

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ПРОЦЕСС ФАГОЦИТОЗА АПОПТОТИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ АСТРОЦИТАМИ МОЗГА КРЫС

© 2020 г. Т. В. Соколова^{1,*}, М. П. Рычкова¹, Н. Ф. Аврова¹, М. Г. Ефимова^{1,**}

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: sokolt1956@mail.ru

**e-mail: yefimova3@gmail.com

Поступила в редакцию 22.05.2020 г.

После доработки 02.07.2020 г.

Принята к публикации 06.07.2020 г.

Астроциты мозга традиционно рассматриваются в качестве клеток, относительно устойчивых к окислительному стрессу. В настоящей работе впервые изучен вопрос о влиянии окислительного стресса на способность астроцитов мозга крысы в первичной культуре к захвату и поглощению субстратов апоптотического типа, в качестве которых использовали изолированную фракцию наружных сегментов палочек (НСП) сетчатки крысы. С использованием методов флуоресцентной микроскопии показано, что способность к захвату и поглощению препаратов НСП резко снижается в астроцитах мозга, подвергнутых предварительной инкубации с гидроперекисями различного типа. Способность к захвату и поглощению НСП астроцитами мозга крысы также зависела от степени окисленности субстрата. Поглощение “окисленных” препаратов НСП, подвергнутых предварительной инкубации с перекисью водорода, было резко снижено по сравнению с “неокисленными” препаратами. Показано, что использование ряда природных и синтетических антиоксидантов (α -токоферол, Тролокс) предохраняет фагоцитарную функцию астроцитов от повреждающего воздействия окислительного стресса. Полученные данные свидетельствуют о том, что фагоцитарная функция астроцитов чрезвычайно уязвима к воздействию окислительного стресса, а устойчивость к окислительному повреждению характерна не для всех функций, реализуемых этими клетками.

Ключевые слова: астроциты, фагоцитоз, апоптотические субстраты, окислительный стресс, антиоксиданты

DOI: 10.31857/S004445292006008X

ВВЕДЕНИЕ

Астроциты являются наиболее многочисленными клетками общей популяции глиальных клеток головного мозга. Астроглиальные клетки ответственны за выполнение многочисленных функций в ЦНС. Так, астроглия формирует специфическое микроокружение для нейрональных клеток, за счет чего создаются необходимые условия для генерации и передачи нервных импульсов. Помимо этого, астроциты участвуют в формировании гематоэнцефалического барьера, осуществляют опорную, трофическую и секреторную функции, а также способствуют поддержанию и реализации синаптической функции. Недавние исследования показали, что астроциты вовлечены в процессы восстановления нервной системы (nervous system repair) [1] после повреждений, обусловленных факторами различной этиологии. К таковым относятся нейродегенеративные состояния, ишемия, старение, травматическое и радиационное повреждение головного мозга и др. Как правило, эти патологические состояния сопровождаются развитием окис-

лительного стресса, который отягощает их течение и способствует гибели нервных клеток.

Астроциты мозга традиционно рассматриваются в качестве клеток, относительно устойчивых к окислительному стрессу [2]. По сравнению с нейронами, для астроцитов характерен высокий базальный уровень глутатиона, что позволяет полагать, что астроциты предохраняют нейрональные клетки от токсических эффектов, обусловленных развитием окислительного стресса [2, 3]. Устойчивость астроцитов реализуется за счет скоординированной работы двух основных антиоксидантных систем: каталазы и глутатионпероксидазы. Оба этих фермента принимают участие в трансформации/распаде/разрушении перекиси водорода, которая является естественным продуктом метаболизма клеток [4].

Наряду с клетками микроглии, астроциты являются клетками-фагоцитами ЦНС, принимающими участие в удалении синапсов [5], а также апоптотических субстратов, образующихся в ходе повреждений ЦНС [6, 7]. Захват и поглощение

субстрата в процессе фагоцитоза осуществляются за счет динамических изменений плазматической мембраны, которые реализуются путем тонкой реорганизации микрофиламентов актина и ряда вспомогательных белков, принимающих участие в формировании цитоскелета клетки [8]. Известно, что окислительный стресс вызывает селективные изменения белков цитоскелета [9]. В случае астроцитов мозга показано, что инкубация клеток с перекисью водорода индуцирует фазовые изменения плазматической мембраны, сопровождающиеся полимеризацией актина и возникновением дополнительных межклеточных контактов [10]. Таким образом, представляется вероятным, что модификации мембраны и цитоскелета астроцита под влиянием прооксидантов могут влиять на эффективность захвата субстрата в ходе многоступенчатого процесса фагоцитоза [11]. Кроме этого известно, что дополнительным фактором, определяющим эффективность фагоцитоза, является окисленность самого субстрата фагоцитоза. Однако работы по изучению влияния окислительного стресса на процессы астроцитарного фагоцитоза пока мало численны, а данные о влиянии степени окисленности апоптотического субстрата на интенсивность фагоцитоза противоречивы [12–14]. Между тем более глубокое понимание процессов глиального фагоцитоза в мозге в норме и при нейродегенеративных, ишемических, травматических и других поражениях мозга позволит, очевидно, найти новые подходы к лечению болезней, связанных с поражением ЦНС [5].

