

ВЛИЯНИЕ ПРОБЕНЕЦИДА НА АКТИВАЦИЮ АСТРОЦИТОВ *IN VITRO*И. И. Бабкина¹, В. В. Мазеева², М. П. Морозова¹, Л. Р. Горбачева^{1,2}✉¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Нейровоспаление развивается в мозговой ткани как при острых повреждениях мозга, так и при нейродегенеративных заболеваниях. От баланса провоспалительных и противовоспалительных факторов будет зависеть исход нейровоспаления и прогноз функционального состояния мозга. Поэтому целью многих исследований является поиск возможных терапевтических мишеней, позволяющих сдвигать ход воспалительной реакции в пользу реализации противовоспалительных механизмов. Показано, что каналы, образованные белками паннексинами экспрессируются во всех клетках мозга, в том числе и в астроцитах. Однако их роль в процессах нейровоспаления пока не ясна. Каналы, сформированные паннексином 1 (Panx1), могут быть вовлечены в провоспалительную активацию астроцитов, индуцируемую тромбином и/или липополисахаридом (ЛПС). Целью исследования было оценить тромбин- и ЛПС-вызванную активацию первичных кортикальных астроцитов мыши в условиях блокады Panx1 пробенецидом. Установлено, что и в случае аппликации тромбина (50 и 100 нМ), и в случае инкубации клеток с ЛПС, происходит изменение функционального профиля астроцитов, изменяется их пролиферация и секреторная активность. Наблюдаемое при этом увеличение секреции NO, β -гексозаминидазы (БГА) и IL6 прекращалось на фоне обработки клеток пробенецидом. Полученные результаты свидетельствуют о возможности рассматривать пробенецид в качестве потенциального агента, влияющего на воспалительный процесс в мозговой ткани путем стабилизации астроцитов через инактивацию Panx1 и снижение астроглиоза.

Ключевые слова: нейровоспаление, пробенецид, паннексин 1, Panx1, астроциты, тромбин, липополисахарид, астроглиоз

Финансирование: работа поддержана Российским научным фондом, грант 22-25-00848.

Вклад авторов: И. И. Бабкина, М. П. Морозова — получение и ведение первичной культуры астроцитов; сбор, интерпретация и статистическая обработка данных, написание рукописи; В. В. Мазеева — получение и ведение первичной культуры астроцитов, интерпретация и статистическая обработка данных; Л. Р. Горбачева — концепция и дизайн эксперимента, интерпретация данных, руководство проектом, написание рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 23/2021 от 13 декабря 2021 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Любовь Руфальевна Горбачева
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; gorb67@mail.ru

Статья получена: 13.12.2023 **Статья принята к печати:** 24.01.2024 **Опубликована онлайн:** 26.02.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.005

EFFECT OF PROBENECID ON ASTROCYTE ACTIVATION *IN VITRO*Babkina II¹, Mазеева VV², Morozova MP¹, Gorbacheva LR^{1,2}✉¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Both acute brain injuries and neurodegenerative diseases are accompanied by neuroinflammation. The outcome of neuroinflammation and the prognosis of brain functional status depend on the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory factors. Many studies are aimed at finding possible therapeutic targets allowing to shift inflammatory response processes towards anti-inflammatory mechanisms. It has been shown that channels formed by pannexin proteins are expressed in all brain cells including astrocytes. However, their role in the processes of neuroinflammation is still unclear. Channels formed by pannexin 1 (Panx1) may be involved in proinflammatory activation of astrocytes induced by thrombin and/or lipopolysaccharide (LPS). The aim of this study was to assess thrombin- and LPS-induced activation of primary mouse cortical astrocytes under Panx1 blockade by probenecid. Functional profile of astrocytes, their proliferation and secretory activity changed both in case of thrombin application (50 nM and 100 nM) and in case of incubating cells with LPS. The observed increasing of nitric oxide (NO), β -hexosaminidase HEX and IL6 secretion stopped after the cells were treated with probenecid. Based on the obtained results, probenecid can be considered as a potential agent influencing the inflammatory process in brain tissue by stabilizing astrocytes through inactivation of Panx1 and reduction of astrogliosis.

