную транслокацию и активацию транскрипционных факторов (NF- κ B, AP1, IRF3, IRF7), которые опосредуют индукцию цитокинов [7].

Основными рецепторами, задействованными в противовирусной защите, являются внутриклеточные TLR3. Известно, что TLR3 экспрессируются не только иммунными клетками, но и рядом других клеток, в том числе астроцитами [8]. TLR3-опосредованная активация астроцитов способствует выработке как провоспалительных (TNF- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6), так и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-9, ИЛ-10 и ИЛ-11) [9]. Несмотря на то, что астроциты выполняют широкий спектр ключевых функций, информация о роли астроглиальных TLR3 в развитии заболеваний и травм ЦНС ограничена. Одним из наиболее часто используемых имитаторов вирусной инфекции является

полиинозиновая:полицитидиловая кислота (Poly I:C), представляющая собой синтетический аналог двухцепочечной РНК вируса. Poly I:C является лигандом TLR3 и вызывает иммунный ответ аналогично реальной вирусной инфекции [10].

Цель работы – определить характер воздействия различных концентраций Poly I:C на выделение про- и противовоспалительных цитокинов, а также маркеров активации астроцитов – белка S100b и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в первичной культуре клеток астроглии крыс.

Материалы и методы исследования. Получение первичной культуры астроцитов. Клетки нервной ткани выделяли из больших полушарий головного мозга новорожденных крысят Вистар согласно протоколу Ивановой А. Е. и др. [11]. Культивировали в чашках Петри с использованием среды DMEM/Ham's F-12 с L-глутамином и 15мМ HEPES (LT Biotech) с добавлением фетальной бычьей сыворотки (10 %) и антибиотика/антимикотика (1 %) при температуре 37°C, содержании CO₂ – 5 %. Через 5 и 10 суток для удаления микроглии и олигодендроцитов проводили полную замену среды с предварительным встряхиванием на орбитальном шейкере (200 об/мин, 6 часов) в CO₂ инкубаторе. После достижения клеточным слоем 80–90 % конфлюэнтности астроциты высевали в 24-луночные планшеты (по 200 000 клеток в лунку), инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C в течение 2-х дней. Далее производили замену среды и переходили к этапу стимулирования клеток.

Моделирование воздействия вирусной инфекции. В лунки с культурой клеток вносили Poly I:C, в различных концентрациях: 100 мкг/мл, 50 мкг/мл, 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 6,25 мкг/мл. В контрольные лунки добавляли 0,9 % NaCl в соответствующем объеме. Инкубировали в течение суток, отбирали супернатант и замораживали при –80°C для дальнейших исследований.

Определение цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-10 и астроцитарных белков S100b и GFAP в супернатантах культуры клеток проводили методом иммуноферментного анализа на автоматическом анализаторе ChemWell (США) с использованием коммерческих наборов Rat IL-6 (Interleukin-6) ELISA kit (Fine test, Китай), Rat IL-1β (Interleukin 1Beta) ELISA kit (Fine test, Китай), Rat IL-10 (Interleukin-10), ELISA kit (Fine test, Китай), Rat S100b ELISA kit (Fine test, Китай), Rat GFAP ELISA (Fine test, Китай), соответственно.

Работа была проведена с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123). Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программного обеспечения Statistica 7.0. Использовали параметрические и непараметрические методы статистики. Сравнение между группами проводили с использованием t-критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни, достоверным считали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Содержание провоспалительного цитокина ИЛ-1β поступательно повышалось, начиная с концентрации Poly I:C 6,25 мкг/мл и до 100 мкг/мл (рисунок 1).