Целью настоящего исследования является выяснение следующих вопросов: в какой мере астроциты мозга способны реализовывать фагоцитарную функцию в условиях окислительного стресса, а также в какой мере окисленность субстрата влияет на эффективность его захвата этими клетками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на первичной культуре клеток астроглии, которую выделяли из мозга новорожденных крыс по методу [15]. Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10% инактивированной фетальной сыворотки теленка (Биолот, Россия) и антибиотики (пенициллин G 50 Ед/мл и стрептомицин 50 мкг/мл, Биолот Россия) на чашках Петри (Ø3.5 см, Orange scientific), в течение 7–9 дней при 37°C и 5% CO₂ до достижения 75% конфлюентности. О жизнеспособности клеток судили по тесту TrypanBlue (Биолот, Россия).

Клетки промывали и инкубировали в среде DMEM, содержащей 2% сыворотки, и добавляли субстраты фагоцитоза в соотношении 1:10 (клетка/субстрат фагоцитоза; подсчет клеток и фрагментов наружных сегментов палочек (НСП) сетчатки проводили с использованием камеры Фукса-

Розенталя). В качестве апоптотического субстрата фагоцитоза использовали фракцию НСП сетчатки крысы, которую выделяли по модифицированному методу [7, 16]. Конъюгацию препаратов НСП с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC, Merck, Германия) осуществляли, как ранее нами было описано [16]. Для получения “окисленных” субстратов фагоцитоза, конъюгат НСП-FITC инкубировали с 1 М H₂O₂ в течение 1 ч, далее отмывали от излишков перекиси фосфатно-солевым раствором (PBS). В предварительных опытах мы убедились, что обработка перекисью водорода не влияет на флуоресцентные свойства конъюгата НСП-FITC.

При исследовании влияния окислительного стресса на процесс фагоцитоза перекись водорода (диапазон концентраций составлял от 0.01 до 0.5 мМ или 0.1–0.5 мМ в случае гидроперекиси трет-бутила) добавляли за 1 ч до запуска процесса фагоцитоза, длительность которого составляла 3 ч. При анализе протекторного действия антиоксидантов (α -токоферола, Тролокса и N-ацетил-L-цистеина) их добавляли в инкубационную среду за 15 мин до добавления перекиси водорода. После окончания инкубации с НСП излишки субстрата отмывали охлажденным PBS и проводили фиксацию клеток в течение 3–5 мин в 4% растворе параформальдегида, приготовленного на PBS. После промывки препаратов раствором PBS проводили окраску ядер 0.001% раствором Hoechst 33258/PBS (Serva, Германия). Морфологическим критерием для оценки поглощения субстрата астроцитами служило наличие флуоресцентной метки FITC в перинуклеарной области клетки, где осуществляется взаимодействие окрашенных красителем фрагментов НСП с лизосомами. Об эффективности процесса фагоцитоза (фагоцитарной активности) судили с помощью расчетного соотношения количества клеток, содержащих флуоресцентный субстрат в перинуклеарной области к общему числу клеток в препарате (результаты выражали в процентах). Подсчет ядер проводили с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США). Статистическую обработку результатов осуществляли на основании однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), применяя тест для множественных сравнений Бонферрони и используя программу GraphPadPrism (San Diego, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В недавних исследованиях мы показали [7], что астроциты крысы в первичной культуре способны осуществлять захват и поглощение различных апоптотических субстратов (апоптотические нейроны коры мозга, изолированная фракция НСП сетчатки крысы, также представляющая собой субстрат апоптотического типа). При этом кинетические параметры поглощения НСП близки к параметрам, характерным для поглощения и захвата апо-

птотических нейронов [7]. В связи с этим в настоящей работе для оценки эффективности фагоцитоза в условиях окислительного стресса в качестве субстрата мы использовали фракцию НСП сетчатки крысы.

В первой серии опытов мы оценили влияние перекиси водорода на фагоцитарную активность астроцитов. В качестве рабочей концентрации мы использовали 0.1 и 0.2 мМ H_2O_2 , поскольку такие концентрации перекиси водорода обычно используются для моделирования окислительного стресса в клетках ЦНС [17]. На рис. 1 (а, а', б, б') представлены данные флуоресцентной микроскопии, характеризующие относительное распределение конъюгата НСП-FITC в препаратах астроцитов, обработанных H_2O_2 по сравнению с контролем. Очевидно, что в результате инкубации с перекисью водорода количество клеток, содержащих фрагменты НСП в перинуклеарной области, значительно уменьшается (рис. 1б, б'), что свидетельствует о замедлении процесса образования первичной фагосомы и ее продвижения в цитоплазму клетки. Статистический анализ выявил двукратное (на 58%) снижение фагоцитарной активности астроцитов, прошедших предварительную инкубацию с 0.1 мМ H_2O_2 . Далее нам представлялось важным установить, при каких концентрациях перекиси водорода астроглиальные клетки еще способны полноценно распознавать и захватывать апоптотические субстраты. Для этого мы провели оценку эффективности процесса фагоцитоза астроцитами мозга крысы в широком диапазоне концентраций перекиси водорода в инкубационной среде: от 0.01 до 0.5 мМ. Из данных гистограммы, представленной на рис. 1в, следует, что фагоцитарная функция астроцитов крайне чувствительна к окислительному стрессу. Так, тенденцию к снижению эффективности фагоцитоза наблюдали уже при инкубации клеток с 0.01 мМ H_2O_2 , в то время как инкубация с 0.05 мМ H_2O_2 приводила к достоверному снижению эффективности фагоцитоза на 41% по сравнению с контролем. Из этих данных следует, что только при относительно низких базальных уровнях H_2O_2 в инкубационной среде астроглиальные клетки способны к полноценному удалению апоптотических субстратов.