Keywords: neuroinflammation, probenecid, pannexin 1, astrocytes, thrombin, lipopolysaccharide, astrogliosis

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation, Project № 22-25-00848.

Author contribution: Babkina II, Morozova MP — obtaining and maintaining primary culture of astrocytes; collection, interpretation and statistical analysis of data, manuscript writing; Mазеева VV — obtaining and maintaining primary culture of astrocytes, interpretation and statistical analysis of data; Gorbacheva LR — conception and design of the experiment, interpretation of data, project management, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethical Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 23/2021 dated December 13, 2021).

✉ **Correspondence should be addressed:** Lyubov R. Gorbacheva,
Ostrovitianova, 1, Moscow, 117997, Russia; gorb67@mail.ru

Received: 13.12.2023 **Accepted:** 24.01.2024 **Published online:** 26.02.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.005

Воспалительный ответ направлен на удаление повреждающего агента и восстановление структурно-функциональной целостности ткани и может сопровождаться как патогенетическими, так и адаптивными изменениями. Запуск острой воспалительной реакции в нервной ткани способен активировать процессы нейрогенеза, ангиогенеза и функциональной пластичности нейронов. Однако хроническое течение воспаления потенцирует

дальнейшую альтерацию клеток и усугубляет ход нейродегенеративных заболеваний, повышая риск развития осложнений и инвалидизации пациентов.

Астроциты — одни из самых многочисленных клеток ЦНС, вовлеченных в реализацию нейровоспаления. Степень их активности в значительной мере определяет исход нейровоспаления. Активированные резидентные и иммунокомпетентные клетки ЦНС, включая микроглию

и астроциты, являются источниками провоспалительных факторов. В результате происходит увеличение проницаемости ГЭБ, инфильтрация иммунных клеток в ткани мозга, дополнительная альтерация, активация системы гемостаза и образование тромбина.

Показано, что развитие нейродегенеративных процессов сопряжено с тромбин-зависимым усилением активации микроглии и опосредовано стимуляцией iNOS, секрецией активных форм кислорода (АФК) и провоспалительных факторов COX2, TNF α , IL1 β , IL6 [1]. Кроме того, тромбин потенцирует пролиферацию астроцитов через активацию PAR1/MAPK-каскада.

Запуск нейровоспаления может быть также вызван экзогенными факторами, например, липополисахаридом (ЛПС), компонентом клеточной стенки бактерий. Основной мишенью ЛПС является рецептор TLR4, экспрессируемый астроцитами, микроглией и эндотелием, а его активация запускает образование провоспалительных медиаторов.

Важную роль в развитии воспалительного ответа с участием астроцитов играют каналы, образованные белками паннексинами. Последние не только обеспечивают транспорт веществ, но и формируют ансамбли с другими ионо- и метаболитными рецепторами, регулируя активность этих рецепторов [2]. Особую роль играет паннексин 1 (Panx1), который широко представлен в ЦНС и экспрессируется нейронами, астроцитами, микроглией, церебральным эндотелием и гладкомышечными клетками [3]. Panx1 регулирует высвобождение из клеток АТФ и других нуклеотидов, сборку инфламмосом и секрецию цитокинов, что определяет его вклад в развитие ряда нейродегенеративных процессов. В связи с этим, Panx1 является потенциальной мишенью для фармакотерапии нейродегенеративных заболеваний и острых повреждений мозга [4, 5].

Потенциальным нейропротектором может быть пробенецид, обладающий широким спектром действия, включая ингибирование Panx1. Показано, что пробенецид способен специфично активировать TRPV2 в сенсорных нейронах и блокировать высвобождение АТФ из клеток как астроцитов, так и микроглии [5, 6]. Поэтому его рассматривают в качестве перспективного препарата для лечения нейродегенеративных и психиатрических заболеваний.

