High and Low MolecularWeight Hyaluronic Acid Differentially Influences Oxylipins Synthesis in Course of Neuroinflammation

**Гиалуроновая кислота с высокой и низкой молекулярной массой по-разному влияют на синтез оксилипинов при нейровоспалении**

Дмитрий В. Чистяков 1,2, \*, Алина А. Астахова 1, Надежда В. Азбукина 3, Сергей В. Горяинов 2, Виктор В. Чистяков 2 и Марина Г. Сергеева 1

1 Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, 119992 Москва, Россия

2 НИЦ РУДН Российский университет дружбы народов (РУДН), 117198 Москва, Россия

3 Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

\* Контакты: chistyakof@gmail.com; + 7-495-939-4332

Резюме: Гиалуроновая кислота (ГК), главный гликозаминогликан внеклеточного матрикса, выполняет клеточные сигнальные функции, которые зависят от ее молекулярной массы. Противовоспалительные эффекты для высокомолекулярной ГК (ВМГК) и провоспалительные эффекты для низкомолекулярной ГК (НМГК) эффекты были обнаружены для различных миелоидных клеток, включая микроглию. Астроциты – это клетки эктодермального происхождения, которые играют ключевую роль при воспалении мозга, но связь между ГК с разной молекулярной массой и воспалительным ответом в этих клетках не ясна. Мы тестировали влияния НМГК и ВМГК на первичные астроциты крыс, стимулированные Poly: IC (PIC, агонист TLR3) и липополисахаридом (LPS, агонист TLR4). Профили оксилипина измеряли с помощью анализа UPLC-MS/MS, при этом были обнаружены метаболиты HDoHE (докозагексаеновой кислоты), -HETE, простагландины (арахидоновой кислоты), DiHOME и HODE (линолевой кислоты). И ВМГК, и НМГК подавляли метаболизм полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), опосредованный циклооксигеназой. НМГК также снижала метаболизм жирных кислот, опосредованный липоксигеназой. Общий анализ данных показывает, что и НМГК, и ВМГК: 1) влияют сами на цитокины TNFаА, IL-6, IL-10, ферменты iNOS, COX-2 и уровни оксилипина во внеклеточной среде культивируемых астроцитов; 2) при долгосрочном применении вызывали клеточные адаптации; 3) модулируют пути передачи сигналов TLR4 и TLR3. Эффект ВМГК и НМГК преимущественно выявляли в TLR4- и TLR3-модулированных ответах, соответственно.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота; нейровоспаление; циклооксигеназа (СОХ-2); астроциты; эйкозаноиды; оксилипины; интерлейкин 10 (IL-10); толл-подобные рецепторы (TLR)

1. Введение

Гликозаминогликан гиалуроновая кислота (ГК) повсеместно присутствует во внеклеточном матриксе тканей позвоночных. ГК выполняет разнообразные биологические функции, включая регуляцию клеточной адгезии, пролиферацию клеток, диффузию питательных веществ и факторов роста, а также реакцию на повреждение и воспаление тканей благодаря своей способности взаимодействовать с различными рецепторами и другими элементами [1]. В последнее время биология ГК вызвала особый интерес из-за нового взгляда на роль внеклеточного матрикса в различных заболеваниях, таких как остеоартрит, фиброз, рак, генетические заболевания и различные патологии головного мозга [2]. Внеклеточный матрикс центральной нервной системы (ЦНС) составляет примерно 20% от всей ткани и представлен базальными мембранами, периневральными сетями и межклеточным матриксом [3]. По составу нервной системы внеклеточный матрикс уникален из-за отсутствия белковых компонентов, общих для периферических структур внеклеточного матрикса. ГК и протеогликаны являются основными структурными компонентами [3–6], которые образуют сложные сети и организуют гетерогенные популяции нейронов и глиальных клеток в высокоструктурированные функциональные единицы ЦНС. В настоящее время становится все более очевидным, что ГК не просто создает основу для клеточных компонентов ЦНС, но регулирует и настраивает молекулярные процессы, которые происходят на тканевом уровне, играя важную роль в поддержании гомеостаза нервной ткани [7]. Регуляция нейровоспаления имеет большое значение в широком диапазоне функций ГК.

Структура ГК довольно проста, она состоит из повторяющихся дисахаридных цепей N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты, которые различаются по длине, образуя, таким образом, формы ГК с низким молекулярным весом (НМГК, ср.мол.масса 10–500 кДа) и высоким (ВМГК, ср.мол.масса > 500 кДа) [8]. Несколько доказательных исследований указывают на то, что ГК позволяет модулировать воспаление в ЦНС. В ряде работ ремоделирование гиалуроновой кислоты связывают с нейровоспалением in vitro и in vivo [9–11]. Накопление ГК в очагах демиелинизированного рассеянного склероза, как было показано, усиливает воспаление за счет активации толл-подобных рецепторов (TLR) 2 и 4 в иммунных клетках, в то время как предотвращение этого накопления уменьшает повреждение в аутоиммунной модели энцефаломиелита [12]. Более того, было показано, что НМГК индуцирует пролиферацию астроцитов, главный этап реактивации глии [13], в то время как ВМГК подавляет образование глиальных рубцов [14]. Кроме того, ВМГК снижает продукцию IL-1, IL-6, TNFаА и оксида азота в клетках микроглии, подвергнутых воздействию липополисахарида (LPS) [15]. Примечательно, что микроглиальные клетки являются клетками иммунного происхождения, тогда как астроциты имеют эктодермальное происхождение и отличаются от миелоидных клеток по нескольким основным регуляторным функциям [16,17]. Важно отметить, что астроциты имеют широко развитую сигнальную систему TLR, включая TLR2, TLR4, TLR5, TLR3, CD44 [18,19]. Объединенные данные указывают на то, что ГК может представлять собой важный регулятор воспалительных процессов, достаточно мощный, чтобы инициировать, смягчать или точно настраивать ответы в центральной нервной ткани; тем не менее, этот вопрос еще предстоит изучить. В рамках данного исследования мы предположили, что и НМГК, и ВМГК могут инициировать и/или изменять воспалительные реакции, опосредованные астроглией. Чтобы проверить это предположение, мы получили смешанные глиальные культуры, обогащенные астроцитами, НМГК и ВМГК, с агонистами TLR3 и TLR4 или без них, и проанализировали экспрессию провоспалительного маркера TNFа, противовоспалительного маркера IL-10 и высвобождение липидных медиаторов, оксилипинов, участвующих в воспалении. Оксилипины – это липидные сигнальные молекулы, образующиеся в результате мультиферментных реакций, полученные в результате окисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) [20]. Показана их возможная роль в регуляции воспаления, но мало что известно об их участии в ГК-опосредованном клеточном ответе. Наши данные показывают, что как НМ, так и ВМ экзогенная ГК, усиливают синтез IL-10 на уровне белка и на уровне мРНК при стимуляции агонистами TLR3 и TLR4. В то же время ГК не влияет на экспрессию провоспалительного цитокина TNFа в LPS- и PIC-стимулированных клетках. Кроме того, тестируемая ГК выполняет различные действия по индуцированной стимулами экспрессии TNFа. Следовательно, исследуемые вещества не могут быть легко отнесены к про- или противовоспалительным модуляторам в астроцитах. Мы также обнаружили, что и ВМГК, и НМГК снижают синтез оксилипина, активируемый стимулами, посредством модуляции циклооксигеназного (COX) и липоксигеназного (LOX) путей метаболизма ПНЖК.

