

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

На правах рукописи

Астахова Алина Анатольевна

**ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ АСТРОЦИТОВ ПРИ ИХ ОДНОКРАТНОЙ И ПОВТОРНОЙ
СТИМУЛЯЦИЯХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА - 2017

Работа выполнена в отделе биокинетики НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель:

Доктор химических наук

Сергеева Марина Глебовна

Официальные оппоненты:

Горбачева Любовь Руфэлевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, доцент МГУ имени М.В. Ломоносова, биологического факультета, кафедры физиологии человека и животных, лаборатории общей физиологии и регуляторных пептидов,

Гуляева Людмила Фёдоровна, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск,

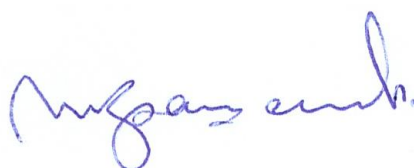
Фуралёв Владимир Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории инженерной энзимологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук.

Защита состоится 20 апреля 2017 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.01. по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальностям 03.01.03 – молекулярная биология (биологические науки) Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д.1, стр. 12, биологический факультет, ауд. 389.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайте www/bio.msu.ru.

Автореферат разослан _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Воспалительный ответ является частью системы врожденного иммунитета и представляет собой фундаментальный механизм защиты организма от нарушения гомеостаза, вызванного механическими травмами или инвазией патогенов. Однако, активация воспаления неизбежно приводит к неспецифическим повреждениям собственных структур организма. Этот факт объясняет взаимосвязь между воспалением и разнообразными хроническими патологиями: в результате исходного повреждения активируется воспаление, которое в свою очередь становится источником последующих повреждений в организме. Подобные нарушения протекания воспалительного процесса были показаны для многих заболеваний мозга: рассеянного склероза, болезней Альцгеймера, Паркинсона, механических травм. В связи с этим актуальной задачей современных исследований становится выявление механизмов, регулирующих запуск, развитие и завершение врожденного иммунного ответа.

Важную роль в регуляции воспаления в ЦНС играют глиальные клетки - астроциты и микроглия. Эти клеточные популяции обладают иммунной компетентностью различной природы. Микроглиальные клетки происходят из клеток гематопоэтического ряда (как и клетки иммунной системы), в то время как астроглия берет начало в эктодермальном зачатке. В связи с этим, иммунным свойствам астроцитов длительное время не уделялось внимания, их рассматривали только в качестве вспомогательных клеток центральной нервной системы, участвующих в метаболизме нейронов и формировании гематоэнцефалического барьера. Накопленные к настоящему времени данные позволяют утверждать, что врожденная иммунная защита является не менее значимой функцией астроглии. Астроциты активно вовлечены в воспалительный ответ и при нарушении его протекания могут вносить существенный вклад в повреждение нервной ткани в ходе нейродегенеративных состояний. Эти данные обуславливают интерес к астроцитам, как к клеткам, участвующим в процессах врожденного иммунитета и ставят вопрос о возможности направленной регуляции их иммунных свойств.

На уровне организма (*in vivo*), а также для клеток иммунной системы в опытах *in vitro* показано изменение характера протекания ответа на действие провоспалительного стимула при повторных стимуляциях. Показано как явление увеличения чувствительности к действию агониста (прайминг), так и снижение чувствительности (толерантность).

В данной работе был поставлен вопрос о том, как соотносятся процессы развития воспалительного ответа (провоспалительные процессы) и процессы завершения воспаления

в астроглиальных клетках в условиях однократной провоспалительной стимуляции и повторных провоспалительных обработок. В работе использовали первичные культуры клеток астроцитов мозга крыс. Воспалительный ответ моделировали добавлением LPS, который, как было показано ранее, активирует Толл-подобный рецептор 4 и соответствующий клеточный воспалительный ответ в астроцитах. Для выяснения молекулярных механизмов регуляции были выбраны гены-маркёры: циклооксигеназа 2 (COX-2) и TNF α – гены, стимулирующие развитие воспалительного ответа, а также интерлейкин 10 (IL10) – ген, отвечающий за активацию противовоспалительного ответа, важного для поддержания гомеостаза.

Для клеток иммунной системы, в первую очередь макрофагов, наиболее охарактеризованными на молекулярном уровне являются следующие регуляторные элементы сигнальных путей: 1) MAP киназы (в первую очередь p38 MAPK) и фактор транскрипции NF- κ B, которые активно участвуют в регуляции экспрессии провоспалительных генов; 2) MKP-1, антагонист p38, участник регуляторного цикла «киназа-фосфатаза»; 3) система посттранскрипционной регуляции экспрессии генов через контроль стабильности мРНК, ключевыми факторами которой является пара белков TTP и HUR, из которых TTP ускоряет, а HUR замедляет деградацию мРНК генов, вовлеченных в развитие воспалительного ответа. На астроцитах относительно хорошо были охарактеризованы изменение сигнального пути TLR-4, регуляция p38 MAPK и фактора NF- κ B, однако изменения воспалительного ответа при повторных стимуляциях исследованы не были. Возможность регуляции воспалительного ответа на астроцитах с участием цикла киназа-фосфатаза p38-MKP-1 и регуляцию через деградацию мРНК с помощью пары TTP-HUR ранее не исследовали.

Цель и задачи исследования

Цель данной работы – выявить молекулярные механизмы ответов астроцитов, развивающихся при однократной и повторной стимуляциях липополисахаридом.

Задачи включали:

1. Охарактеризовать влияние однократной стимуляции LPS на высвобождение маркеров воспаления (TNF α , COX-2) и маркера противовоспалительных процессов IL10;
2. Проанализировать участие фосфатазы MKP1 в регуляции MAP киназы p38 при однократной стимуляции LPS.
3. Охарактеризовать влияние однократной стимуляции LPS на экспрессию мРНК и белков TTP и HUR и выявить механизмы их регуляции в астроцитах;

4. Охарактеризовать влияние двукратной стимуляции LPS на воспалительный ответ астроцитов и выявить молекулярные механизмы регуляции экспрессии COX-2 и IL10 в этих условиях.

Научная новизна работы и положения, выносимые на защиту

Результаты проведенных исследований являются для науки новыми, имеют теоретическую и практическую значимость. Полученные данные показывают механизмы регуляции IL10 – важного молекулярного посредника в разрешении воспаления. Представляется значимым, что эти механизмы проанализированы при одновременном сопоставлении с регуляцией провоспалительного гена COX-2. Полученные данные показывают общность путей про- и противовоспалительной регуляции, роль которых изменяется для про- и противовоспалительных путей в зависимости от рассматриваемой фазы воспалительного ответа и условий его развития.

Положения, выносимые на защиту:

1. В условиях однократной стимуляции LPS регуляцию экспрессии провоспалительного гена COX-2 и противовоспалительного гена IL10 на ранних этапах воспалительного ответа обуславливают одинаковые механизмы, в частности: каскад MAP киназ и фактор транскрипции NF-κB.

2. Регуляция воспалительного ответа астроцитов имеет принципиальные отличия от регуляции воспаления в классических иммуннокомпетентных клетках – клетках миелоидного и лимфоидного происхождения: 1) фосфатаза MKP1 не активируется в ответ на воздействие LPS, т.е. не формируется классическая регуляторная связь между MAP киназами p38 и JNK и фосфатазой MKP1; 2) под воздействием LPS не происходит изменение экспрессии на уровне белка ARE-связывающих факторов TTP и HUR, хотя при этом в астроцитах, как и в других исследованных клетках наблюдается выход белка HUR из ядра и увеличение экспрессия TTP на уровне мРНК.

3. Повторные стимуляции LPS приводят к изменению интенсивности ответа генов COX-2 и IL10 на провоспалительные воздействия и разобщению механизмов регуляции экспрессии рассматриваемых генов. В частности, NF-κB сохраняет роль отрицательного регулятора для экспрессии IL10 в условиях повторных стимуляций клеток LPS, однако для COX-2 приобретает функции отрицательного регулятора экспрессии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные раскрывают механизмы регуляции IL10 – важного молекулярного посредника в разрешении воспаления, а также демонстрируют общность

регуляции про- и противовоспалительных процессов на ранних этапах воспалительного ответа в астроглиальных клетках. Полученные данные могут быть использованы для разработки более эффективных подходов в лечении состояний, связанных с воспалением в центральной нервной системе, использованы в рамках профильных спецкурсов при составлении лекций или семинарских занятий, посвященных междисциплинарным вопросам на стыке нейробиологии и иммунологии.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на международных конференциях «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» в г. Пущино в 2015 и 2013 г.; «Nuclear receptors: Linking molecules, genomes & physiology» в г. Сорренто (Италия) в 2013 г.; «3rd European lipidomics meeting», Пардубице (Чехия), 2013 г.; «Alternative Strategies against Cancer and Inflammation» Бангкок (Тайланд). 2012.

Личный вклад автора

Представленные в работе результаты были получены самим автором или под его непосредственным руководством. Личный вклад автора заключается в планировании работы, постановке цели и задач исследований, планировании экспериментальных процедур, направленных на решение поставленных задач, проведении экспериментов, получении первичных данных, их обработке, анализе, обобщении полученных результатов и формулировке выводов.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых международных и отечественных журналах, входящих в перечень ВАК РФ и 5 материалов отечественных и международных конференций. Публикации в рецензируемых журналах подтверждают достоверность полученных результатов.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, 4 глав и списка цитируемой литературы из 222 наименований. Работа изложена на 126 страницах машинописного текста и включает 27 рисунков и 3 таблицы.