В следующей серии опытов мы оценили фагоцитарную активность астроцитов, подвергнутых предварительной инкубации с гидроперекисью трет-бутила. Известно, что по сравнению с перекисью водорода распад перекиси трет-бутила в биологических системах приводит к образованию более долгоживущих свободнорадикальных дериватов [18]. С другой стороны, полагают, что токсичность этого соединения для первичной культуры астроцитов мозга крысы невысока, поскольку чрезвычайно быстро (в течение 20 мин) удаляется за счет функционирования ферментной

системы глутатион пероксидаза/глутатионредуктаза [19]. Результаты нашей серии опытов суммированы в гистограмме (рис. 1г). Из этих данных следует, что в отношении фагоцитарной активности астроцитов мозга крысы перекись трет-бутила является более токсичным соединением, чем перекись водорода (рис. 1в). Действительно, инкубация клеток с перекисью трет-бутила в конечной концентрации 0.1 и 0.2 мМ приводила к снижению фагоцитарной активности на 70% от контрольных значений.

Более высокие концентрации перекиси трет-бутила являлись токсичными для астроцитов мозга крысы (см. Материалы и методы), что соответствует данным литературы [20]. Таким образом, способность к захвату апоптотических субстратов астроцитами мозга значительно снижается в условиях окислительного стресса, обусловленного присутствием гидроперекисей различного типа. Представляло интерес также выяснить, является ли окисленность субстрата фактором, влияющим на эффективность его захвата астроглиальными клетками. С этой целью мы инкубировали астроциты мозга крысы с препаратами НСП, предварительно обработанными перекисью водорода (см. Материалы и методы). Согласно данным флуоресцентной микроскопии, способность осуществлять захват предварительно "окисленных" препаратов НСП астроцитами мозга крысы чрезвычайно низка (рис. 1д, д'). Действительно, в этом случае субстрат фагоцитоза обнаруживается преимущественно на периферии клеток, в ассоциации с плазматической мембраной. Очень редко мы отмечали присутствие "окисленного" субстрата в перинуклеарной области астроцитов. Согласно данным статистического анализа, количество клеток, содержащих фрагменты НСП в перинуклеарной области составляло 33% от контрольного значения. Интересно, что окисленность субстрата является наиболее значимым фактором, определяющим эффективность фагоцитоза астроглиальными клетками мозга. Действительно, в результате предварительной инкубации астроцитов с перекисью водорода (конечная концентрация 0.1 мМ) эффективность захвата "неокисленных" НСП составляла 56% по сравнению с контролем; в то время как эффективность захвата "окисленных" препаратов НСП астроцитами мозга, не подвергнутыми предварительной инкубации с перекисью водорода, составляло только 33%. При этом в случае использования "окисленных" НСП предварительная инкубация астроцитов с перекисью водорода не привносила дополнительного снижения количества клеток, накапливающих субстрат в перинуклеарной области (рис. 1е).

Известно, что использование природных и синтетических антиоксидантов способствует замедлению развития ряда нейродегенеративных состояний ЦНС [21–23], при этом природные антиоксиданты могут снижать интенсивность