2. Результаты

2.1. Модуляция экспрессии провоспалительного цитокина TNFа в присутствии ВМГК и НМГК

Ранее мы показали, что стимуляция LPS (агонист TLR4) или PIC (агонист TLR3) индуцирует экспрессию TNFа в астроцитах [21]. Таким образом, мы оценили влияние вариации концентраций и времени обработки ВМГК и НМГК на LPS- и PIC-индуцированную экспрессию TNFа (рис. 1).

В первой серии экспериментов оценивали эффекты краткосрочного внесения ГК с различными концентрациями (рис. 1а, б). ГК добавляли в течение 30 минут, затем добавляли LPS (100 нг/мл) или PIC (10 мкг/мл) на 4 часа. Уровни мРНК TNFа в присутствии агонистов TLR без добавления ГК принимали за единицу. Мы обнаружили, что НМГК в концентрациях 10 и 100 мкг/мл подавляет LPS-индуцированную мРНК TNFа, в то время как ВМГК не влияет ни на одну из тестируемых концентраций (рис. 1a). Исследуемое внесение ГК не модулировало PIC-индуцированную мРНК TNFа (рис. 1b). На уровне белка эти эффекты ГК были заметны только в отношении индуцированной LPS активации в сочетании с 450 мкг/мл ВМГК (рис. 1c).

Вторая серия экспериментов позволила нам оценить влияние длительного (48 ч) присутствия ГК на LPS- или PIC-индуцированные ответы. В предварительных экспериментах мы оценили возможные изменения в морфологии астроцитов, подвергшихся воздействию ВМГК или НМГК в течение 48 часов с помощью флуоресцентной микроскопии, и не наблюдали видимых различий между клетками (Рис. S1). Мы также предположили возможность того, что формы ГК могли модулировать экспрессию мРНК TNFа в нестимулированных клетках в условиях, включающих краткосрочное и долгосрочное воздействие (рис. 1d). Кратковременная инкубация с НМГК или ВМГК индуцировала двукратное повышение экспрессии TNFа (рис. 1d). Длительная инкубация с обеими протестированными ГК не модулировала уровни мРНК TNFа, и клетки вернулись к исходным уровням мРНК TNFа (рис. 1d). После 48-часовой экспозиции с ГК культуральную среду меняли, и клетки стимулировали LPS (100 нг/мл) или PIC (10 мкг/мл) в течение 4 часов. Уровни мРНК TNFа в присутствии агонистов TLR без добавления ГК были приняты за единицу (рис. 1e, f). Долгосрочные инкубации с НМГК не влияли на LPS-индуцированную экспрессию мРНК TNFа (рис. 1e), но ингибировали PIC-индуцированную активацию транскрипта (рис. 1f), в то время как снижение уровней мРНК коррелировало со снижением уровней белка. (рис. 1c).

Чтобы оценить, являются ли эффекты НМГК и ВМГК на TNFа специфичными для этого цитокина, мы сравнили их влияние на экспрессию других воспалительных маркеров – iNOS (индуцибельная синтаза оксида азота), IL-6 (интерлейкин 6). Клетки обрабатывали 450 мкг/мл ВМГК или НМГК в тех же экспериментальных процедурах, что и для тестирования TNFа (рис. 1g, h). Модуляция экспрессии iNOS была такой же, как и для TNFа (рисунок 1g). Долгосрочные инкубации с ВМГК вызывают экспрессию LPS-индуцированного гена, тогда как длительные инкубации с НМГК снижают экспрессию PIC-индуцированного гена. Кратковременная инкубация с ВМГК снижала LPS-индуцированную экспрессию IL-6 (рис. 1h).

Объединенные данные показывают, что мы не можем приписать противовоспалительное действие ВМГК, а также не можем ссылаться на НМГК, как на провоспалительное вещество, поскольку оба протестированных варианта могут модулировать уровни экспрессии маркеров воспаления, и эти эффекты, по-видимому, могут быть зависимым от времени и задачи. Тем не менее, данные показывают, что гиалуроновые кислоты с разной молекулярной массой модулируют ответы астроцитов на стимуляцию агонистов TLR.