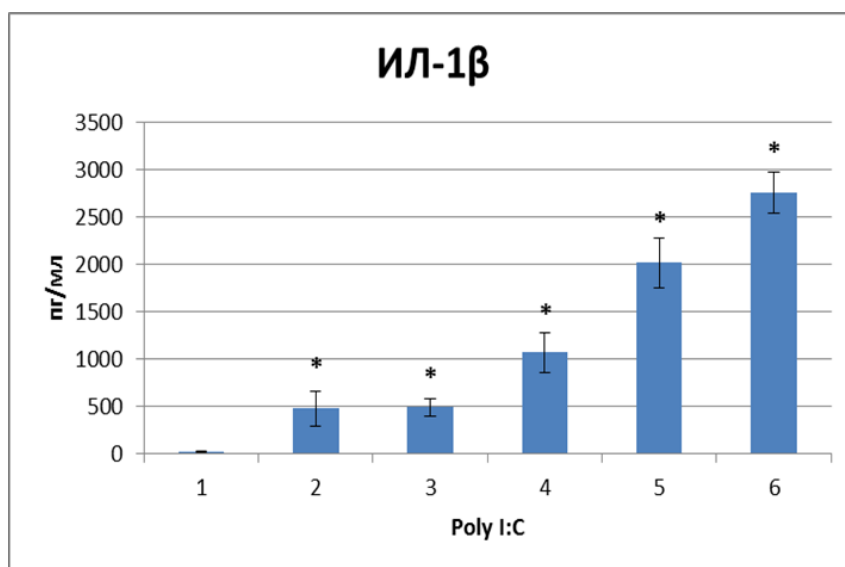


Рис. 1. Уровень ИЛ-1β в зависимости от концентрации Poly I:C, 1 – контроль, 2 – Poly I:C 6,25 мкг/мл, 3 – Poly I:C 12,5 мкг/мл, 4 – Poly I:C 25 мкг/мл, 5 – Poly I:C 50 мкг/мл, 6 – Poly I:C 100 мкг/мл. * – статистически значимые различия от группы «Контроль» ($p < 0,05$, критерий Стьюдента)

На рисунке 2 показано содержание ИЛ-6 в супернатантах культуры астроцитов при различных концентрациях Poly I:C. Значения ИЛ-6 при низких концентрациях Poly I:C не отличались от контроля. При стимуляции клеток в интервале концентраций Poly I:C от 25 мкг/мл до 100 мкг/мл содержание ИЛ-6 увеличивалось пропорционально дозе лиганда.

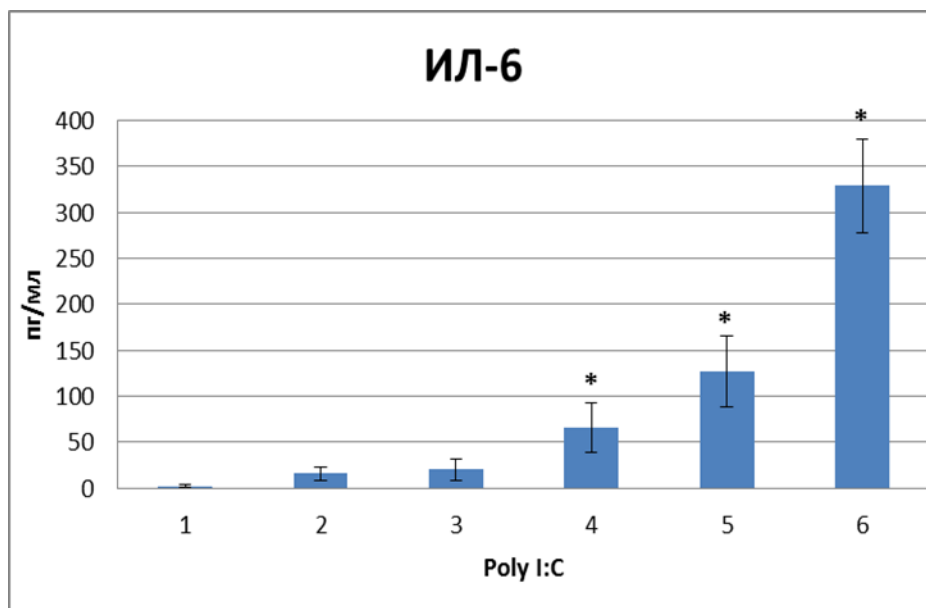


Рис. 2. Уровень ИЛ-6 в зависимости от концентрации Poly I:C, 1 – контроль, 2 – Poly I:C 6,25 мкг/мл, 3 – Poly I:C 12,5 мкг/мл, 4 – Poly I:C 25 мкг/мл, 5 – Poly I:C 50 мкг/мл, 6 – Poly I:C 100 мкг/мл. * – статистически значимые различия от группы «Контроль» ($p < 0,05$, критерий Стьюдента)

Уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10 поступательно повышался при концентрациях Poly I:C 6,25 и 12,5 мкг/мл и оставался на повышенном уровне по отношению к контролю (рисунок 3).