Список сокращений: COX-2: циклооксигеназа 2; IL10 – интерлейкин 10; LPS: липополисахарид; PGE₂: простагландин E₂; TNF α : фактор некроза опухоли альфа.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные культуры первичных астроцитов получали из мозгов неонатальных крысят, до начала экспериментальных процедур клетки культивировали в течение 14 дней. Для создания условий однократной воспалительной стимуляции к клеткам добавляли LPS в концентрации 100 нг/мл или в иной концентрации, как указано в эксперименте. В рамках модели повторных стимуляций LPS добавляли на 46 часов, далее клетки 2 часа инкубировали в свежей порции среды и стимулировали в соответствии с протоколами экспериментов, что указано в подписях к рисункам. Для анализа экспрессии генов на уровне мРНК использовали метод ПЦР в режиме реального времени, для анализа изменения экспрессии генов на уровне белка применяли методы иммуноблоттинга или иммуноферментного анализа. Для анализа активности COX-2 измеряли высвобождение PGE₂ посредством иммуноферментного анализа. Анализ скорости деградации мРНК проводили посредством анализа уровней мРНК соответствующих генов после обработки клеточных культур актиномицином Д. Визуализацию клеточных культур проводили с использованием протоколов иммуноцитохимического маркирования белков и нуклеиновых кислот с последующей детекцией маркеров посредством лазерной сканирующей микроскопии. Все измерения воспроизводили на трех культурах, полученных в разное время от разных крысят. Для анализа дифференциальной экспрессии генов в глиомах был использован массив с данными о полногеномной транскрипции, доступный базе GEO под идентификационной записью GSE16011, который содержит информацию об уровнях экспрессии генов в образцах опухолевой ткани у 276 больных и 8 образцах здорового мозга. Данные были ранее подготовлены к анализу Ивлиевым А.Е. и доступны для скачивания на www.lipidomics.ru. Список участников и регуляторов пути толл-подобных рецепторов был составлен на основе данных KEGG, ресурса <http://www.sabiosciences.com> и опубликованных данных. Поиск дифференциально экспрессирующихся генов был проведен в приложении MeV (TM4) с использованием теста Стьюдента с коррекцией Бонферрони для множественного сравнения ($p < 0,0033$ для попарных сравнений трех групп). Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Характеристика острого воспалительного ответа в астроцитах

Для определения времени, оптимального для анализа клеточного ответа астроциты стимулировали LPS 100 нг/мл в течение разных промежутков времени. Получено, что через

2 ч стимуляции наблюдается изменение экспрессии COX-2 на уровне белка, который достигал максимального уровня в промежутке между 12 и 24 часами и превышал значения исходного уровня вплоть до точки равной 72 часам после стимуляции. Временная точка равная 4 часам выбрана для оценки активации воспалительного ответа (рис. 1А). Для выявления зависимости между концентрацией LPS и экспрессией COX-2 клетки стимулировали LPS в концентрациях 0,1; 1; 10; 100 и 1000 нг/мл в течение 4 часов. На уровне белка минимальной концентрацией LPS, для которой отмечали эффект индукции экспрессии COX-2, была концентрация 10 нг/мл (рис. 1А). Концентрация LPS 100 нг/мл вызывала примерно 3х кратное усиление экспрессии COX-2 и по силе эффекта не отличалась от воздействия LPS в концентрации 1000 нг/мл. Получено, что стимуляция астроглиальных клеток LPS (100 нг/мл, 4 ч) приводила к усилению выброса PGE₂ примерно в 5 раз, а также индуцировала экспрессию мРНК и белка TNF α примерно в 350 и в 750 раз соответственно, усиливала экспрессию мРНК и белка IL10 примерно в 130 и в 80 раз соответственно (рис. 1В, Г). Таким образом, ранние этапы клеточного ответа астроцитов на LPS можно охарактеризовать как провоспалительный процесс, однако уже в это время начинается синтез противовоспалительных веществ. Это означает, что уже на ранних этапах воспаления активны процессы регуляции противовоспалительных механизмов.

Помимо изменения экспрессии COX-2, TNF α , IL10 и выброса PGE₂ стимуляция клеток LPS приводила к усилению экспрессии фосфорилированных форм JNK и p38. Уровни фосфорилированных киназ JNK и p38 превышали контрольные показатели спустя 4 часа после стимуляции, что указывает на то, что активация MAP киназ в астроглиальных культурах имеет затяжной характер, что может быть связано с особенностями поведения фосфатаз (рис. 1Д).

Главным отрицательным регулятором p38 MAP киназ считают белок MKP1 (DUSP1), однако ранее взаимосвязь p38 MAP киназы и MKP1 не была исследована. Поэтому мы проанализировали экспрессию белка MKP1 в астроцитах при обработке клеток LPS (100 нг/мл) в течение разных периодов времени. Уровень экспрессии оценивали методом иммуноблоттинга. Также была проведена оценка влияния на уровень фосфорилирования p38 триптолида – вещества, которое используют в качестве ингибитора MKP1. Астроциты обрабатывали триптолидом в диапазоне концентраций от 0,1 до 1000 нг/мл без или с добавлением LPS 100 нг/мл в течение 1,5 часов. Однако и в этом случае не было выявлено изменения в уровнях экспрессии белка MKP1 или фосфорилированной формы p38. Эти результаты указывают на то, что MKP1 не вовлечен в отрицательную регуляцию p38 в астроцитах в ходе воспалительного ответа.

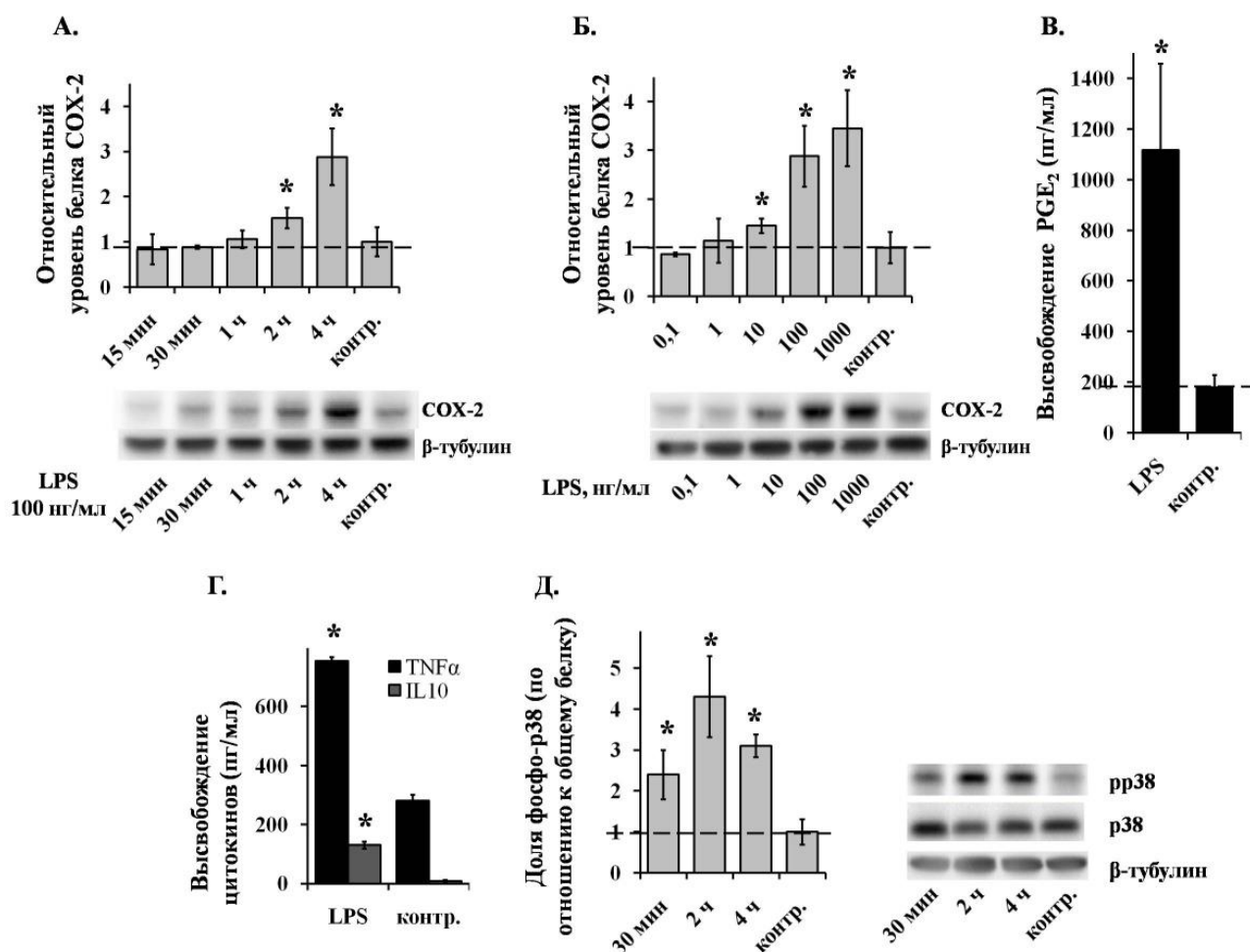


Рис. 1. Влияние LPS на экспрессию маркеров воспаления в астроцитах. Астроциты стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение разных промежутков времени (приведены в подписях оси абсцисс) (А, Д), в течение 4 часов (В, Г) или LPS в разных концентрациях (приведены в подписях оси абсцисс) в течение 4 часов (Б). Далее посредством иммуноблоттинга определяли уровни экспрессии белков COX-2, фосфорилированного или общего белка p38. Уровни белка в не подвергнутых стимуляции клетках (контроль) приняты за 1. Концентрации высвобожденных IL10, TNFα или PGE₂ определяли посредством иммуноферментного анализа, используя супернатант клеточных культур. *p < 0,05 по сравнению с не стимулированными клетками.