2.2. Модуляция экспрессии противовоспалительного цитокина IL-10 в присутствии ВМГК и НМГК

IL-10 представляет собой противовоспалительный цитокин, который индуцируется в астроцитах после стимуляции LPS или PIC [21,22]. Мы оценили влияние различных концентраций ВМГК и НМГК на LPS- и PIC-индуцированную экспрессию IL-10 (рис. 2). Краткосрочная (рис. 2а, b) или длительная (рис. 2d, е) инкубация с НМГК не влияли на LPS-индуцированную экспрессию мРНК IL-10. Кратковременное (рис. 2b) воздействие НМГК также не имело эффекта, в то время как длительное воздействие НМГК (рис. 2f) подавляло PIC-индуцированную экспрессию мРНК IL-10 для всех тестируемых концентраций. Кратковременное (рис. 2b) и долгосрочное (рис. 2f) воздействие ВМГК подавляло PIC-индуцированную экспрессию IL-10, тогда как только длительное воздействие ВМГК в концентрации 450 мкг/мл модулировало экспрессию мРНК IL-10 (Рисунок 2в, е). Обратите внимание, что, хотя обе протестированные формы ГК индуцировали TLR-опосредованное высвобождение IL-10 на уровне белка (рис. 2c), эффекты были слабыми, но статистически значимыми. Добавление ГК без агонистов TLR не влияло на высвобождение IL-10 (рис. 2d). Итак, обе протестированные формы ГК активировали экспрессию белка IL-10 TLR3- или TLR4-опосредованным образом.

2.3. Модуляция синтеза оксилипина ВМГК и НМГК

Помимо высвобождения про- и противовоспалительных цитокинов, ответы на воспалительные стимулы характеризуются синтезом оксилипина [23]. Оксилипины образуются из ПНЖК с помощью липоксигеназного (LOX), цитохромного P450 (CYP), циклооксигеназного (COX) путей или неферментативно [20,23,24]. Оксилипины оказывают огромное влияние на клеточные реакции, включая про- и противовоспалительное действие через специализированные рецепторы плазматической мембраны, ядерные рецепторы или другие механизмы [23,24]. Хотя многие оксилипины выделяются в низких концентрациях, их действие можно обобщить [25]. Недавнее развитие масс-спектрометрии позволяет анализировать профили оксилипина. Такие профили ранее не изучали для астроцитов, стимулированных TLR; таким образом, мы получили профили оксилипина для стимуляции LPS и PIC (рис. 3a). Данные представлены в виде тепловой карты, где горизонтальная ось указывает стимулы, а вертикальная ось указывает относительное количество каждого липидного медиатора по логарифмической шкале (ln).

Во внеклеточной среде астроцитов были получены производные арахидоновой кислоты (АК) через LOX (11-HETE, 12-HETE, 5-HETE), CYP (14,15-DHET, 19-HETE), COX (12-HHT, 6-кето-PGF1a, PGA2, PGE2, PGD2, PGF2a, TxB2) пути (рис. 3). Мы также измерили производные докозагексаеновой кислоты (ДГК), продуцируемые путями LOX (4-, 8-, 10-, 13-, 14-, 16-HDoHE) или путями CYP (20-HDoHE) (рис. 3). Насколько нам известно, это первые данные о TLR-опосредованном метаболизме ДГК в астроцитах. Хотя известно, что ДГК и АК высвобождаются различными изоформами фосфолипазы A2 в астроцитах [26], а LPS-индуцированное высвобождение ДГК в астроцитах [27], оксилипиновые профили метаболитов ДГК описаны не были. Удивительно, но были также пути производных линолевой кислоты (LA) LOX (9-, 13-HODE, 9-, 13-KODE) и CYP (9,10-DiHOME, 12,13-DiHOME) (рис. 3). Мы также измерили 17,18-DiHETE, производное эйкозапентаеновой кислоты (EPA), продуцируемое по пути CYP, но оно не модулировалось в нашем эксперименте (рис. 3a). Как LPS, так и PIC-стимуляция индуцировали метаболизм арахидоновой кислоты (АК) через путь COX (рис. 3a) и метаболизм докозагексаеновой кислоты (ДГК) через путь LOX (рис. 3a). TLR-опосредованный синтез производных АК через путь COX был показан ранее [20,28].

Хотя профили оксилипина при воздействии НМГК или ВМГК ранее не оценивались, была идентифицирована возможность связи между воспалением, опосредованным гиалуронаном, и метаболизмом арахидоновой кислоты через путь COX для моноцитов и макрофагов [29]; поэтому мы оценили наличие этой связи в астроцитах. Мы сравнили долгосрочное и краткосрочное влияние ГК на профили оксилипинов. В наших экспериментах были модулированы профили оксилипина, и эффекты различались для краткосрочного и долгосрочного применения как для НМГК, так и для ВМГК (рис. 3a). Интересно, что влияние краткосрочного воздействия ВМГК на такие метаболиты, как 12-HHT, PGF2а, 8-HDoHE, делает его сопоставимым с эффектами LPS или PIC (рис. 3a). Кроме того, влияние на 5-HETE сравнимо с ответом на взаимодействие с PIC. Для краткого и длительного взаимодействия влияние ВМГК различается, что указывает на возможность адаптации к действию ВМГК. НМГК также влияет на профиль оксилипинов, но менее выраженно (рис. 3a). Кратковременное применение НМГК индуцировало высвобождение PGF2а на уровне, сравнимом со стимуляцией LPS или PIC, также наблюдалось заметное снижение 14, 15-DHET и 16-HDoHE (рис. 3a). Опять же, долгосрочное применение НМГК обнаруживает изменение профилей оксилипина по сравнению с краткосрочным применением (рис. 3a). На следующем этапе мы проанализировали влияние ГК на LPS- и PIC-индуцированные профили оксилипина (рис. 3b). На рис. 3b количества оксилипинов, вызванные стимулом, были приняты за единицу, в то время как изменения (по сравнению с индуцированными стимулами) каждого обнаруженного вещества представлены в виде натурального логарифма (ln) (рис. 3b). Мы обнаружили, что НМГК модулирует путь LOX, и эффекты усиливаются при длительном воздействии (рис. 3b), причем обе протестированные формы ГК снижают путь COX, активированный LPS или PIC (рис. 3b).