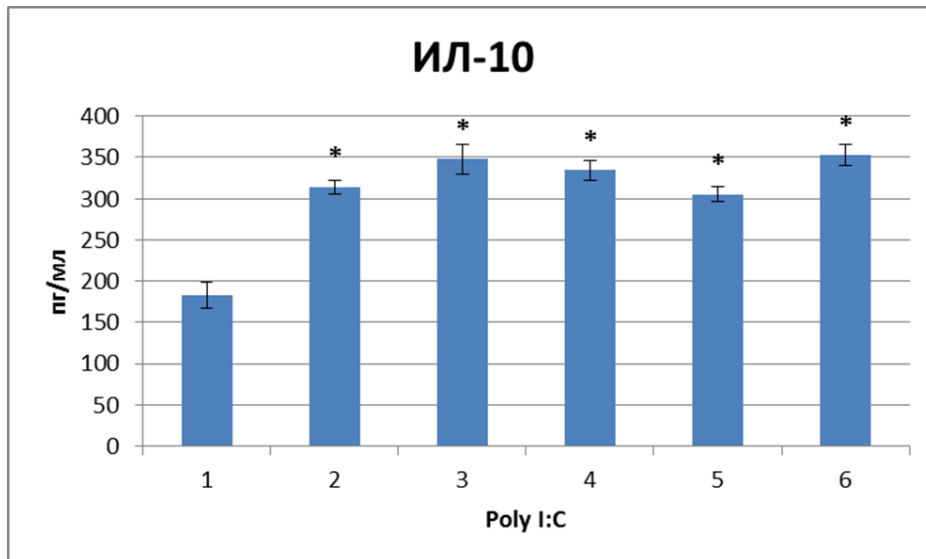


Рис. 3. Уровень ИЛ-10 в зависимости от концентрации Poly I:C, 1 – контроль, 2 – Poly I:C 6,25 мкг/мл, 3 – Poly I:C 12,5 мкг/мл, 4 – Poly I:C 25 мкг/мл, 5 – Poly I:C 50 мкг/мл, 6 – Poly I:C 100 мкг/мл. * – статистически значимые различия от группы «Контроль» ($p < 0,05$, критерий Стьюдента)

При определении протеинов S100b и GFAP в супернатантах первичной культуры астроцитов установлено их статистически значимое однотипное дозозависимое увеличение при стимуляции клеток Poly I:C в концентрациях 6,25 и 12,5 мкг/мл. При более высоких дозах Poly I:C концентрации S100b и GFAP резко снижались до минимальных значений, характерных для контроля – клеток без стимуляции (рисунок 4).

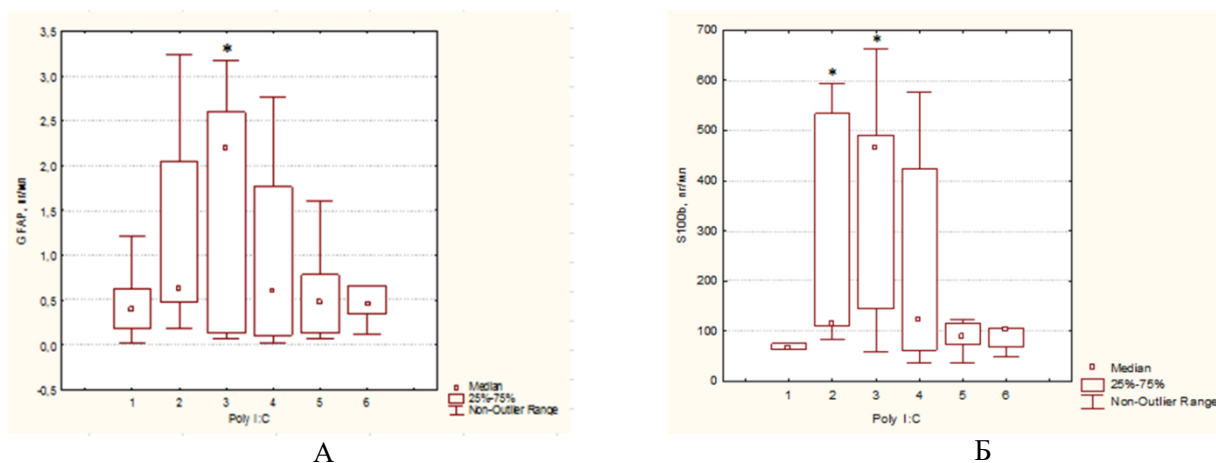


Рис. 4. Уровни GFAP (а) и S100b (б) в зависимости от концентрации Poly I:C, 1 – контроль, 2 – Poly I:C 6,25 мкг/мл, 3 – Poly I:C 12,5 мкг/мл, 4 – Poly I:C 25 мкг/мл, 5 – Poly I:C 50 мкг/мл, 6 – Poly I:C 100 мкг/мл. * – статистически значимые различия от группы «Контроль» ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни)