2. Сравнение механизмов регуляции экспрессии COX-2 и IL10 в условиях острого воспаления.

Было предположено, что контроль экспрессии IL10 в астроцитах в ходе воспалительного ответа осуществляют те же механизмы, которые регулируют экспрессию COX-2. Были выделены следующие возможные блоки регуляции 1) активность MAP киназ p38 и JNK (были использованы ингибиторы SB203580 и SP600125); 2) фактор транскрипции NF-κB (был использован ингибитор Bay 11-7085); 3) ядерный рецептор PPARγ (были использованы агонист рецептора росиглитазон и антагонист GW9662).

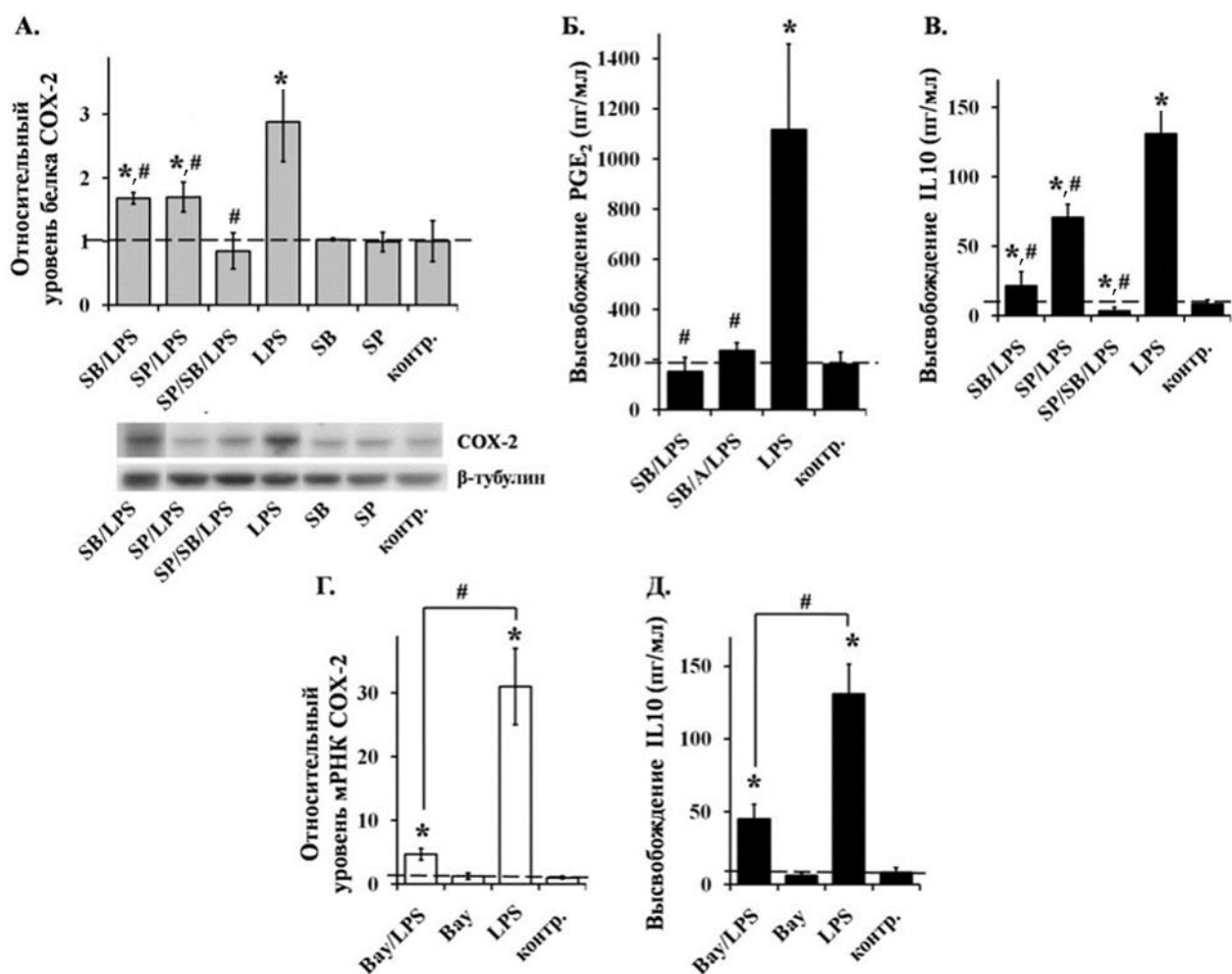


Рис. 2. Влияние SB203580, SP600125 и LPS на экспрессию и активность COX-2, высвобождение IL10. Астроциты стимулировали SB203580 (SB, 20 мкМ, 30 мин до LPS), SP600125 (SP, 10 мкМ, 30 мин до LPS), Bay 11-7085 (Bay, 5 мкМ, 30 мин до LPS, LPS (100 нг/мл, 4 часа) или их комбинациями. Посредством иммуноблоттинга определяли уровни экспрессии белка COX-2 (А), посредством иммуноферментного анализа определяли уровни высвобождения PGE₂ (Б) или IL10 (В, Д). Посредством ПЦР в режиме реального времени определяли уровни экспрессии мРНК COX-2 (Г). Все эксперименты проводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками, # $p < 0,05$ по сравнению с клетками, стимулированными только LPS. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

Обработка клеток SB203580 (ингибитором MAPK p38) и SP600125 (ингибитором JNK) приводила к подавлению индукции COX-2 под воздействием LPS. При этом добавление ингибиторов по отдельности частично снижало экспрессию COX-2 (примерно в 2 раза от величины, наблюдаемой при обработке клеток LPS без добавления ингибиторов). Совместное добавление веществ полностью блокировало рост экспрессии COX-2. Данные эффекты подтвердились также на уровне выброса клетками PGE₂. Добавление ингибиторов p38 и JNK оказывало сходное влияние и на экспрессию IL10. Добавление ингибитора NF- κ B приводило к снижению уровней COX-2 и IL10, индуцируемых LPS. Активация или подавление PPAR γ не влияли на экспрессию COX-2 и IL10. Таким образом, полученные

данные указывают на то, что в индукцию экспрессии COX-2 и IL10 в ходе воспалительного ответа вовлечены общие механизмы: MAP киназы и NF-κB (рис. 2).

3. Экспрессия и регуляция TTP и HUR в ходе воспалительного ответа

Известно, что регуляция клеточных воспалительных ответов через модуляцию скорости деградации мРНК играет значимую роль в клетках иммунного происхождения, но роль этого механизма в воспалительных ответах астроцитов остается неизученной.

На первом этапе мы проанализировали экспрессию компонентов сигнальных каскадов TLR в глиомах методами биоинформатики. Клеточную основу глиом составляют перерожденные глиальные клетки. Из литературы известно, что воспалительные процессы играют важную роль в неблагоприятном прогнозе развития заболевания. Для анализа изменений экспрессии генов из массива GSE16011 нами были выбраны данные по полногеномной экспрессии генов в образцах: i) здорового мозга (контроль); ii) опухолей с наиболее благоприятным прогнозом; iii) опухолей с наихудшим прогнозом. Проведен анализ дифференциальной экспрессии генов между группами. Получено, что из 148 генов, которые были включены в список участников каскадов TLR, 117 были изменены либо в образцах обеих групп глиом по сравнению с контролем, либо в одной из групп глиом по сравнению с контролем; либо между группами глиом. Анализ полученных данных позволил сделать заключения: 1) в группе опухолей с относительно неблагоприятным прогнозом наблюдается повышение экспрессии CD14 и TLR рецепторов (гены TLR1-8) по сравнению с группой опухолей с относительно благоприятным прогнозом; 2) для многих компонентов сигнальных каскадов TLR наблюдается более выраженное изменение экспрессии при переходе от контроля к группе с благоприятным прогнозом и далее к группе с неблагоприятным прогнозом, при этом не имеет значения, понижается (как, например, для генов TOLLIP, NFKB1 и др.) или повышается (для генов MyD88, IRAK1 и др.) экспрессия в опухолях. Полученные результаты согласуются с представлениями о специфическом участии сигнального пути TLR рецепторов в развитии глиом различной степени тяжести.