2.4. Модуляция экспрессии циклооксигеназы 2 (COX-2) ВМГК и НМГК

Влияние ГА на профили оксилипина, стимулированных PIC (рис. 3b), позволяет предположить влияние COX-2, ключевого фермента синтеза простагландинов, после воспалительной стимуляции. Ранее мы показали, что COX-2 является основным ферментом, ответственным за LPS- и PIC-индуцированный синтез соответствующих веществ в астроцитах [28,30]. Поэтому мы проанализировали модуляцию LPS- и PIC-индуцированной экспрессии ЦОГ-2 ВМГК и НМГК в условиях краткосрочного и длительного воздействия (рис. 4). Мы обнаружили, что тестируемые формы ГК не влияли на LPS-индуцированную экспрессию COX-2, в то время как наблюдалось значительное снижение PIC-стимулированной экспрессии COX-2 в клетках, подвергшихся воздействию НМГК или ВМГК (рис. 4). Данные, касающиеся экспрессии белка COX-2, коррелировали с паттернами синтеза оксилипина (рис. 3b). Это показывает влияние ГК на синтез TLR-опосредованного простагландина в астроцитах посредством модуляции метаболического пути COX-2.

3. Обсуждение

Наши данные показывают, что как НМГК, так и ВМГК: 1) непосредственно влияют на уровни цитокинов и оксилипинов во внеклеточной среде культивируемых астроцитов, 2) индуцируют клеточную адаптацию при долгосрочном применении, 3) модулируют пути передачи сигналов TLR4 и TLR3. Эффекты ВМГК и НМГК преимущественно выявляются в ответах, выражаемых TLR4 и TLR3, соответственно.

Хорошо известно, что большинство свойств ГК зависит от величины молекулярной массы. ВМГК (>1000 кДа) оказывает противовоспалительное действие, а НМГК проявляет провоспалительные свойства [12,31–34]. Таким образом, сама ГК и биоматериалы на основе ГК нашли успех в широком спектре биомедицинских приложений, при лечении воспалений и заживление ран в дерматологии, ортопедии, при артрите и в офтальмологии [12]. Несмотря на физиологическую значимость ГК, молекулярные механизмы ее действия до сих пор не ясны. Исследования с участием ГК и TLR-опосредованной активации передачи сигналов сложны из-за неразборчивости ГК для нескольких рецепторов клеточной поверхности, корецепторов и связанных белков. ГК может связывать рецептор опосредованной гиалуронаном подвижности, TLR2, TLR4, CD44 и молекулу межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), модуляцию комплексов рецептора с TLR4-MD-2, CD44 или CD14 [1,15]. Принято считать, что ГК опосредует свои эффекты, блокируя индукцию воспалительной передачи сигналов через внеклеточный механизм [1].

В ЦНС ВМГК подавляет пролиферацию астроцитов [13,14], тогда как ГК-зависимая активация TLR2 на незрелых олигодендроцитах имеет значение для ремиелинизации в случае рассеянного склероза [35]. Влияние НМГК и ВМГК на TLR-опосредованные клеточные ответы астроцитов ранее описано не было. Поэтому мы сравнили их влияние на две основные ветви клеточных ответов: высвобождение цитокинов и синтез оксилипина. Мы использовали два протокола внесения ГК – на 30 мин (кратковременный) и на 48 часов (длительный) до стимуляции агонистами TLR в течение 4 часов. Долгосрочная экспозиция выявляет возможное участие механизмов обратной связи, которые позволяют клеткам адаптироваться к первоначальному ответу, который можно оценить в протоколе краткосрочного применения. Мы обнаружили, что кратковременное применение ВМГК индуцировало добавление мРНК TNFа, а также усиливало LPS-опосредованную экспрессию TNFа как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Длительное применение ВМГК также индуцировало LPS-опосредованную экспрессию мРНК TNFа. Обратите внимание, что эффекты наблюдаются при 10 мкг/мл и 450 мкг/мл, но не при 100 мкг/мл. Такая концентрационная зависимость в клеточных ответах обычно отражает множественные механизмы действия веществ. В пользу множественных механизмов реализации эффектов ГК также указывает то, что 10 мкг/мл ВМГК потенцировали PIC-опосредованную экспрессию TNFа. Кроме того, длительное применение ВМГК с концентрацией 450 мкг/мл индуцировало LPS-опосредованную экспрессию мРНК IL-10, что позволяет подозревать, что точки соединения этой концентрации влияют на LPS-опосредованную индукцию TNFа и IL-10, возможно, на уровне NF-kB, как было показано ранее [36]. ВМГК также снижала PIC-посредованную экспрессию мРНК IL-10. Кроме того, ВМГК модулирует метаболизм оксилипина, скорее всего, не как противовоспалительное вещество. В то время как ВМГК в основном влияет на LPS-опосредованные ответы астроцитов, НМГК влияет на PIC-опосредованные ответы. Она уменьшала опосредованную агонистами экспрессию TNFа и IL-10 после длительной инкубации, снижала экспрессию COX-2 и снижала метаболизм оксилипинов. Эти данные показывают необычное воздействие ГК на TLR-опосредованную передачу сигналов в астроцитах по сравнению с другими типами клеток. Наши данные касаются особых регуляторных элементов в астроцитах, а также более сложной связи между ГК и TLR-опосредованными клеточными ответами. Имеется лишь несколько данных о ГК-модуляции TLR3-опосредованных ответов. Было показано, что присутствие олиго-ГК подавляет PIC-индуцированное высвобождение IL-6 и экспрессию мРНК TNFа в макрофагах, тогда как сигнальный путь TLR4 участвует в проявленных эффектах ГК [37]. Наши данные согласуются с этим предположением, поскольку только длительное воздействие НМГК приводило к подавлению PIC-индуцированной экспрессии TNFа.