В литературе имеются данные об эффектах воздействия Poly I:C на TLR3 астроцитов мозга в различных экспериментальных условиях. В ряде работ показана индукция синтеза провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также усиление астроглиоза [12, 13, 14]. Так, в исследовании Park et al. установлено, что введение Poly I:C в культуру астроцитов человека вызывает повышение экспрессии генов воспалительных медиаторов (TNF- α , IFN- β и интерферон γ индуцибельного белка 10 (IP-10)) [12]. Авторы подтвердили свои результаты на мышинной модели в опытах *in vivo*, показав, что введение Poly I:C в стриатум мозга мыши вызывает активацию астроцитов и усиление воспалительных процессов в мозге [12]. В работах Scumpia et al. продемонстрировано, что введение Poly I:C в концентрациях 0,05–50 мкг/мл в первичную культуру астроцитов мозга крыс Sprague Dawley приводит к дозозависимому повышению экспрессии мРНК генов TNF- α и ИЛ-1 β , а также самих этих белков [13]. Deleidi et al. в экспериментах на крысах Sprague Dawley установили, что введение в черную субстанцию мозга Poly I:C в дозах 10, 20 и 40 мкг вызывает нейровоспалительный ответ, и приводит к повышению синтеза белка GFAP, а следовательно усилению астроглиоза [14].

В то же время в опытах на первичной культуре астроцитов, подвергнутых кислородно-глюкозной депривации, показан нейропротективный эффект Poly I:C. Pan et al. установили, что при кислородно-глюкозной депривации наблюдалось усиление воспалительных реакций за счет выброса TNF- α и IL-6, повреждение и гибель астроцитов. В то же время предварительная обработка Poly I:C значительно подавляла выработку провоспалительных цитокинов и повышала жизнеспособность клеток. Этот эффект был подтвержден в дальнейших исследованиях, проведенных на животных моделях ишемии мозга. Введение Poly I:C способствовало ослаблению неврологического дефицита, уменьшению объема инфаркта и снижению содержания TNF- α и IL-6 в ишемизированном стриатуме и коре головного мозга [15].

Полученные нами результаты демонстрируют, что, начиная с минимальных концентраций Poly I:C, отмечается статистически значимое повышение уровня ИЛ-1 β в среде инкубации астроцитов. При дальнейшем нарастании содержания лиганда наблюдалось поступательное увеличение выброса ИЛ-6. Рост уровней обоих провоспалительных цитокинов продолжался вплоть до высоких доз лиганда TLR3 – 100 мкг/мл. Нами показано, что активация синтеза противовоспалительного ИЛ-10 отмечалась, начиная с минимальных концентраций Poly I:C, и это совпадало с динамикой выброса ИЛ-1 β . Можно предположить, что повышение концентрации противовоспалительного медиатора ИЛ-10 носило компенсаторный характер.

Многочисленные исследования подтверждают, что воздействие Poly I:C вызывает астроглиоз, который проявляется не только нарастанием синтеза про- и противовоспалительных интерлейкинов, но также повышением наработки астроглиальных белков – GFAP и S100b [16, 17]. В наших экспериментах выявлено нарастание концентраций GFAP и S100b при дозах Poly I:C 6,25–12,5 мкг/мл в среде инкубации астроцитов. При более высоких концентрациях Poly I:C (12,5–100 мкг/мл), напротив, происходит подавление астроглиоза, что проявляется снижением уровней этих белков.

Закключение. В результате проведенных исследований установлены особенности дозозависимых эффектов влияния Poly I:C на изученные показатели в культуре астроцитов. При

определении уровней провоспалительных цитокинов выявлено поступательное усиление синтеза ИЛ-1 β , начиная с минимальных концентраций лиганда TLR3 6,25 мкг/мл и вплоть до 100 мкг/мл, а также нарастание синтеза ИЛ-6 в интервале концентраций 25–100 мкг/мл. Изучение характера сдвигов противовоспалительного цитокина ИЛ-10 показало его статистически значимое повышение в интервале доз Poly I:C от 6,25 мкг/мл до 100 мкг/мл по сравнению с контролем. Активация наработки астроглиальных белков GFAP и S100b начиналась при концентрации Poly I:C 6,25 мкг/мл и достигала своего пика при дозе лиганда 12,5 мкг/мл. При дальнейшем повышении концентрации Poly I:C в среде уровни белков возвращались к контрольным значениям.