Анализ дифференциальной экспрессии HUR и TTP продемонстрировал, что экспрессия мРНК HUR не была изменена в обоих классах глиом по сравнению с контролем, а экспрессия мРНК TTP выросла примерно в 3,2 раза в классе глиом с неблагоприятным прогнозом (продолжительность жизни менее 1 года после операции), что может указывать на особенности регуляции системы контроля скорости деградации мРНК в тканях, состоящих из глиальных клеток. Стоит отметить, что в состав глиом помимо перерожденных клеток астроглиального происхождения также входят клетки миелоидного и лимфоидного происхождения. В связи с этим встает вопрос, насколько процессы изменения системы

регуляции стабильности мРНК соотносятся с собственно опухолевыми клетками? Для поиска ответа на этот вопрос, мы решили экспериментально проверить, как влияет провоспалительная стимуляция на изменение стабильности ARE-содержащей мРНК, кодирующей COX-2, и как изменяется экспрессия HUR и TTP на уровне белка в опухолевых клетках линии С6.

Получено, что стимуляция клеток LPS существенно изменяет стабильность мРНК COX-2: в условиях без добавления LPS время полужизни молекулы (то есть, время, после которого в клетке остается не более 50% от исходной мРНК COX-2) составило примерно 1,2 часа, а после добавления провоспалительного стимула возросло до приблизительно 1,8 часа (рис. 3). Однако, нам не удалось выявить изменений в экспрессии HUR или TTP при стимуляции клеток LPS в течение 4 часов. Таким образом, в опухолевых клетках линии С6 провоспалительная стимуляция вызывает изменение стабильности ARE-содержащих мРНК, однако не влияет на экспрессию на уровне белка ключевых регуляторов этой системы – белков HUR и TTP.

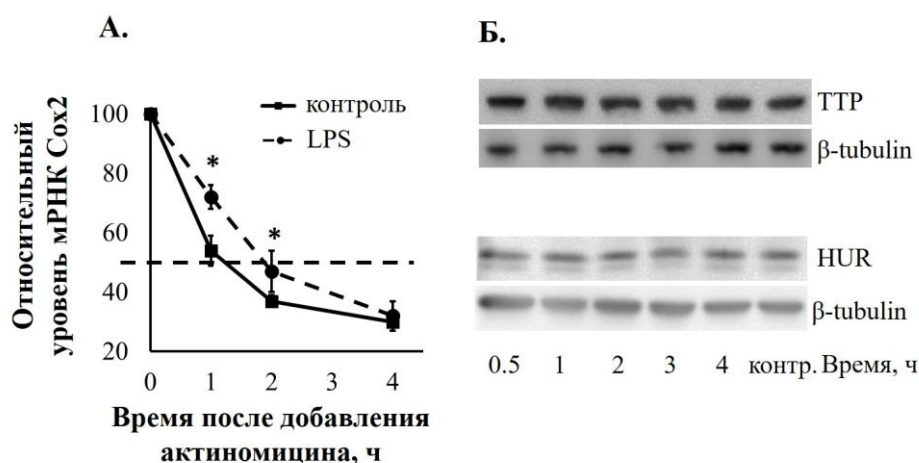


Рис. 3. Изменение стабильности мРНК COX-2 и изменение экспрессии TTP и HUR в опухолевых клетках С6 под воздействием LPS.

(А) Клетки С6 культивировали без дополнительных обработок (контроль, черная сплошная линия), или с добавлением LPS (1000 нг/мл) на 1 час (пунктирная линия). Затем клетки обрабатывали актиномицином Д (5 мкг/мл). Через указанные промежутки времени образцы собирали и уровни экспрессии мРНК COX-2 определяли методом ПЦР в реальном времени. За 100% в каждом случае принят уровень экспрессии мРНК для клеток, не обработанных актиномицином, но стимулированных LPS (пунктирная линия) или в клетках, не подвергнутых стимуляции (контроль). * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками. (Б) клетки стимулировали LPS (1000 нг/мл) в течение указанных периодов времени, после чего собирали лизаты клеток и согласно протоколам иммуноблоттинга измеряли относительную экспрессию белков TTP и HUR в образцах. Контрольные культуры не подвергались стимуляции LPS.

Далее мы сосредоточили внимание на первичных астроцитах и проанализировали экспрессию генов HUR и TTP на уровне мРНК через 1 и 4 часа после стимуляции клеток LPS

(100 нг/мл). Результаты показали, что уровни мРНК ТТР в культурах астроцитов после 1 часа стимуляции эндотоксином превышали контрольные приблизительно в 15 раз, в то время как через 4 ч уровни экспрессии ТТР были повышены примерно в 7 раз по отношению к контролю (не стимулированным клеткам). Далее был проведен анализ зависимости экспрессии мРНК ТТР от концентрации LPS в диапазоне концентраций от 0,1 до 1000 нг/мл. Показано, что концентрация эндотоксина, равная 0,1 нг/мл, уже стимулировала двукратное увеличение экспрессии ТТР, а концентрации в диапазоне 1-1000 нг/мл вызывали увеличение экспрессии примерно в 8 раз и не различались между собой по величине эффекта. Указанные концентрации LPS не приводили к изменению экспрессии HUR (рис. 4).

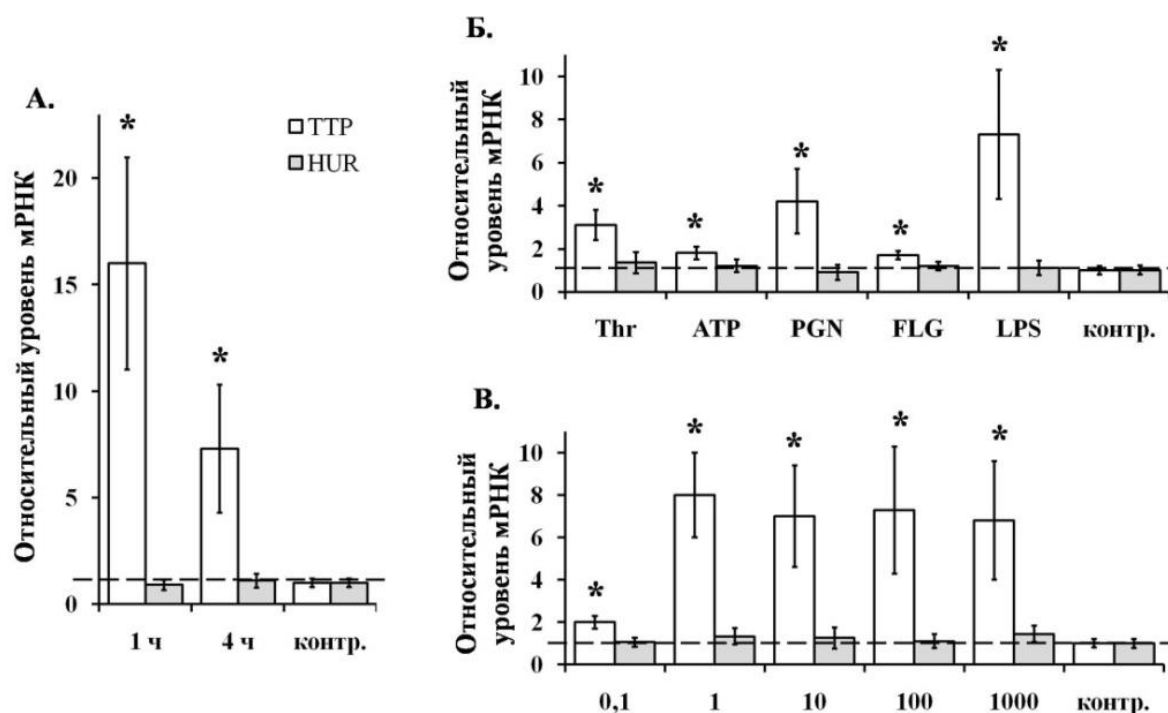


Рис. 4. Влияние LPS, тромбина, АТФ, пептидогликана, и флагеллина на экспрессию мРНК ТТР и HUR. (А) Клетки обрабатывали LPS в концентрации 100 нг/мл в течение 1 или 4 часов. (Б) Астроциты инкубировали 4 часа с агонистами Толл-подобных рецепторов: липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл, TLR4); пептидогликаном (PGN, 5 мкг/мл, TLR1/2) и флагеллином (FGL, 5 мкг/мл, TLR5), с TLR-независимыми провоспалительными стимуляторами: тромбином (Thr, 1 ед/мл) или АТФ (ATP, 10 нМ) (В) Астроциты стимулировали LPS в разных концентрациях (0,1, 1, 10, 100 и 1000 нг/мл) в течение 4 часов. Посредством ПЦР в режиме реального времени определяли уровень мРНК. Уровень мРНК в контрольных клетках принят за 1. Все эксперименты воспроизводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками.

Известно, что в регуляции экспрессии ТТР и HUR в клетках миелоидного происхождения задействован белок p38. Поэтому мы проверили, как изменится экспрессия мРНК генов при добавлении к клеткам активатора или ингибитора фосфорилирования p38. Действительно, анизомицин (активатор p38) усиливал экспрессию мРНК ТТР примерно в 45

раз и экспрессию HUR в 3 раза. Этот эффект существенно снижался при добавлении к клеткам SB203580 – до 8 раз для TTP и в 1,8 раз для HUR в культурах с совместным добавлением анизомицина и SB203580. Примечательно, добавление SB203580 отдельно снижало экспрессию TTP примерно на 25% от уровня в контрольных образцах, но не влияло на уровень экспрессии HUR. Эти результаты указывают на возможное участие фосфорилированного белка в регуляции фоновой экспрессии тристетрапролина.