При оценке влияния НМГК и ВМГК на профили оксилипина мы также выявили некоторые особенности чувствительности астроцитов к НМГК и ВМГК по сравнению с макрофагами и микроглией. Действительно, ранее было показано, что НМГК активирует экспрессию COX-2 и продукцию PGE2 в моноцитах человека через путь TLR4/MYD88 [29], в то время как ВМГК подавляет LPS-индуцированную экспрессию COX-2 и продукцию PGE2 в макрофагах U937 посредством подавления NF-kB [38]. Мы обнаружили сходство между НМГК и ВМГК в астроцитах. Не было никакого влияния на LPS-индуцированную экспрессию COX-2, но наблюдалось значительное снижение PIC-стимулированной экспрессии COX-2, что сопровождалось изменениями в синтезе оксилипина. Важно отметить, что это первое исследование влияния ГК на профили оксилипина, и многие обнаруженные метаболиты все еще не описаны в условиях модуляции функции астроцитов. Ранее производные АК были более-менее протестированы на астроцитах, и в настоящее время обсуждается возможность кооперативного действия различных метаболитов [25]. Тем не менее, имеющиеся данные позволяют сделать вывод, что и НМГК, и ВМГК модулируют метаболизм оксилипинов через все три ветви (COX, LOX, CYP). Тестируемые ГК не только модулируют TLR-опосредованный синтез оксилипина, но также обладают собственными эффектами, когда их добавляют отдельно. Этот вывод согласуется с данными длительного применения, которые выявляют изменения в профилях оксилипина.

Воспалительный ответ обычно называют иммунным процессом, инициируемым на уровне клеточных групп при изменениях гомеостаза, вызванных инвазией патогенов бактериального, грибкового, простейшего или вирусного происхождения, стерильными повреждениями или значительным дисбалансом метаболических профилей [39]. Ранее воспалительный ответ приписывали клеткам иммунного происхождения, то есть клеткам микроглии в ткани мозга [15]. Важным результатом исследований молекулярных механизмов, лежащих в основе воспаления, было то, что воспалительный ответ – это не специализированная функция клеток гемопоэтического происхождения (макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты и т. д.), но скорее всего, фундаментальный атрибут всех типов клеток. Действительно, воспалительная активация астроцитов причастна к различным заболеваниям ЦНС, включая рассеянный склероз, деменцию, связанную с вирусом иммунодефицита человека, болезни Альцгеймера и Паркинсона [40]. Таким образом, понимание специфики регуляции воспалительного ответа важно для разработки терапевтических подходов к лечению этих патологий. Наши результаты позволяют еще раз подчеркнуть специфику процессов врожденного иммунитета в астроцитах. Мы продемонстрировали связь между ГК и TLR-опосредованными ответами в астроцитах. Эта связь довольно сложна и включает механизмы, которые позволяют модулировать про- и противовоспалительные цитокины и синтез оксилипина с участием метаболической ветви COX арахидоновых кислот и липоксигеназной ветви метаболизма ДГК. Точные молекулярные механизмы этой связи являются предметом дальнейших исследований, но нет никаких сомнений в том, что ГК, как в низкомолекулярной, так и в высокомолекулярной формах, играет важную роль в сигнальном пути TLR в астроцитах, хотя эта роль не просто анти-воспалительного типа для ВМГК или провоспалительного для НМГК.

4. Материалы и методы

4.1. Реагенты

Липополисахарид (LPS) (Sigma-Aldrich, каталожный номер L2630 Сент-Луис, Миссури, США), Poly I: C (PIC) (каталожный номер tlrl-pic, InvivoGen, Сан-Диего, Калифорния, США) стрептомицин-пенициллин (каталожный номер A063), трипсин (каталожный номер P037), ЭДТА, фетальная бычья сыворотка (каталожный номер BS-110/500) производства ПанЭко (Москва, Россия). Питательная среда Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) (каталожный номер 21885-025) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Гиалуроновая кислота с высоким молекулярным весом (1,01–1,8 МДа, ВМГК) (гиалуронат натрия по каталогу ГК15M-1) и гиалуроновая кислота с низким молекулярным весом (41–65 кДа, НМГК) (гиалуронат натрия по каталогу ГК40K-1) были получены от Lifecore biomedical (Миннесота, США). Антитела против COX-2 (Cell Signaling Technology, D5H5, каталожный номер 12282, Данверс, Массачусетс, США) и β-тубулина (Sigma Chemicals, Тауфкирхен, Германия), вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (антикроличьи, антимышиные и антикозьи) (SCBT и CST), субстрат для вестерн-блоттинга ECL (Thermo Fisher Scientific, каталожный номер 32209, Уолтем, Массачусетс, США) и наборы для ELISA для TNFа (каталожный номер KRC3012) и IL-10 (кат. № BMS629) (InvivoGen, Сан-Диего, Калифорния, США). Стандарты оксилипинов были следующими: тетранор-PGEM-d6 (каталожный номер 314840), 6-кето PGF1a-d4 (каталожный номер 315210), TXB2-d4 (каталожный номер 319030), PGF2a-d4 (кат. № 316010), PGE2-d4 (№ по каталогу 314010), PGD2-d4 (№ по каталогу 312010), лейкотриен (LT) C4-d5 (№ по каталогу 10006198), LTB4-d4 (№ по каталогу 320110), 5(S)-HETE-d8 (каталожный номер 334230), 12 (S)-HETE-d8 (каталожный номер 334570), 15(S)-HETE-d8 (каталожный номер 334720), PAF C16-d4 (каталожный номер 10010229), олеоилэтаноламид-d4 (каталожный номер 9000552), PGA2-d4 (каталожный номер 310210) Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Картридж Oasis PRIME HLB (60 мг, 3 см3, каталожный номер 186008056) были получены от Waters, Эшборн, Германия.