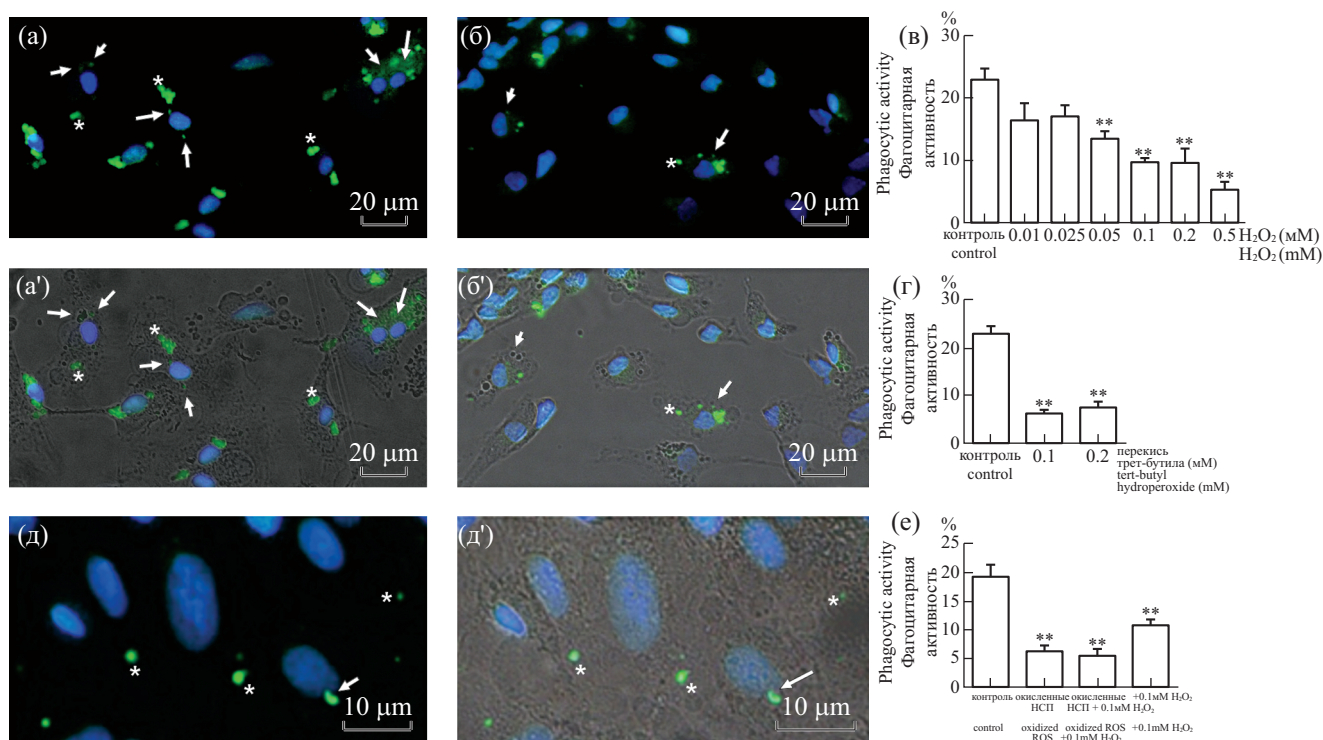


Рис. 1. Фагоцитарная активность астроцитов мозга крысы в первичной культуре в условиях окислительного стресса. (а, а') – контрольные препараты астроцитов мозга после инкубации с конъюгатом НСП-ФИТС. (а') получен с помощью наложения на панель (а) снимка клеток в проходящем свете для визуализации их контура. (б, б') – препараты астроцитов мозга крысы, подвергнутых предварительной обработке 0.1 мМ H₂O₂, и далее проинкубированных с конъюгатом НСП-ФИТС. (б') получен с помощью наложения на панель (б) снимка клеток в проходящем свете для визуализации их контура. (в, г) – количественная оценка фагоцитарной активности астроцитов мозга крысы в присутствии различных концентраций перекиси водорода (в) и перекиси трет-бутила (г). ** – различия достоверны, при $p < 0.001$. (д, д') – препараты астроцитов мозга после инкубации с “окисленным” конъюгатом НСП-ФИТС, прошедшим предварительную инкубацию с 1 мМ H₂O₂. (д') получен с помощью наложения на панель (д) снимка клеток в проходящем свете для визуализации их контура. (е) – количественная оценка фагоцитарной активности астроцитов мозга при различных условиях окисления клеток и/или субстрата (см. Материалы и методы). Стрелками отмечены конъюгаты НСП-ФИТС в перинуклеарной области астроцитов, звездочками отмечены конъюгаты НСП-ФИТС на периферии клеток. По вертикальной оси (в, г, е) отложена фагоцитарная активность клеток (%). По горизонтальной оси отложена концентрация перекиси водорода (в) и перекиси трет-бутила (г).

Fig. 1. Phagocytic activity of rat brain astrocytes in primary culture under oxidative stress. (a, a') – control preparations of rat brain astrocytes after preincubation with a photoreceptor outer segment (POS)-FITC conjugate. (a') – image obtained by merging (a) with differential interference contrast (DIC) projection for better visualization of cell contours. (b, b') – rat brain astrocytes pretreated with 0.1 mM H₂O₂ and then incubated with POS-FITC. (b') image obtained by merging (b) with differential interference contrast (DIC) projection for better visualization of cell contours. (c, d) – quantification of phagocytic activity of rat brain astrocytes exposed to different concentrations of H₂O₂ (c) and *tert*-butyl hydroperoxide (d). ** – differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. (e, e') – rat brain astrocytes after incubation with “oxidized” POS-FITC pretreated with 1 mM H₂O₂. (e') – image obtained by merging (b) with differential interference contrast (DIC) projection for better visualization of cell contours. (f) – quantification of phagocytic activity of rat brain astrocytes under different conditions of cell/substrate oxidation (see Materials and Methods). Arrows mark POS-FITC conjugates in the perinuclear region of astrocytes; asterisks mark POS-FITC conjugates at the cell periphery. Ordinate (c, d, f) – phagocytic activity (%); abscissa – concentration of H₂O₂ (c) and *tert*-butyl hydroperoxide (d).