MAP киназа p38 является ключевым регулятором скорости деградации мРНК содержащих ARE-последовательности. Примечательно, что HUR и TTP являются не только участниками, но также и мишенями системы регуляции ARE-содержащих мРНК. Известно, что транскрипты TTP и HUR содержат ARE-последовательности и могут связываться с белками TTP и HUR. Поэтому далее мы проверили, как изменяется скорость деградации мРНК TTP и HUR в условиях стимуляции клеток LPS. Для определения скорости деградации мРНК клетки обрабатывали актиномицином Д в течение 30 минут, 1 часа, 2 часов, 4 часов. Кривые уровней мРНК строили для следующих культур: 1) астроциты без дополнительных обработок (скорость деградации мРНК в контрольных клетках); 2) астроциты, обработанные LPS (100 нг/мл) в течение 1 часа (скорость деградации мРНК в условиях воспаления); 3) астроциты, обработанные SB203580 и LPS 100 нг/мл. Получено, что уровень мРНК TTP изменялся более, чем в пять раз (менее 20% от исходного) уже через 30 минут после добавления к клеткам актиномицина Д (период полужизни составлял около 10 минут). Обработка клеток LPS увеличивала уровень транскрипта до 40% через 30 минут после добавления актиномицина Д (время полужизни примерно 25 минут), однако ингибирование p38 снимало этот эффект. Таким образом, полученные результаты указывают на высокую скорость деградации мРНК TTP в астроцитах и усиление стабильности транскрипта в условиях воспалительного ответа в p38-зависимой форме (рис.5А).

В отличие от TTP, HUR имеет гораздо более стабильные транскрипты. Действительно, уровень мРНК HUR падал до 50% только через 3 часа после добавления актиномицина. Добавление к клеткам LPS усиливало стабильность мРНК – период полужизни составлял более 4 часов. Как и в случае с TTP, добавление SB203580 снимало эффект LPS (рис.5Б).

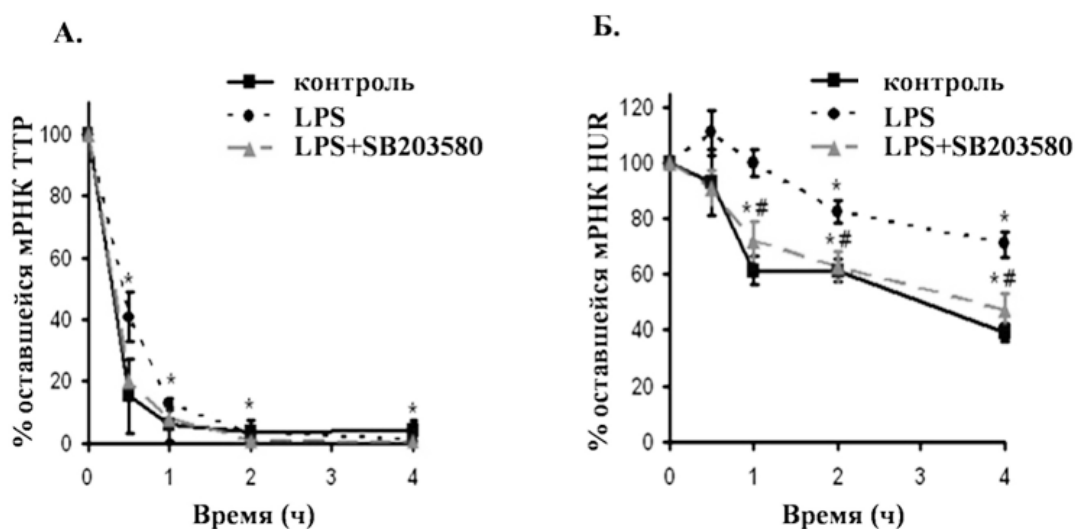


Рис. 5. Влияние ингибирования p38 MAPK и добавления LPS на скорость деградации мРНК ТТР и HUR. Астроциты культивировали без дополнительных обработок (контроль, черная сплошная линия), с добавлением LPS (100 нг/мл) на 1 час (пунктирная линия) или обрабатывали ингибитором SB203580 (ингибитор MAPK p38, 20 мкМ) и липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) (серая линия). Затем клетки обрабатывали актиномицином Д (5 мкг/мл). Через указанные промежутки времени образцы собирали и уровни экспрессии мРНК ТТР и HUR определяли методом ПЦР в реальном времени. За 100% в каждом случае принят уровень экспрессии мРНК ТТР и HUR для клеток, не обработанных актиномицином, но стимулированных LPS (пунктирная линия), SB203580 и LPS (серая линия) или в астроцитах, не подвергнутых стимуляции (контроль). Все эксперименты воспроизводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками, # $p < 0,05$ по сравнению с клетками, стимулированными LPS.

Следующим шагом в данной работе было проследить изменение экспрессии ТТР и HUR на уровне белка. Астроциты инкубировали с LPS (100 нг/мл) в течение разных периодов времени и уровни экспрессии белков анализировали посредством иммуноблоттинга. Эксперименты не показали изменение экспрессии белков ТТР и HUR в течение 4 часов. В то же время, было получено, что использование LPS в концентрации 1000 нг/мл вызывало усиление экспрессии белка HUR, однако не влияло на уровень белка ТТР.

Известно, что одним из уровней регуляции активности HUR является контроль локализации белка. Для проверки вовлеченности этого уровня регуляции в контроль активности HUR в астроцитах, обработанных LPS, мы проанализировали внутриклеточную локализацию белка через 15 и 60 минут после стимуляции. Получено, что плотность иммуномаркирования ядер антителом против HUR заметно снижалась спустя 60 минут после добавления LPS.

Таким образом, ТТР и HUR активно регулируются на уровне мРНК в астроглиальных клетках в условиях моделируемого воспалительного ответа, однако ключевым механизмом регуляции этих факторов на уровне белка является изменение локализации HUR.

4. Характеристика ответа астроцитов на двукратную стимуляцию LPS

Развитие ответа врожденного иммунитета оказывает влияние на реакцию организма на последующие провоспалительные стимуляции. Это влияние отражается в изменении чувствительности отдельных ветвей сигнальных каскадов иммунного ответа. На уровне экспрессии это выражается в усилении («сенситизации») или подавлении («толеризации») при второй стимуляции экспрессии маркеров воспаления, в том числе TNF α , IL6, COX-2. Изменение воспалительного ответа при двукратной стимуляции было ранее показано для астроцитов, однако молекулярные механизмы исследованы не были. В связи с этим мы поставили вопросы, как предшествующая стимуляция влияет на иммунный ответ астроглиальных клеток на последующие стимулы, какие механизмы регулируют экспрессию генов при втором контакте клеток с воспалительным стимулом.

Мы использовали модель двукратной стимуляции астроглиальных клеток. Первый стимул был представлен эндотоксином, концентрация которого варьировала от 0,1 до 100 нг/мл. Продолжительность первой стимуляции была выбрана равной 46 часам. В качестве второй стимуляции использовали добавление LPS в концентрации 100 нг/мл на 4 часа или на другой период, что указано в описании эксперимента. Общая схема обработок в рамках моделей острого воспалительного ответа (ответа на однократную обработку) и ответа астроцитов на двукратные стимуляции приведена на рис.6.



Рис. 6. Схема стимуляции и обозначений. Схема представляет обобщение протоколов обработок клеток и поясняет краткие обозначения моделей, использованные далее в тексте и подписях к иллюстрациям. Эксперимент проводился в 6-луночных планшетах и чашках Петри. В рамках модели двукратной стимуляции клетки культивировали в присутствии LPS (стимуляция №1), в условиях модели острого воспаления (однократной стимуляции) и в контрольных образцах клетки культивировали в среде без эндотоксина. Далее производили смену среды (во всех случаях на среду без LPS) и через 2 часа клетки обрабатывали в соответствии со схемами экспериментов. Обозначения обработок построены по схеме «концентрация LPS при стимуляции №1 (нг/мл) /Сокращенные обозначения модуляторов/концентрация LPS при стимуляции №2 (нг/мл)».

В первую очередь мы проанализировали влияние продолжительной провоспалительной стимуляции на последующую активацию экспрессии COX-2 на уровне белка в астроцитах. Клетки инкубировали с LPS в концентрациях 0,1, 1 (подпороговые концентрации), 10 (низкая концентрация) и 100 нг/мл в течение 46 часов. После этого культуры стимулировали LPS в концентрации 100 нг/мл, далее посредством иммуноблоттинга анализировали уровни экспрессии COX-2. Клетки, стимулированные однократно (0/100), использовали как положительный контроль, не подвергнутые стимуляции клетки (0/0) использовали как отрицательный контроль. Получено, что длительная обработка клеток LPS в концентрациях 0,1 и 1 нг/мл (0,1/100 и 1/100) не приводила к изменению уровня экспрессии COX-2 в ответ на повторную стимуляцию по сравнению с культурами, однократно стимулированными LPS в концентрации 100 нг/мл в течение 4х последних часов эксперимента (0/100). В то же время, уровни COX-2, наблюдаемые в культурах, предварительно обработанных LPS в концентрациях 10 и 100 нг/мл (10/100 и 100/100), заметно превышали уровни, наблюдаемые в образцах культур положительного контроля (0/100). Тем не менее, повышенные уровни COX-2 были выявлены и в клетках, стимулированных LPS в концентрациях 10 и 100 нг/мл в течение 46 часов без второй стимуляции (10/0 и 100/0 по сравнению с 0/0), что указывает на накопление белка в астроглиальных клетках в течение длительной стимуляции.