4.2. Первичная клеточная культура

Клетки были получены от одно- или двухдневных крысят линии Вистар. Все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с руководящими принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, и были одобрены Комитетом по биоэтике (Протокол 2/13 от 8 апреля 2013 г.) Биологического факультета МГУ. Культуры первичных астроцитов крыс получали от новорожденных крыс обоего пола, как было описано ранее [28]. Вкратце, мозг обезглавленных детенышей промывали ледяным раствором Пака (137,0 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,44 мМ KH2PO4, 0,3 мМ Na2HPO4 и 5,5 мМ глюкозы, pH 7,4) и растирали с нейлоновыми сетками с порами 250 и 136 мкм в последовательном порядке. Диссоциированные клетки помещали в культуральные колбы площадью 75 см2 при плотности 6х105 клеток на мл. Затем клетки культивировали в среде DMEM (1 г/л D-глюкозы, 10% бычьей эмбриональной сыворотки [FBS], 50 единиц/мл стрептомицина, 50 мкг/мл пенициллина) при 37°C и 10% CO2. После пяти дней культивирования в DMEM культуральную среду заменяли свежей средой, и колбы помещали в шейкер со скоростью 200 об/мин на 4 часа для диссоциации клеток микроглии. Среду, содержащую микроглию, отбрасывали и выращивали обогащенные астроцитами культуры в течение следующих четырех дней, среду заменяли каждые два дня. Затем клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором, отделяли от пластика раствором трипсин-EGTA, помещали в шестилуночные планшеты и выдерживали в течение двух дней в среде DMEM. После этого среду заменяли средой того же состава и использовали клетки для экспериментов. Стимуляцию LPS проводили на мужских и женских астроцитах (100 нг/мл, 4 ч). Дозировка LPS была выбрана на основании наших предыдущих исследований [16,41]. В предварительных исследованиях выполняли анализ МТТ - (3-[4-диметилтиазол-2-yl]-2,5-дифенилтетразолий бромид) (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в соответствии с протоколом производителя для ВМГК и анализ токсичности НМГК (рис. S2). Вкратце, астроциты после обработки ГК высевали в 96-луночные планшеты. После культивирования в стандартных условиях астроциты инкубировали с ВМГК (450 г/мл) и НМГК (450 г/мл). Через 48 часов в каждую лунку добавляли 10 мкл раствора МТТ (5 мг/мл в PBS), а затем инкубировали еще 4 часа. Затем супернатант сливали и в каждую лунку добавляли 100 мкл DMSO, встряхивая планшеты в течение 10 мин. Для определения оптической плотности использовали планшетный ридер Synergy H4 (BioTek, Winooski, VT, США) при 570 нм.

4.3. Измерение относительного уровня экспрессии РНК

Общую мРНК выделяли с использованием набора для очистки РНК GeneJET (Thermo Scientific, WaltГКm, MA, США). Концентрацию РНК измеряли с помощью прибора Implen NanoPhotometer C. кДНК получали согласно инструкциям производителя с использованием набора MMLV RT (Евроген, Москва, Россия) с олиго-(dT)-праймерами. ПЦР в реальном времени проводили с использованием смеси 5x PCR-HS-SYBR (Евроген, Москва, Россия) и амплификатора DTlite 4 (DNATechnology, Москва, Россия). Последовательности праймеров ПЦР, использованные в этом исследовании, были следующими: β-актин: прямой 5'-TCATCACTATCGGCAATGAGCGGT-3', обратный 5'ACAGCACTGTGTTGGCATAGAGGT3'; TNFа: прямой 5'-CAAGGAGGAGAAGTTCCCAA-3' обратный 5'-TGATCTGAGTGTGAGGGTCTG-3'; IL-10: прямой 5'-CCCAGAAATCAAGGAGCATTTG-3', обратный 5'-TCATTCTTCACCTGCTCCAC-3'; IL-6 прямой 5'-CTGGTCTTCTGGAGTTCCGT-3', обратный 5'-TGGTCTTGGTCCTTAGCCAC-3', iNOS прямой 5'-CCACAATAGTACAATACTACTTGG-3', обратный 5'-ACGAGGTGTTCAGCGTGCTCCACG-3' температура отжига составляла 57°C. Экспрессию каждого гена измеряли в реакциях объемом 25 мкл с использованием кДНК, синтезированной из 70 нг РНК на реакционную лунку. Относительный уровень экспрессии мРНК определяли методом ΔСϒ. В качестве конститутивного гена для нормализации использовали ген β-актина. За единицу принимали уровень нормализованной экспрессии гена в контрольных клетках или в стимулированных клетках (указанный непосредственно в тексте).

4.4. Вестерн-блот анализ

Астроциты лизировали в модифицированном буфере радиоиммунопреципитации (RIPA) (50 мМ Tris, pH 7,4, 1% NP-40 Sigma Chemicals, 0,25% Na-дезоксихолат, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ Na3VO4, 1 мМ NaF) и коктейле ингибиторов протеаз (Roche Molecular Biochemicals, Маннхейм, Германия). Концентрацию белка определяли стандартным методом Брэдфорда. Образцы, содержащие 20 г белка в обычном буфере Лэммли, загружали на каждую дорожку 10%-го полиакриламидного геля додецилсульфата натрия и подвергали стандартному SDS-PAGE. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,2 мкм. Мембраны блокировали в 10% растворе Rotiblock (Roth, Нюрнберг, Германия) в течение 1 часа, а затем обрабатывали фосфатно-солевым раствором с 0,05% Tween 20 с соответствующим первичным антителом - анти-COX-2 (1:2000) при 4°C на всю ночь. Вторичные видоспецифические антитела (Dianova, Гамбург, Германия) применяли в концентрации 1:10,000 в течение 1 ч при комнатной температуре. Конъюгаты визуализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата SuperSignal — West Femta (Thermo Scientific). Для анализа β-тубулина мембраны очищали при 21°C в течение 20 мин с помощью буфера для стриппинга RestoreWestern Blot (Pierce, Бонн, Германия). Мембраны повторно зондировали антителом против β-тубулина (1: 10,000) от Sigma Chemicals и вторичным антимышиным IgG (Dianova, Гамбург, Германия) для контроля белковой нагрузки. Полосы белка визуализировали с помощью хемилюминесцентного субстрата SuperSignal-West Pico (Thermo Scientific). Денситометрию проводили в четырех различных экспериментах. Интенсивность полосы измеряли с использованием калиброванного сигнала денситометра GS-800 и программного обеспечения Quantity One (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США) и нормализовали по интенсивности соответствующих полос, полученных для β-тубулина.

