

**ПАР1-опосредованное влияние тромбина на морфо-функциональное состояние астроцитов в культуре.**

**Научный руководитель – Горбачёва Любовь Руфэлевна**

***Иванов Олег Андреевич***

*Студент (бакалавр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра физиологии человека и животных, Москва, Россия

*E-mail: Lega1305@mail.ru*

По данным Всемирной организации здравоохранения, инсульт занимает второе место в ряде причин смертности в мире. Ишемический инсульт, связанный с нарушением мозгового кровотока из-за тромбирования сосудов головного мозга, составляет 90% всех случаев инсульта. Важными последствиями инсульта являются долгосрочная инвалидность и высокие затраты системы здравоохранения на терапию последствий инсульта. Тромбин, помимо важнейшей роли в процессе свертывания крови, также является одним из главных триггеров воспалительных процессов [1]. Активируя специфические рецепторы, активируемые протеазами (ПАР), широко экспрессирующиеся на нейронах и клетках глии, тромбин и другие протеазы гемостаза могут оказывать как про-, так и противовоспалительные эффекты [2]. Одним из важных клеточных регуляторов воспаления являются астроциты. Целью данной работы является изучение ПАР1-опосредованного действия тромбина на культивируемые астроциты крысы.

Эксперименты проводили на первичных культурах астроцитов, выделенных из кортекса новорожденных крысят линии Wistar. Астроциты культивировали в течение 9-12 дней при 37°C в 5% атмосфере CO<sub>2</sub>, производя замену клеточной среды каждые 5 дней. Замену культуральной среды на бессывороточную проводили за 3 часа до добавления в среду агонистов/антагонистов ПАР1: тромбина (1-100 нМ), пептида-агониста ПАР1 TRAP6 (100 мкМ) и ПАР1-антагониста SCH79797 (0,35-1 мкМ). Через 4, 24 и 48 часов оценивали секрецию бета-гексозаминидазы (БГА), через 48 часов - секрецию NO и пролиферацию астроцитов, в течение 20 минут после воздействия измеряли жесткость мембраны клеток и состояние актинового цитоскелета. Секрецию БГА измеряли с помощью окрашенного субстрата (4-нитрофенил-N-ацетил-β-D-глюкозамин), секрецию NO - с помощью реактива Грисса. Пролиферацию оценивали с использованием реактивов МТТ и WST-1. Динамику жесткости клеточной мембраны регистрировали с помощью метода сканирующей ион-проводящей микроскопии (SICM) [3], состояние актинового цитоскелета - методом иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии. Данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 8.0.

В ходе исследования мы установили, что тромбин в высоких концентрациях (>50 нМ) демонстрирует отставленное провоспалительное действие на культивируемые астроциты, повышая уровень пролиферации и секреции NO и БГА. Блокада ПАР1 отменяла провоспалительный эффект тромбина на астроциты, снижая вызванное тромбином повышение пролиферации клеток. С помощью метода ион-проводящей микроскопии мы впервые продемонстрировали повышение жесткости клеточной мембраны астроцитов на фоне действия 50 нМ тромбина и 100 мкМ TRAP6. Обнаруженные нами при этом перестройки актинового цитоскелета свидетельствуют о сопряжении процессов полимеризации актина астроцитов и изменения уровня жесткости их мембраны при активации ПАР1.

Таким образом, мы установили, что ПАР1-зависимая провоспалительная активация астроцитов включает, наряду с изменением секреции, изменение жесткости клеточной мембраны, вероятно, в результате полимеризации F-актина.

**Источники и литература**

- 1) Ye, F., Garton, H. J. L., Hua, Y., Keep, R. F., Xi, G. The Role of Thrombin in Brain Injury After Hemorrhagic and Ischemic Stroke // *Translational Stroke Research*. 2020. V. 12(3). P. 496–511.
- 2) Ivanova, A. E., Gorbacheva, L. R., Strukova, S. M., Pinelis, V. G., Reiser, G. Activated protein C and thrombin participate in regulation of astrocyte functions // *Biologicheskie Membrany*. 2020. V. 30(6). P. 387–397.
- 3) Clarke, R. W., Novak, P., Zhukov, A., Tyler, E. J., Cano-Jaimez, M., Drews, A., Richards, O., Volynski, K., Bishop, C., & Klenerman, D. Low Stress Ion Conductance Microscopy of Sub-Cellular Stiffness. // *Soft Matter*. 2016. V. 12(38). P. 7953–7958.