свободнорадикальных реакций в клетках мозга, как непосредственно реагируя со свободными радикалами, лишая их неспаренного электрона (эффект скэвенджеров), так и благодаря модуляции сигнальных путей в клетках.

Мы изучали вопрос о возможности применения антиоксидантов для поддержания фагоцитарной способности клеток астроглии. В качестве таковых мы выбрали жирорастворимый антиоксидант α -токоферол, являющийся основным по содержанию и

наиболее активным компонентом витамина Е [17], а также, для сравнения, водорастворимый аналог альфа-токоферола, коммерческий препарат Тролокс [24]. Оба этих соединения обладают хорошо выраженными свойствами скэвенджеров, способны “гасить” свободные радикалы, лишая их неспаренного электрона и повышенной реакционной активности. Различаются эти соединения не только растворимостью в липидных и водных растворителях. Природный антиоксидант α -токоферол

Таблица 1. Протекторный эффект антиоксидантов различного типа в отношении фагоцитарной активности астроцитов мозга крысы, подвергнутых окислительному стрессу**Table 1.** Protective effect of different antioxidants on phagocytic activity of rat brain astrocytes exposed to oxidative stress

Проба/Sample	Антиоксидант (М)/ Antioxidant (M)	Фагоцитарная активность/ Phagocytic activity	% от контроля/ % of control
Контроль/Control	Нет/Not added	23.4 ± 2.7	100%
0.1 мМ Н ₂ О ₂	Нет/Not added	13.7 ± 1.0	58%
0.1 мМ Н ₂ О ₂	100 мМ α-токоферол/100 μM α-tocopherol	18.7 ± 1.2*	79%
0.1 мМ Н ₂ О ₂	100 мМ Тролокс/100 μM Trolox	18.3 ± 2.8*	78%
0.1 мМ Н ₂ О ₂	1 мМ NAC/1mM NAC	13.2 ± 1.6	58%
0.2 мМ Н ₂ О ₂	Нет/Not added	3.9 ± 1.1	16%
0.2 мМ Н ₂ О ₂	100 мМ α-токоферола/100 μM α-tocopherol	15.5 ± 1.5*	66%

Примечание: В качестве фагоцитарной активности принято отношение количества астроцитов, содержащих флуоресцентный субстрат в перинуклеарной области, к общему числу астроцитов в культуре. * – различия достоверны при $p < 0.05$.

Notes: Phagocytic activity of astrocytes was calculated as a ratio (%) of the number of astrocytes containing a fluorescent substrate in the perinuclear area to the total number of astrocytes in the sample. * – differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

обладает способностью модулировать сигнальные пути и таким образом снижать интенсивность свободнорадикальных процессов, а Тролокс – нет. В качестве третьего антиоксиданта мы использовали коммерческий препарат N-ацетилцистеин (NAC) [25]. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 1. Полученные данные показали, что применение α-токоферола и Тролокса (конечная концентрация 100 мМ) способствует достоверному восстановлению фагоцитарной функции астроцитов в условиях окислительного стресса, обусловленного инкубацией астроцитов с 0.1 и 0.2 мМ Н₂О₂. Так, в присутствии в пробах 0.1 мМ Н₂О₂ фагоцитарная активность астроцитов снижалась почти в два раза – до 58% от контроля, однако присутствие в пробах 100 мМ α-токоферола или 100 мМ Тролокса достоверно и значительно повышало фагоцитарную активность астроцитов, подвергнутых действию 0.1 мМ Н₂О₂ (до 79 и 78% от контроля соответственно). Еще более выраженным был защитный эффект α-токоферола на фагоцитарную активность астроцитов, резко сниженную в присутствии 0.2 мМ Н₂О₂ (табл. 1). Но препарат NAC (конечная концентрация 1 мМ) не оказывал какого-либо протекторного воздействия на способность астроцитов к фагоцитозу апоптотических субстратов (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что в условиях *in vitro* фагоцитарная функция астроцитов мозга крысы в первичной культуре крайне уязвима к воздействию окислительного стресса, что выражается в уменьшении количества захваченных апоптотических субстратов в цитоплазме клеток.

Фагоцитоз – это многоступенчатый процесс, в котором выделяют 3 основных стадии: распознавание и связывание субстрата, поглощение субстрата и его расщепление [11]. При этом успешная реализация одной из стадий фагоцитоза не влечет за собой автоматическое осуществление последующей стадии. Так, например, связывание субстрата с плазматической мембраной не является достаточным условием для осуществления процесса поглощения субстрата фагоцитоза и его переноса в цитоплазму клетки. В случае астроцитов мозга уже относительно кратковременная (1 ч) обработка клеток перекисью водорода в концентрации 0.1 мМ приводила к двукратному снижению поглощения фрагментов апоптотических мембран НСП. В этом плане полученные в настоящей работе результаты не согласуются с общепринятыми представлениями об устойчивости астроцитов к окислительному стрессу [2, 3], однако соответствуют данным о влиянии окислительного стресса на захват апоптотических субстратов в другой экспериментальной модели, а именно в клетках пигментного эпителия глаза в процессе фагоцитоза НСП [26]. Как известно, фагоцитарная функция астроцитов, ответственная за захват фрагментов апоптотических мембран, опосредуется рецепторами Multiple EGF-Like Domains 10 (MEGF10) и рецепторной тирозинкиназой Mer proto-oncogene Tyrosine Kinase (MERTK) [5]. MERTK является ключевым рецептором, вовлеченным в процесс фагоцитоза фрагментов НСП клетками пигментного эпителия глаза, при этом индукция окислительного стресса с использованием перекиси водорода резко снижает фагоцитарную активность клеток пигментного эпителия [26].