4.5. Иммунофлуоресцентный анализ

Астроциты высевали на чашки Петри со стеклянным дном в количестве 105 клеток/ёмкость и оставляли для прикрепления в течение 12 часов. После смены среды клетки оставляли еще на 24 часа и использовали в экспериментах, как описано в другом месте. Срезы с клетками, фиксированными в 4% параформальдегиде, забуференном PBS, обрабатывали Triton X-100, содержащим буфер, блокировали FBS и затем инкубировали на ночь с первичными антителами против GFAP (1: 2000). Вторичные антитела к Alexa, полученные от коз, использовали в следующих разведениях: Alexa 488 против кролика 1: 1000. Отрицательный контроль включал инкубацию астроцитов только с вторичными антителами. В отрицательных контролях не наблюдалось значительного окрашивания. Изображения представляют три независимых эксперимента. Изображения были получены с помощью Axiovert.A1 HBO50 (Zeiss, Геттинген, Германия), оснащенного программным обеспечением для микроскопии ZEN 2.3. Изображения обрабатывали с помощью программы ImageJ (1.51s) (Национальный институт здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, США).

4.6. Анализ методом UPLC-MS/MS и подготовка образцов

После экспериментов супернатант собирали и хранили при -70°C для дальнейшего анализа. Бесклеточные культуральные среды были взяты для твердофазной липидной экстракции (картридж Oasis® PRIME HLB (60 мг, 3 см3)). Половина мл приготовленного образца загружали в колонку и промывали 1 мл 0,1% муравьиной кислоты и 1 мл 15% метанола. Затем картриджи элюировали с 500 мкл метанола и 500 мкл ацетонитрила, а затем растворитель выпаривали в слабом потоке азота. Липидные медиаторы анализировали с помощью UPLC-MS/MS серии 8040 (Shimadzu, Киото, Япония) со всеми спецификациями, установленными, как было описано ранее [25]. Количественная оценка и квалификация выполнялись в режиме мониторинга множественных реакций, и масс-спектрометр работал с разрешением единицы массы как для ионов предшественника, так и для ионов продукта. Для работы с масс-спектрометром использовали пакет программ Lipid Mediator Version 2 (Shimadzu, Япония). Медиаторы были разделены на основе их химических свойств в UPLC, затем мы контролировали их ионные фрагменты с помощью диссоциации, вызванной столкновением, в сочетании с ионизацией электрораспылением - MS/MS. Липиды были идентифицированы в соответствии с точным m/z, временем удерживания, относительным временем удерживания видов в том же классе и спектрами МS/МS. Для количественного анализа оксилипинов все образцы исследовали с помощью LC-МS/МS для измерения площадей пиков обнаруженных видов. Чтобы компенсировать колебания интенсивности MS во время различных прогонов, площади пиков каждого отдельного вида липидов корректировали с помощью дейтерированных внутренних стандартов. Концентрация липидов была нормализована к общему белку и выражалась в пг/мг. Общий белок определяли методом Брэдфорда.

4.7. Определение TNFа и IL-10 с помощью иммуноферментного анализа

После экспериментов супернатанты собирали и хранили при -70°C для дальнейшего анализа. Уровни высвобожденного TNFа и IL-10 определяли с использованием коммерческих наборов для иммуноферментного анализа и планшет-ридера Synergy H4 (BioTek, Winooski, VT, USA), следуя инструкциям производителя.

4.8. Анализ экспериментальных данных и статистика

Данные выражены в виде среднего +/- SEM. Нормальность наборов данных оценивалась с помощью теста Шапиро-Уилка. Данные были подвергнуты одностороннему дисперсионному анализу с последующим апостериорным тестом Бонферрони для определения статистической значимости. Условие p<0,05 считалось статистически значимым. Все эксперименты повторяли не менее трех раз.

Дополнительные материалы можно найти на http://www.mdpi.com/1422-0067/20/16/3894/с1.

Вклад авторов: A.A.A., M.G.S., D.V.C. и Н.В.А. задумали и спланировали эксперименты; D.V.C. и Н.В.А. провели эксперимент ELISA, культивирование клеток астроцитов и экстракцию липидов из среды; N.V.A. выполнил анализ qPCR и проанализировал данные; D.V.C., S.V.G. и V.V.C. выполнили анализ МС; А.А.А. и M.G.S. написал статью; D.V.C. и Н.В.А. оказали помощь в написании и корректуре.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда, грант № 18-74-00069 (клеточные эксперименты, ПЦР и вестерн-блот-анализ) и исследовательский проект РФФИ № 18-34-20100 (анализ оксилипинов и разработка метода МС).