Концентрация PGE₂ оказалась повышенной во всех проанализированных образцах (10/100, 10/0, 100/100 и 100/0) по отношению к обоим проанализированным контролям: отрицательному (0/0) и положительному (0/100). В целом, полученные результаты указывают на то, что длительная обработка клеток LPS во всех использованных концентрациях не подавляла синтез белка COX-2 и выброс PGE₂ при повторной обработке клеток эндотоксином (рис. 7). Таким образом, толеризации провоспалительного ответа на уровне экспрессии и активности COX-2 нами выявлено не было.

Далее мы сосредоточили внимание на анализе изменений клеточного воспалительного ответа в рамках модели двукратной стимуляции 10/100 как наиболее близкой к описанным в литературе моделям и имеющей клиническую перспективность. Для более детального понимания изменения воспалительного ответа мы проанализировали изменение экспрессии мРНК COX-2, мРНК и белка TNF α и IL10. Получено, что предварительная инкубация астроглиальных клеток с эндотоксином снижала уровень мРНК COX-2 и TNF α , индуцируемый повторной обработкой LPS. Для TNF α подавление экспрессии удалось проследить также на уровне белка. В то же время показано усиление экспрессии IL10 на уровне мРНК и белка в условиях модели 10/100 по сравнению с моделью 0/100 (530 \pm 96 против 130 \pm 20 пг/мл соответственно). То есть, длительная

провоспалительная стимуляция усиливает интенсивность экспрессии IL10 в ответ на повторную стимуляцию.

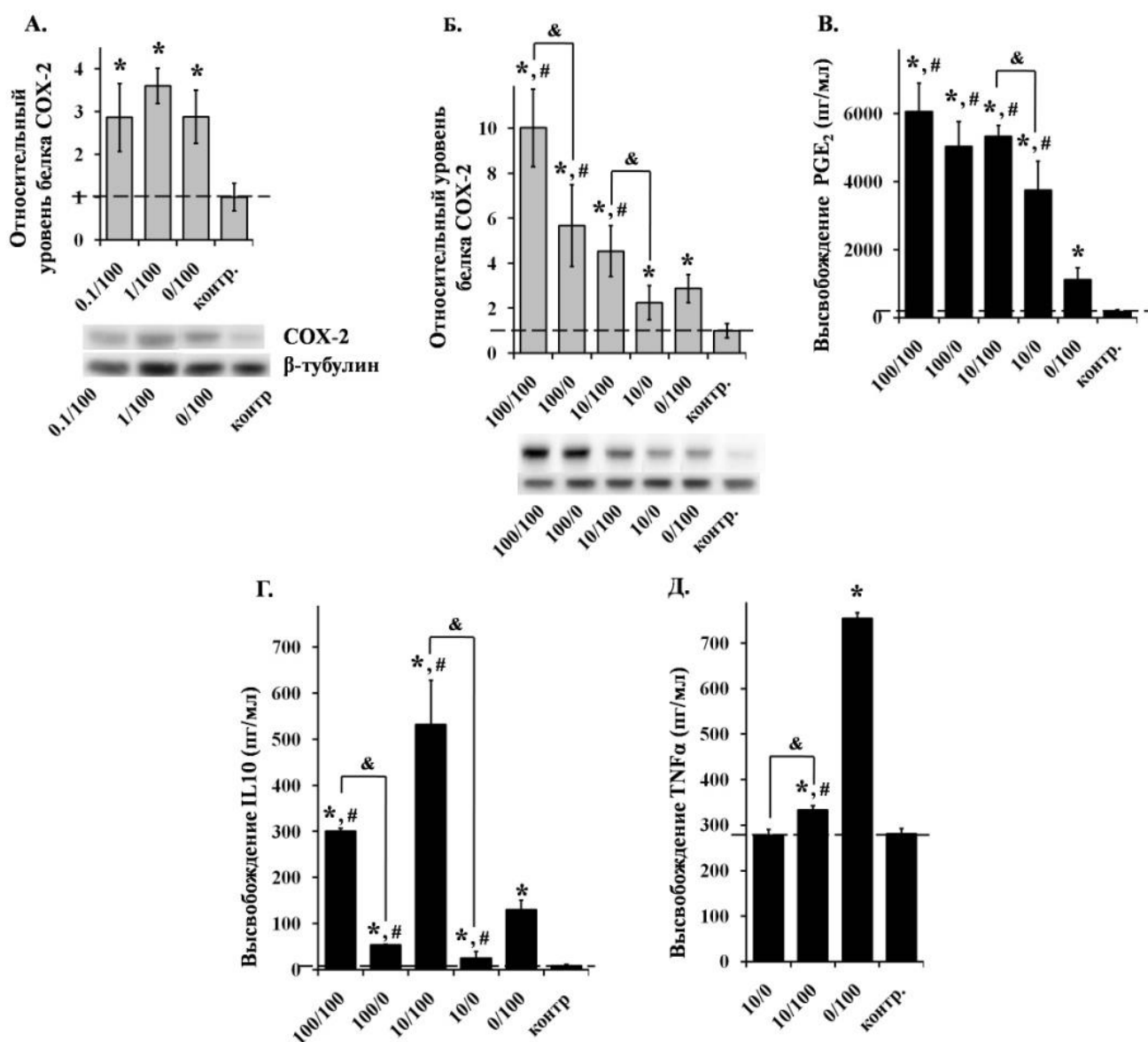


Рис. 7. Влияние двукратной провоспалительной стимуляции на синтез белка COX-2, IL10, TNFα и высвобождение PGE₂. Астроциты инкубировали с LPS (0,1, 1, 10 и 100 нг/мл) в течение 46 часов, после чего стимулировали LPS 100 нг/мл в течение 4 часов. Клетки, стимулированные LPS 100 нг/мл в течение 4 часов, использовали в качестве положительного контроля. Не стимулированные клетки использовали в качестве отрицательного контроля. Посредством иммуноблоттинга определяли уровень белка COX-2 (А, Б). Посредством иммуноферментного анализа определяли уровни высвобождаемого PGE₂, IL10, TNFα (В, Г, Д). * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками, # $p < 0,05$ по сравнению с клетками, стимулированными LPS один раз (0/100), & $p < 0,05$ по сравнению с клетками, стимулированными LPS 10 нг/мл в течение 46 часов (10/0). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

Таким образом, повторные провоспалительные стимуляции оказывают дифференциальное влияние на экспрессию мРНК и белков про- и противовоспалительных молекул, вовлеченных в клеточный ответ в астроцитах.

5. Регуляция экспрессии COX-2 и IL10 в условиях двукратной провоспалительной стимуляции астроглиальных клеток

Поскольку наши результаты четко показывают изменение экспрессии COX-2 и IL10 в условиях повторных стимуляций астроглиальных клеток LPS, далее мы сфокусировали внимание на механизмах, вовлеченных в регуляцию экспрессии этих молекул в рамках модели двукратной обработки астроцитов LPS.

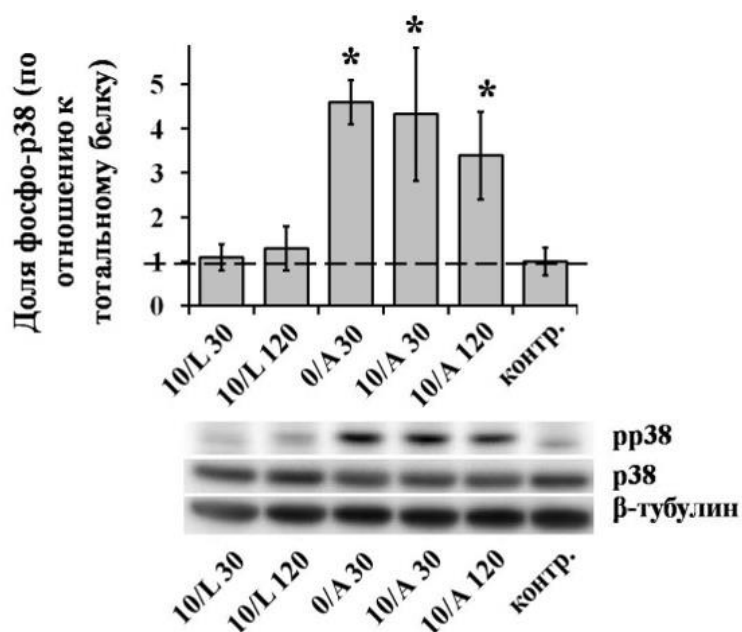


Рис. 8. Влияние длительной провоспалительной стимуляции на индуцированное LPS и анизомидином фосфорилирование p38. Астроциты инкубировали с LPS 10 нг/мл в течение 46 часов (обозначены на графике как 10/) или содержали 46 часов без добавления LPS (обозначены 0/), после чего стимулировали LPS (100 нг/мл) или анизомидином (1 мкг/мл) в течение 30 минут (L 30, A 30) или 2 часов (L 120, A 120). После этого посредством иммуноблоттинга определяли уровни фосфорилированного белка и общего белка p38 в культурах. Значения, полученные при измерении уровней фосфобелка, нормировали на значения, полученные для общего белка. Приведена типичная электрофореграмма и результаты денситометрии. Уровень белка в контрольных клетках принят за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. * $p < 0,05$ по сравнению с не стимулированными клетками.