В отличие от профессиональных фагоцитов, которыми являются клетки гематопоэтического происхождения, астроциты мозга являются непрофес-

сиональными фагоцитами. Последние не принимают участие в процессе удаления патогенов, связанного с генерацией больших количеств активных форм кислорода (oxidative burst). Примечательно, что в ходе фагоцитоза патогенов профессиональный фагоцит подвержен воздействию окислительного стресса, обусловленного его собственной фагоцитарной активностью. Полагают, что мощная система антиокислительной защиты обеспечивает относительную устойчивость профессионального фагоцита к аутоокислению [27]. Принципиально иной механизм фагоцитоза реализуется непрофессиональными фагоцитами в тканях, отделенных гематическими барьерами (мозг, сетчатка, семенники). Поскольку генерация активных форм кислорода может вызвать повреждение близлежащих клеток, процесс фагоцитоза, реализуемого непрофессиональными фагоцитами, не сопровождается окислительным взрывом [11]. В связи с этим можно предполагать, что устойчивость непрофессиональных фагоцитов к окислительному стрессу ниже, чем у профессиональных фагоцитов. Наши данные о снижении фагоцитарной активности астроцитов в культуре при действии на них прооксидантов коррелируют с данными литературы, свидетельствующими о фазовых изменениях плазматической мембраны и конфигурации цитоскелета астроцитов в условиях окислительного стресса [10], что безусловно влияет на способность к реализации фагоцитарной функции этими клетками.

Согласно нашим результатам, астроциты мозга эффективно захватывают фрагменты апоптотических субстратов при низких концентрациях перекиси водорода (0.010–0.025 мМ) в инкубационной среде. Тем не менее при этих условиях летальность нейронов мозга крысы в культуре составляет 20–40% [28]. Таким образом, сохранение нормальной фагоцитарной функции астроглиальными клетками в диапазоне 0.01–0.025 мМ H_2O_2 представляется чрезвычайно важным для поддержания гомеостаза в ткани мозга. В то же время использование природных и синтетических антиоксидантов эффективно предохраняет фагоцитарную функцию астроцитов в условиях окислительного стресса, обусловленного инкубацией клеток с относительно высокими концентрациями перекиси водорода. Как следует из полученных данных, природный антиоксидант α -токоферол и его водорастворимый аналог Тролокс эффективно предохраняли фагоцитарную функцию астроцитов в условиях окислительного стресса. Напротив, NAC в условиях наших экспериментов не обладал защитным действием (табл. 1). По-видимому, это объясняется тем, что NAC, как антиоксидант, отличается по механизму действия от α -токоферола и Тролокса. Антиоксидантное действие N-ацетил-L-цистеина связано с наличием в его структуре восстановленных сульфгидрильных групп (SH-групп) и с тем,

что это соединение может способствовать усилению синтеза глутатиона, важного компонента антиокислительной системы и химической детоксикации организма [29, 30]. При рассмотрении имеющихся в литературе данных обращает на себя внимание тот факт, что большинство авторов развивают представления о том, что NAC не следует сам по себе рассматривать как мощный антиоксидант. Но как предшественник цистеина, входящего в состав глутатиона, это соединение способствует синтезу глутатиона в клетках, а при его дефиците в клетках NAC может оказывать выраженный антиоксидантный эффект (см., например, [29, 30]).

Вопрос о влиянии окисленности апоптотического субстрата на эффективность его захвата фагоцитами является объектом дискуссий, а данные литературы по этому вопросу противоречивы. Так, ряд авторов утверждают, что окисленность апоптотического субстрата повышает эффективность его захвата фагоцитами [13], в то время как обратное утверждение также подтверждается экспериментальными данными других исследовательских групп [12, 14], как в случае профессиональных, так и для непрофессиональных фагоцитов. Данные нашего исследования указывают на то, что окисленность субстрата является важнейшим фактором, определяющим возможность его захвата астроглиальными клетками. Действительно, окисленные фрагменты НСП обнаруживались исключительно на периферии клетки, и очень редко в перинуклеарной области. Это свидетельствует о том, что в процессе фагоцитоза “окисленных” НСП реализуется только первый его этап, а именно связывание субстрата с плазматической мембраной, в то время как образования фагосомы и ее продвижения в цитоплазму клетки не происходит.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что устойчивость к окислительному стрессу характерна не для всех функций, реализуемых астроцитами мозга. Фагоцитарная функция астроцитов чрезвычайно уязвима к воздействию окислительного стресса, что, по-видимому, является отягчающим фактором при развитии нейродегенеративных состояний нервной ткани, сопровождающихся гибелью нервных клеток. В то же время использование природных и синтетических антиоксидантов является эффективной стратегией для восстановления нормальной способности астроцитов мозга к захвату апоптотических субстратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госзадания № АААА-А18-118012290427-7