Литература:

- [1] Pol A. Viral infection leading to brain dysfunction: more prevalent than appreciated? // *Neuron*. 2009. Vol. 64, № 1. P. 17–20.
- [2] Glezer I. et al. Viral infection and smell loss: The case of COVID-19 // *J Neurochem*. 2021. Vol. 157, № 4. P. 930–943.
- [3] Meyer U. Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation? // *Pediatric research*. 2011. Vol. 69. P. 26–33.
- [4] Griffin D. Immune responses to RNA-virus infections of the CNS // *Nature reviews immunology*. 2003. Vol. 3. P. 493–502.
- [5] Kim R. Astroglial correlates of neuropsychiatric disease: from astrocytopathy to astrogliosis // *Prog neuropsychopharmacol boil psychiatry*. 2018. Vol. 87, Part A. P. 126–146.
- [6] Andrews M. et al. Tropism of SARS-CoV-2 for developing human cortical astrocytes // *Proc natl acad sci USA*. 2022. Vol. 119, № 30.
- [7] Zhong B. Innate immune responses: Crosstalk of signaling and regulation of gene transcription // *Virology*. 2006. Vol. 352, № 1. P. 14–21.
- [8] Carpentier P. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli // *Glia*. 2005. Vol. 49, № 3. P. 360–374.
- [9] Guerrero-Garcia J. The role of astrocytes in multiple sclerosis pathogenesis // *Neurologia*. 2020. Vol. 35, № 6. P. 400–408.
- [10] Fortier M-E. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004. Vol. 287, № 4. P. 759–766.
- [11] Иванова А. Е. Участие активированного протеина С и тромбина в регуляции функции астроцитов // *Биологические мембраны*. 2013. Т. 30, № 5–6. С. 387–397.
- [12] Park Ch. TLR3-mediated signal induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in astrocytes: differential signaling mechanisms of TLR3-induced IP-10 and IL-8 gene expression // *Glia*. 2006. Vol. 53, № 3. P. 248–256.
- [13] Scumpia Ph. Double-stranded RNA signals antiviral and inflammatory programs and dysfunctional glutamate transport in TLR3-expressing astrocytes // *Glia*. 2005. Vol. 52, № 2. P. 153–162.
- [14] Deleidi M. The toll-like receptor-3 agonist polyinosinic:polycytidylic acid triggers nigrostriatal dopaminergic degeneration // *The Journal of Neuroscience*. 2010. Vol. 30, № 48. P. 16091–16101.
- [15] Pan L. Toll-like receptor 3 agonist Poly I:C protects against simulated cerebral ischemia in vitro and in vivo // *Acta pharmacologica sinica*. 2012. Vol. 33. P. 1246–1253.
- [16] Mafuika S. N. The potential of serum S100 calcium-binding protein B and glial fibrillary acidic protein as biomarkers for traumatic brain injury // *Translational Research in Anatomy*. 2022. Vol. 29. P. 1–8.
- [17] Michetti F. The S100b story: from biomarker to active factor in neural injury // *Journal of neurochemistry*. 2019. Vol. 148. P. 168–187.

O. Y. POLULIAKH, T. A. MITYUKOVA, Y. F. POLUKOSHKO, T. I. TERPINSKAYA

INDICATORS OF THE FUNCTIONAL STATE OF ASTROCYTES IN THE MODEL OF INFLAMMATION OF VIRAL GENESIS

State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”,
Minsk, Republic of Belarus

Summary

The neuropsychiatric consequences of viral infections may be associated with astrocyte activation that is mediated by the interaction of the viral agent with toll-like receptor type 3 (TLR3). One of the most commonly used TLR3 ligands is polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C), which reproduces the effects of viral exposure at the cellular level. The aim of the study was to determine the nature of the effect of different concentrations of Poly I:C on the release of pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as markers of astrocyte activation – S100b protein and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in primary culture of rat

astroglia cells. The work was carried out on primary culture of brain astrocytes of newborn rats. Modeling of viral infection exposure was carried out using Poly I:C in the concentration range of 6.25–100 µg/ml. Cytokines (IL-1β, IL-6, IL-10) and astrocyte activation markers S100b and GFAP in cell culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Increased synthesis of proinflammatory cytokines IL-1β and IL-6 was detected in the Poly I:C dose range of 6.25–100 µg/mL and 25–100 µg/mL, respectively. A synchronous increase in the concentration of anti-inflammatory IL10 at low doses of ligand, as well as activation of astroglial protein S100b and GFAP production at Poly I:C doses of 6.25–12.5 µg/mL and suppression of astrogliosis with increasing ligand TLR3 concentration were shown. Thus, the dose-dependent nature of Poly I:C effects on astrocyte culture has been established.

Keywords: astrocytes, toll-like receptor type 3, astroglial proteins, Poly I:C.