Благодарности: Авторы выражают признательность Центру доклинических клинических исследований РУДН «Программа 5-100» за их услуги по анализу UPLC/MS/MS.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

|  |
| --- |
| Сокращения |
| ГК | Гиалуроновая кислота  |
| ВМГК | ГК с высокой молекулярной массой, высокомолекулярная ГК |
| НМГК | ГК с низкой молекулярной массой, низкомолекулярная ГК |
| TLR  | Toll-подобный рецептор |
| LPS  | Липополисахарид |
| TNFа | Фактор некроза опухоли альфа (TNFα) |
| COX -2 | Циклооксигеназа-2 |
| ДГК, DHA | Докозагексаеновая кислота  |
| АК, AA | Арахидоновая кислота |
| IL-10 | Интерлейкин-10 |
| iNOS  | Индуцибельная синтаза оксида азота  |
| IL-6 | Интерлейкин 6 |
| +/- SEM | Стандартное отклонение, деленное на квадратный корень от размера выборки (прим.пер.) |
| PIC, Poly:IC | Сополимер полиинозиновой и полицитидиловой кислот (прим.пер.) |
| UPLC-MS/MS | Жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (прим.пер.) |

Иллюстрации



Рис. 1. Эффекты низкомолекулярной ГК (LMW) и высокомолекулярной ГК (HMW) на экспрессию TNFα при стимуляции агонистами TLR3 и TLR4. Астроциты предварительно обрабатывали в течение 0,5 ч (краткосрочный) или 48 ч (долгосрочный) с LMW (10, 100, 450 мкг/мл) и HMW (10, 100, 450 мкг/мл), затем липополисахаридом (LPS) (100 нг/мл) или Poly: IC (PIC) (10 мкг/мл) на 4 часа. Относительные уровни мРНК TNFα определяли с помощью ПЦР в реальном времени, данные были нормализованы по уровням мРНК β-актина. Результаты в (a, b, e, f) представлены как кратные изменения TNFα по сравнению с LPS или PIC-стимулированными клетками без обработки HA. Результаты в (d) представлены как кратные изменения TNFα по сравнению с необработанными клетками. (c) Концентрации TNFα измеряли с помощью ELISA в супернатанте из образцов с длительным (белые столбцы) и коротким (черные столбцы) HMW (450 мкг/мл) и LMW (450 мкг / мл) предварительной обработкой HA с последующими LPS и PIC. стимуляция в течение 4 ч. Результаты в (c) представлены как кратные изменения TNFα по сравнению с клетками, стимулированными LPS или PIC. Результаты в (g, h) представлены как кратные изменения уровней мРНК iNOS и IL-6 по сравнению с клетками, стимулированными LPS или PIC. Значения представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка среднего из трех независимых экспериментов, проведенных в трех экземплярах. \* p <0,05 по сравнению со стимулированными клетками (a, b, c, e, f), \* p<0,05 по сравнению с нестимулированными



Рис. 2. Влияние низкомолекулярной (LMW) и высокомолекулярной (HMW) гиалуроновой кислоты (HA) на экспрессию IL-10 при стимуляции агонистами TLR3 и TLR4. Астроциты предварительно обрабатывали в течение 0,5 или 48 часов HMW (10,100 или 450 гмл) и LMW (10,100 или 450 гмл), отдельно или в комбинации с LPS (100 нгмл) или PIC (10 гмл). мл) в течение 4 ч. Относительные уровни мРНК IL-10 определяли с помощью ПЦР в реальном времени, данные были нормализованы по уровням мРНК -актина. Результаты в (a, b, e, f) представлены как кратные изменения IL-10 по сравнению с LPS или PIC-стимулированными клетками. Результаты в (d) представлены как кратные изменения IL-10 относительно контрольных клеток. (c) Концентрации IL-10 измеряли с помощью ELISA в супернатантах от образцов с длительным (белые столбцы) и коротким (черные столбцы) HMW (450 гмл) и LMW (450 гмл) предварительной обработкой HA. стимуляцией LPS или PIC в течение 4 часов. Результаты в (c) представлены как кратные изменения IL-10 относительно контрольных клеток. Значения представляют собой среднее стандартное отклонение от трех независимых экспериментов, проведенных в трех экземплярах. \* p <0,05 по сравнению со стимулированными клетками (a, b, e, f), \* p<0,05 по сравнению с нестимулированными клетками в (c, d).



Рис. 3. Тепловая карта производства оксилипина для липидных медиаторов, производных n-6 и n-3 жирных кислот. (a) Астроциты обрабатывали гиалуроновой кислотой с высокой молекулярной массой (HMW, 450 гмл) и гиалуроновой кислотой с низким молекулярным весом (LMW, 450 гмл) в течение 0,5 или 48 часов и LPS (100 нгмл). ) или PIC (10 гмл) в течение 4 ч. Концентрации оксилипинов в супернатантах измеряли с помощью UPLC-MSMS. На тепловой карте показаны относительные количества каждого липидного медиатора по сравнению с контролем. Горизонтальная ось указывает стимулы, а вертикальная ось указывает относительное количество (ln) каждого липидного медиатора. (b) Астроциты предварительно обрабатывали в течение 0,5 или 48 часов HMW (HMW, 450 гмл) и (LMW, 450 гмл) HA, а затем стимулировали LPS (100 нгмл) или PIC (10 гмл) в течение 4 ч. На тепловой карте показаны относительные количества (ln) каждого липидного медиатора по сравнению с клетками, стимулированными LPS и PIC, соответственно. Значения представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов. Метаболиты были разделены на: липоксигеназный (LOX), циклооксигеназный (COX) и цитохромный (CYP) пути, участвующие в их синтезе.



Рис. 4. Влияние низкомолекулярной (LMW) и высокомолекулярной (HMW) гиалуроновой кислоты (HA) на экспрессию COX-2 при стимуляции агонистами TLR3 и TLR4. (a, b) Астроциты предварительно обрабатывали в течение 0,5 или 48 часов HMW (10, 100 или 450 гмл) и (10, 100 или 450 гмл) отдельно или в комбинации с LPS (100 нгмл). или ПОС (10 гмл) в течение 4 ч. Уровни белка СОХ-2 оценивали с помощью вестерн-блоттинга и нормализовали по контрольной нагрузке - тубулину. (б) Пример представляет три независимых эксперимента. Значения представляют собой среднее значение +/- SEM из трех независимых экспериментов, проведенных в трех экземплярах. \* p <0,05 по сравнению со стимулированными клетками (PIC или LPS).