ВКЛАД АВТОРОВ

Т.В. Соколова, М.П. Рычкова — проведение экспериментов; Т.В. Соколова, М.Г. Ефимова — анализ экспериментальных данных, статистическая обработка результатов, подготовка графических материалов, подготовка рукописи; М.Г. Ефимова, Н.Ф. Аврова — подготовка и корректировка рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bylicky M.A., Mueller G.P., Day R.M.* Mechanisms of Endogenous Neuroprotective Effects of Astrocytes in Brain Injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018: ID 6501031. 2018.
<https://doi.org/10.1155/2018/6501031>
2. *Desagher S., Glowinski J., Premont J.* Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurosci.* 16: 2553–2562. 1996.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-08-02553.1996>
3. *Robinson S.R., Lee A., Bishop G.M., Czerwinska H., Dringen R.* Inhibition of Astrocytic Glutamine Synthetase by Lead is Associated with a Slowed Clearance of Hydrogen Peroxide by the Glutathione System. *Front. Integr. Neurosci.* 9: 61. eCollection. 2015
<https://doi.org/10.3389/fnint.2015.00061>
4. *Dringen R., Hamprecht B.* Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res.* 759 (1): 67–75. 1997.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00233-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00233-3)
5. *Jung Y.J., Chung W.S.* Phagocytic Roles of Glial Cells in Healthy and Diseased Brains. *Biomol. Ther. (Seoul).* 26 (4): 350–357. 2018.
<https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.133>
6. *Tremblay M.E., Cookson M.R., Civiero L.* Glial phagocytic clearance in Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* 14 (1): 16. 2019.
<https://doi.org/10.1186/s13024-019-0314-8>
7. *Sokolova T.V., Vasilyev D.S., Rychkova M.P., Avrova N.F., Yefimova M.G.* Phagocytosis of Apoptotic Substrates Is Accompanied by Proliferation of Cultured Rat Primary Astrocytes. *J. Evol. Biochem. and Physiol.* 56: 84–87. 2020.
<https://doi.org/10.1134/S0022093020010111>
8. *Rosales C., Uribe-Querol E.* Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int.* 2017: 9042851. 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/9042851>
9. *Aksenov M.Y., Aksenova M.V., Butterfield D.A., Geddes J.W., Markesbery W.R.* Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 103: 373–383. 2001.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00580-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00580-7)
10. *Zhu D., Tan K.S., Zhang X., Sun A.Y., Sun G.Y., Lee J.C.* Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *J Cell Sci.* 118 (16): 3695–3703. 2005.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02507>
11. *Yefimova M.G., Messaddeq N., Meunier A.C., Cantereau A., Jegou B., Bourmeyster N.* Phagocytosis by Sertoli Cells: Analysis of Main Phagocytosis Steps by Confocal and Electron Microscopy. *Methods Mol. Biol.* 1748: 85–101. 2018.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7698-0_8
12. *Anderson H.A., Englert R., Gursel I., Shacter E.* Oxidative stress inhibits the phagocytosis of apoptotic cells that have externalized phosphatidylserine. *Cell Death Differ.* 9 (6): 616–625. 2002.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401013>
13. *Kagan V.E., Gleiss B., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Elenström-Magnusson C., Liu S.X., Serinkan F.B., Arroyo A., Chandra J., Orrenius S., Fadeel B.* A Role for Oxidative Stress in Apoptosis: Oxidation and Externalization of Phosphatidylserine Is Required for Macrophage Clearance of Cells Undergoing Fas-Mediated Apoptosis. *J. Immunol.* 169 (1): 487–499. 2002.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.487>
14. *Pawlak A.M., Olchawa M., Koscielniak A., Zadło A., Broniec A., Oles T., Sarna T.J.* Oxidized Lipids Decrease Phagocytic Activity of ARPE–19 Cells In Vitro. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 121: 1800476. 2019.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201800476>
15. *Hamprecht B., Löffler F.* Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol.* 109: 341–345. 1985.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(85\)09097-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(85)09097-8)
16. *Yefimova M.G., Messaddeq N., Harnois T., Meunier A.C., Clarhaut J., Noblanc A., Weickert J.L., Cantereau A., Philippe M., Bourmeyster N., Benzakour O.* A chimerical phagocytosis model reveals the recruitment by Sertoli cells of autophagy for the degradation of ingested illegitimate substrates. *Autophagy.* 9 (5): 653–666. 2013.
<https://doi.org/10.4161/auto.23839>
17. *Zakharova I.O., Sokolova T.V., Vlasova Y.A., Bayunova L.V., Rychkova M.P., Avrova N.F.* α -Tocopherol at Nanomolar Concentration Protects Cortical Neurons against Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (1). pii: E216. 2017.
<https://doi.org/10.3390/ijms18010216>
18. *Hix S., Kadiiska M.B., Mason R.P., Augusto O.* In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chem. Res. Toxicol.* 13 (10): 1056–1064. 2000.
<https://doi.org/10.1021/tx0001301>
19. *Dringen R., Kussmaul L., Hamprecht B.* Rapid clearance of tertiary butyl hydroperoxide by cultured astroglial cells via oxidation of glutathione. *Glia.* 23 (2): 139–145. 1998.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(199806\)23:2<139::aid-glia5>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(199806)23:2<139::aid-glia5>3.0.co;2-1)
20. *Abe K., Saito H.* Characterization of t-butyl hydroperoxide toxicity in cultured rat cortical neurones and astrocytes. *Pharmacol. Toxicol.* 83 (1): 40–46. 1998.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1998.tb01440.x>
21. *Oppedisano F., Maiuolo J., Gliozzi M., Musolino V., Carresi C., Nucera S., Scicchitano M., Scarano F., Bosco F., Macri R., Ruga S., Zito M.C., Palma E., Muscoli C., Mollace V.* The Potential for Natural Antioxidant Supplementation in the Early Stages of Neurodegenerative Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (7): pii: E2618. 2020.
<https://doi.org/10.3390/ijms21072618>