Из литературных данных известно, что в рамках модели эндотоксиновой толерантности наблюдают понижение фосфорилирования MAP киназы p38. Поскольку этот белок вовлечен в регуляцию экспрессии COX-2 и IL10 в астроглиальных клетках в ходе воспалительного ответа, вызванного однократной стимуляцией, мы проверили индукцию фосфорилирования p38 при повторных стимуляциях астроцитов. Результаты иммуноблоттинга продемонстрировали отсутствие фосфорилирования p38 в ответ на повторную стимуляцию клеток LPS (10/100). Тем не менее, обработка клеток анизомидином (10/A) в течение 30 минут и 2 часов приводила к усилению экспрессии фосфорилированной

формы белка, что указывает на блокировку индукции p38 через TLR4-зависимый путь (рис. 8). Данные об отсутствии фосфорилирования p38 указывают на то, что этот механизм регуляции экспрессии COX-2 и IL10 не вовлечен в воспалительный ответ при повторных стимуляциях. Действительно, добавление ингибиторов p38 и JNK не оказывало влияния на изменение уровня белка COX-2. Тем не менее ингибирование MAP киназы p38 приводило к снижению высвобождаемого PGE₂, что аналогично эффекту, который наблюдали в условиях однократной провоспалительной стимуляции. Этот результат может указывать на существование механизмов дифференциального контроля экспрессии и активности COX-2, которые не требуют обязательного фосфорилирования p38, но задействуют SB203580-регулируемые пути. Более того, наши результаты продемонстрировали существенное снижение экспрессии IL10 в астроглиальных клетках при обработке клеток ингибиторами p38 и JNK. При этом ингибирование JNK лишь частично снижало синтез IL10 (10/SP/100), в то время как ингибирование p38 (10/SB/100, 10/SB/SP/100) полностью блокировало прирост IL10 при второй стимуляции LPS. Эти результаты указывают на участие фосфо-p38 независимых сигнальных каскадов, регулируемых SB203580 в контроле экспрессии IL10 (рис. 9).

Далее мы проверили, как влияет на экспрессию COX-2 и IL10 обработка клеток Bay-11-7085, ингибитором фактора транскрипции NF-κB, в рамках модели двукратной стимуляции. Обработка клеток ингибитором приводила к усилению экспрессии COX-2 при второй стимуляции (10/B/100). Это довольно любопытный результат, поскольку Bay-11-7085 известен как ингибитор синтеза COX-2, опосредованного через активацию NF-κB. Наблюдаемый эффект подразумевает наличие отрицательного регулятора экспрессии COX-2, активного в астроцитах в условиях двукратной провоспалительной стимуляции и регулируемого посредством NF-κB. Данные также указывают на роль NF-κB в качестве переключателя между положительной и отрицательной регуляцией экспрессии COX-2 в разных условиях воспалительного ответа. В случае с IL10 добавление Bay-11-7085 в условиях модели 10/100 приводило к снижению экспрессии. Однако при ингибировании фактора транскрипции мы наблюдали лишь частичное подавление экспрессии под воздействием второго стимула LPS.

Как и в случае однократной стимуляции клеток ЛПС обработка клеток росиглитазоном и GW9662 не оказывала влияния на уровни экспрессии COX-2 и IL10.

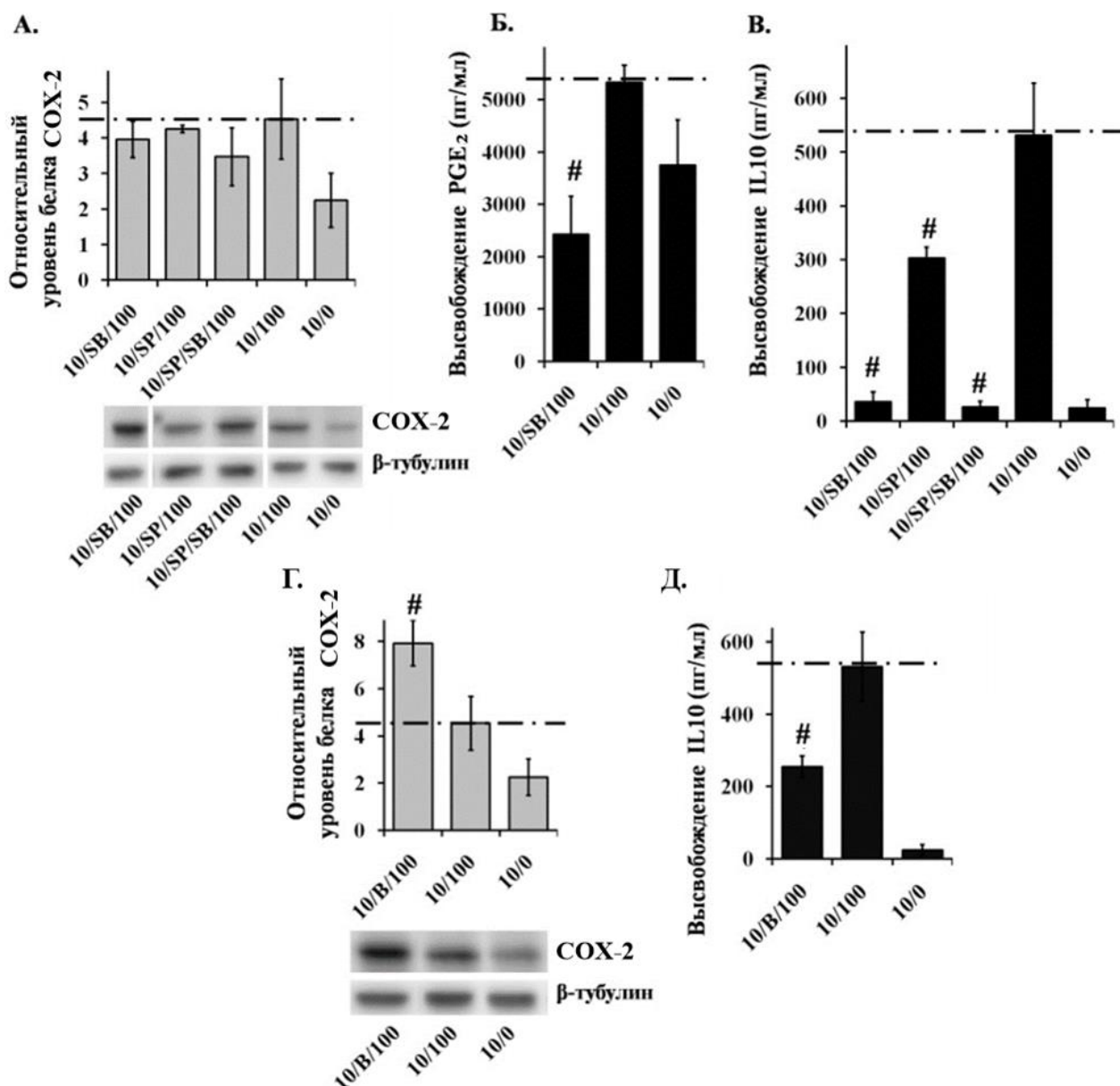


Рис. 9. Влияние двукратной провоспалительной стимуляции, SB203580, SP600125 и LPS на экспрессию и активность COX-2, высвобождение IL10. Астроциты инкубировали с LPS (10 нг/мл, 46 часов) и далее стимулировали SB203580 (SB, 20 мкМ, 30 мин до LPS), SP600125 (SP, 10 мкМ, 30 мин до LPS), Bay 11-7085 (Bay, 5 мкМ, 30 мин до LPS), LPS (100 нг/мл, 4 часа) или их комбинациями. Посредством иммуноблоттинга определяли уровни экспрессии белка COX-2 (А), посредством иммуноферментного анализа определяли уровни высвобождения PGE₂ (Б) или IL10 (В, Д). Посредством ПЦР в режиме реального времени определяли уровни экспрессии мРНК COX-2 (Г). Все эксперименты проводили не менее трех раз. #*p* < 0,05 по сравнению с клетками, стимулированными LPS дважды (10/100). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

В целом полученные данные демонстрируют сходство регуляторных механизмов, вовлеченных в контроль экспрессии COX-2 и IL10 на ранних этапах воспалительного ответа (в условиях однократной стимуляции) и их дифференциацию в регуляции экспрессии выбранных маркеров воспалительного ответа после длительной инкубации астроцитов с LPS (повторные стимуляции) (рис. 10).