22. *Danta C.C., Piplani P.* The discovery and development of new potential antioxidant agents for the treatment of neurodegenerative diseases. *Expert. Opin Drug Discov.* 9 (10): 1205–1222. 2014.
https://doi.org/10.1517/17460441.2014.942218
23. *Halliwell B.* Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 18 (9): 685–716. 2001.
https://doi.org/10.2165/00002512-200118090-00004
24. *Chow H.S., Lynch J.J. 3rd, Rose K., Choi D.W.* Trolox attenuates cortical neuronal injury induced by iron, ultraviolet light, glucose deprivation, or AMPA. *Brain Res.* 639 (1): 102–108. 1994.
https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91769-8
25. *Arakawa M., Ito Y.* N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: basic and clinical pharmacology. *Cerebellum.* 6 (4): 308–314. 2007.
https://doi.org/10.1080/14734220601142878
26. *Qin S., Rodrigues G.A.* Roles of $\alpha\text{v}\beta 5$, FAK and MerTK in oxidative stress inhibition of RPE cell phagocytosis. *Exp. Eye Res.* 94 (1): 63–70. 2012.
https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.11.007
27. *Spletstoesser W.D., Schuff-Werner P.* Oxidative stress in phagocytes – “the enemy within”. *Microsc. Res. Tech.* 57 (6): 441–455. 2002.
https://doi.org/10.1002/jemt.10098
28. *Cui W., Li W., Zhao Y., Mak S., Gao Y., Luo J., Zhang H., Liu Y., Carlier P.R., Rong J., Han Y.* Preventing H_2O_2 -induced apoptosis in cerebellar granule neurons by regulating the VEGFR-2/Akt signaling pathway using a novel dimeric antiacetylcholinesterase bis(12)-hupyridone. *Brain Res.* 1394: 14–23. 2011.
https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.006
29. *Gibson K.R., Neilson I.L., Barrett F., Winterburn T.J., Sharma S., MacRury S.M., Megson I.L.* Evaluation of the antioxidant properties of N-acetylcysteine in human platelets: prerequisite for bioconversion to glutathione for antioxidant and antiplatelet activity. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 54 (4): 319–326. 2009.
https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181b6e77b
30. *Rushworth G.F., Megson I.L.* Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol. Ther.* 141 (2): 150–159. 2014.
https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.09.006

OXYDATIVE STRESS MODULATES PHAGOCYTOSIS OF APOPTOTIC SUBSTRATES BY PRIMARY RAT ASTROCYTES

T. V. Sokolova^{a, #}, M. P. Rychkova^a, N. F. Avrova^a, and M. G. Yefimova^{a, ##}

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: sokolt1956@mail.ru*

^{##}*e-mail: yefimova3@gmail.com*

Brain astrocytes are commonly believed to be relatively tolerant to oxidative stress. In this work, we studied the effect of oxidative stress on the ability of rat brain astrocytes in primary culture to ingest and phagocytose apoptotic substrates. Using fluorescent microscopy, we demonstrated that the ingestion of rat retinal photoreceptor outer segments (POS), used here as a phagocytic substrate, dramatically decreased in astrocytes preincubated with various hydroperoxides. The ability of primary astrocytes to ingest POS also depended on the substrate oxidative status. The ingestion of “oxidized” POS preparations preincubated with hydrogen peroxide was sharply reduced compared to “non-oxidized” POS. We also showed that natural and synthetic antioxidants (α -tocopherol, Trolox) efficiently protected the phagocytic function of astrocytes from oxidative damage. These data suggest that the phagocytic function of rat brain primary astrocytes is extremely vulnerable to oxidative stress, while oxidative stress tolerance characterizes not all functions of these glial cells.

Keywords: astrocytes, phagocytosis, apoptotic substrates, oxidative stress, antioxidants