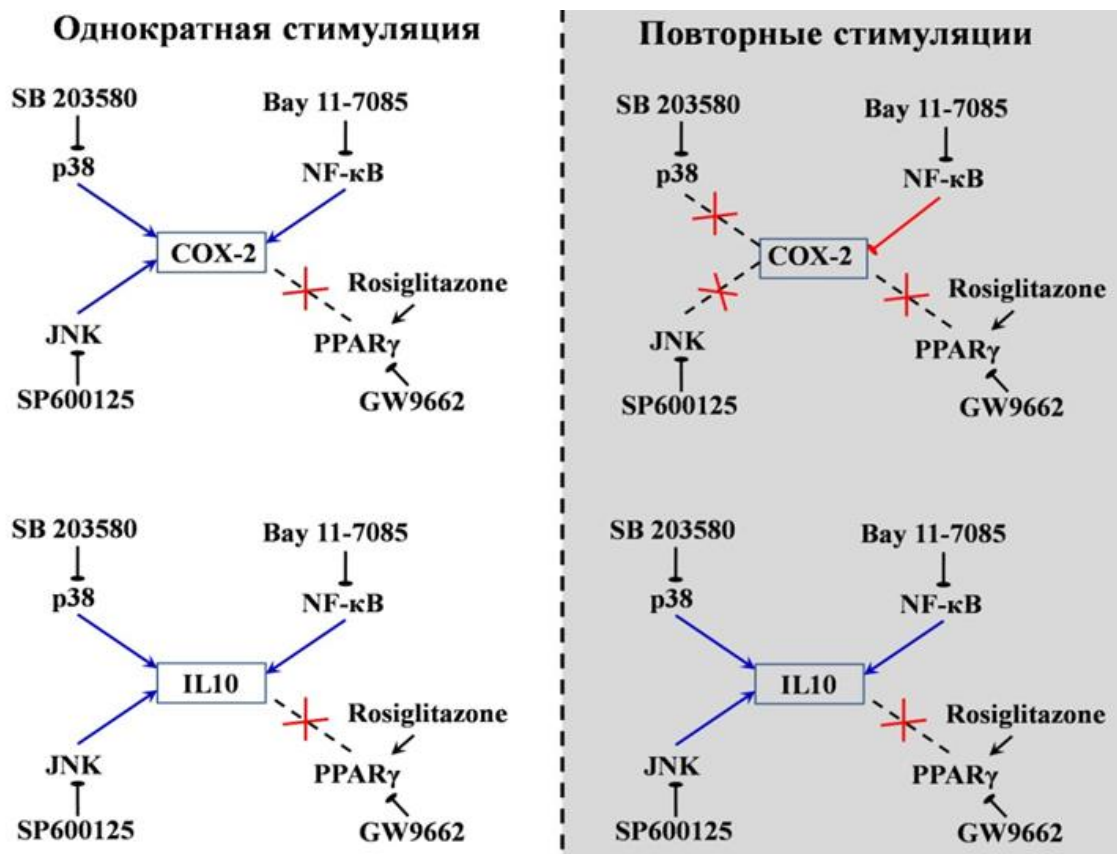


Рис. 10. Обобщенная схема регуляции COX-2 и IL10 в условиях однократной и повторных провоспалительных стимуляций. Стрелками показаны активирующие воздействия. Линиями со штрихом на конце показаны ингибирующие взаимодействия. Пунктирные линии указывают на отсутствие эффекта соответствующей обработки.

Таким образом, полученные в работе данные свидетельствуют о том, что врожденный иммунный ответ астроглиальных клеток вовлечены специализированные регуляторные механизмы, которые обеспечивают активацию как провоспалительных, так и противовоспалительных медиаторов. Механизмы контроля медиаторов, вовлеченных в процесс воспалительного ответа, различаются в клетках, подвергнутых однократной провоспалительной стимуляции, или подвергнутых стимуляции в условиях предшествующего контакта с провоспалительным веществом. Некоторые из механизмов, вовлеченные в контроль воспаления в астроглиальных клетках, значительно отличаются от механизмов, работающих в клетках лимфоидного и миелоидного происхождения. Данные особенности регуляции воспалительного ответа астроглиальных клеток необходимо учитывать при разработке стратегий, направленных на коррекцию врожденного иммунного ответа в центральной нервной системе.

ВЫВОДЫ

1. Обработка астроцитов LPS в течение 4 часов приводит к усилению экспрессии COX-2, TNF α и IL10. Усиление экспрессии COX-2 сопровождается увеличением выброса PGE2, что указывает на провоспалительный характер ранних этапов клеточного ответа.

2. MAP киназы p38 и JNK активируются в ответ на стимуляцию TLR-4; фосфатаза MKP1 не изменяется под воздействием обработки LPS.

3. В регуляцию экспрессии IL10 и COX-2 на ранних этапах обработки вовлечены механизмы сигнальных каскадов MAP киназ и NF- κ B; росиглитазон не оказывает влияния на экспрессию исследованных молекул.

4. В ходе воспалительного ответа в астроцитах усиливается экспрессия мРНК TTP, однако не происходит ее трансляции в белок. Экспрессия мРНК HUR остается неизменной в ходе воспалительного ответа, но высокие концентрации LPS могут стимулировать экспрессию белка HUR. Обработка LPS стимулирует выход белка HUR из ядра.

5. Экспрессии мРНК TTP зависит от активности MAP киназы p38, HUR и TTP регулируются на уровне стабилизации мРНК в ходе воспалительного ответа.

6. Повторные обработки астроцитов LPS не являются токсичными для клеток и не меняют морфологию клеток в культуре.

7. В ответ на повторную стимуляцию наблюдается снижение индукции TNF α на уровне мРНК и белка, COX-2 на уровне мРНК, но не на уровне белка. Повторная стимуляция клеток вызывает усиление выброса PGE2. Также происходит усиление синтеза и высвобождения IL10. При этом, интенсивность выброса IL10 зависит от величины концентрации LPS, использованного при первичной длительной стимуляции.

8. При повторных стимуляциях клеток происходит подавление фосфорилирования p38. В то же время, индукция фосфорилирования p38 возможна при добавлении анизомидина.

9. В регуляцию экспрессии IL10 при двукратной стимуляции астроцитов вовлечены каскады MAP киназ и сигнальный путь NF- κ B. Обработка клеток росиглитазоном усиливает экспрессию мРНК COX-2 при повторной стимуляции клеток, однако не влияет на уровень белка COX-2 или белка IL10.

Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность: моему научному руководителю Сергеевой М.Г. за помощь в постановке экспериментов и научные консультации при работе над диссертационным проектом; директору Института нейробиологии университета Отто-фон-Герике г. Магдебург (Германия) профессору Георгу Райзеру за организацию работы и

ценные замечания в отношении научного содержания экспериментов; сотрудникам Института нейробиологии Абида Шнайдер и Петре Груенберг за ценные методические консультации и техническую помощь в проведении работы, а также моим коллегам из Группы системной биологии липидов Отдела биокинетики НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского Панкевич Е.И. и Чистякову Д.В. за помощь и поддержку в организации, проведении исследований и интерпретации полученных результатов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК

1. Chistyakov D. V., Aleshin S. E., **Astakhova A.A.**, Sergeeva M. G., Reiser G. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) α and γ of rat brain astrocytes in the course of activation by toll-like receptor agonists // Journal of Neurochemistry. 2015. V. 134, № 1, p. 113-124.
2. **Astakhova A.A.**, Chistyakov D.V., Pankevich E.V., Sergeeva M.G. Regulation of Cyclooxygenase 2 Expression by Agonists of PPAR Nuclear Receptors in the Model of Endotoxin Tolerance in Astrocytes // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80, № 10, p. 1262-1270.
3. Pankevich E.V., Chistyakov D.V., **Astakhova A.A.**, Strelkova O.S., Sergeeva M.G. Regulation of Cyclooxygenase 2 mRNA Degradation by Rosiglitazone in C6 Glioma Cells in the Presence of Inflammation Inductors // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2015. V. 9, № 4, p. 337-341.

Тезисы конференций и статьи в сборниках:

4. **Астахова А.А.**, Чистяков Д.В., Райзер Г., Сергеева М.Г. Экспрессия тристетрапролина в условиях воспалительного ответа в астроцитах // Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», г. Пущино (Россия). 2015. Т. 1. С.: 4-9.
5. **Астахова А.А.**, Борисевич Д.И., Сергеева М.Г. Изменение экспрессии генов сигнальной системы врожденного иммунитета в злокачественных опухолях с разным прогнозом // Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», г. Пущино (Россия). 2013. Т. 1. С.: 5-10.
6. **Astakhova A.A.**, Sergeeva M.G. Analysis of transcription factors, lipid and glucose metabolism, and innate immunity genes expression in gliomas // Международная конференция: «Nuclear receptors: Linking molecules, genomes & physiology». Сорренто (Италия). 2013. С.: 95.

7. Chistyakov D.V., **Astakhova A.A.**, Karatasso U.O., Sergeeva M.G. Comparison of LPS-stimulated and control U937 cells by shotgun lipidomics analysis to distinguish between two types of cellular response // Международная конференция «3rd European lipidomics meeting». Пардубице (Чехия). 2013. Т.1. С.20.
8. Chistyakov D.V., **Astakhova A.A.**, Sergeeva M.G. Alterations of Toll-like Receptor Signaling Pathway in Gliomas // Международная конференция «Alternative Strategies against Cancer and Inflammation» Бангкок (Тайланд). 2012. Т.64. С.: 89.