Таким образом, цель настоящего исследования оценить влияние пробенецида, блокатора Panx1, на тромбин- и ЛПС-индуцированную провоспалительную активацию астроцитов мыши *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вещества и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: 10 \times HBSS без Ca²⁺ и Mg²⁺ (Gibco; США), 1 M HEPES (Gibco; США), 10 \times PBS (Gibco; США), BSA (Sigma; США), среда для культивирования клеток DMEM/F12 (Gibco; США), инактивированная телячья сыворотка HI FBS (Gibco; США), пенициллин-стрептомицин (Invitrogen; США), трипсин-ЭДТА (Gibco; США), раствор Версена («Панэко»; Россия); пробенецид (BioQuest; США); тромбин (Sigma; США), липополисахарид *Escherichia coli* O111:B4 (L3024; Sigma, США), WST-1 (Sigma; США), реактив Грисса (Sigma; США), реактив для измерения клеточной пролиферации WST-1 ДНКазы (Sigma; США), Mouse IL6 ELISA kit (abcam ab 222503), Triton \times 100, лизирующий буфер, раствор RIPA и ингибиторы протеаз и фосфатаз, реагент Бредфорда (Bio-Rad; США).

Получение и ведение первичной культуры астроцитов

Первичные кортикальные астроциты выделяли из полушарий мозга мышей линии C57BL/6 в возрасте 0–3 дня. Для получения клеточных культур использовали протокол, описанный ранее [7]. Полушария головного мозга извлекали и помещали в буфер (1 \times HBSS, 100 мМ пирувата натрия и 1M HEPES), промывали и измельчали. Далее гомогенат мозга инкубировали с папаином 0,5 мг/мл (1 \times PBS, L-Cystein-HCl, BSA, глюкоза, 8 мин, 37 °C). Затем гомогенат ресуспендировали в буфере, содержащем ДНКазу (0,01 мг/мл), после чего центрифугировали при 1500 об. в течение 5 мин при +4 °C. Полученный осадок ресуспендировали в буфере (1 \times HBSS с Ca²⁺ и Mg²⁺, 100 мМ пируват натрия, 1M HEPES) и повторно центрифугировали. Осадок ресуспендировали в 1 мл культуральной среды (DMEM/F12, 10% FBS, антибиотик-антимикотик, GlutaMAX). Клетки помещали в культуральные флаконы 25 см² и культивировали 10–12 дней при 37 °C и 5% CO₂. На 2-е и 7-е сутки проводили полную смену среды, удаляя микроглию, помещая флакон с клетками на шейкер на 6–8 ч с последующей заменой среды на свежую. За 4 суток до эксперимента клетки снимали с флакона 0,05%-м раствором трипсина в фосфатно-солевом буфере и помещали в 48-луночные планшеты. Перед экспериментальным воздействием среду в культурах заменяли на бессывороточную на 3 ч с последующим добавлением тромбина в конечной концентрации 50 нМ или 100 нМ или ЛПС в концентрации 100 нг/мл или 1 мкг/мл. Пробенецид 0,1 мМ добавляли за 30 мин до воздействия тромбина или ЛПС. Через 6, 24 и 48 ч проводили измерения.

Измерение выживаемости астроцитов (WST-тест)

Выживаемость оценивали через 24 ч после активации астроцитов с помощью теста WST-1 в соответствие с протоколом производителя. Оптическую плотность образцов измеряли при $\lambda = 450$ нм на планшетном фотометре iMark (BioRad; США). Полученные данные интерпретировали как пролиферацию клеток, предполагая, что вклад клеточной гиперплазии в данных условиях не значителен, и ориентируясь на производителя, представляющего данный тест как WST-1-пролиферативный реагент.

Измерение накопления нитритов в среде культивирования астроцитов

Секрецию оксида азота (NO) оценивали по накоплению в среде культивирования нитритов через 24 ч после инкубации с индукторами воспаления с помощью реактива Грисса. Реактив Грисса при взаимодействии с нитритами образует окрашенные азотсоединения, интенсивность поглощения которых оценивали при $\lambda = 530$ нм на планшетном фотометре iMark (BioRad; США). Результаты представляли в относительных значениях, как секрецию NO одной клеткой, используя отношение уровня нитритов в культуральной среде к количеству клеток в соответствующей лунке планшета, оцененному при помощи WST-теста.

Измерение активности β -гексозаминидазы

Активность β -гексозаминидазы (БГА) оценивали через 24 и 48 ч после активации астроцитов по модифицированному

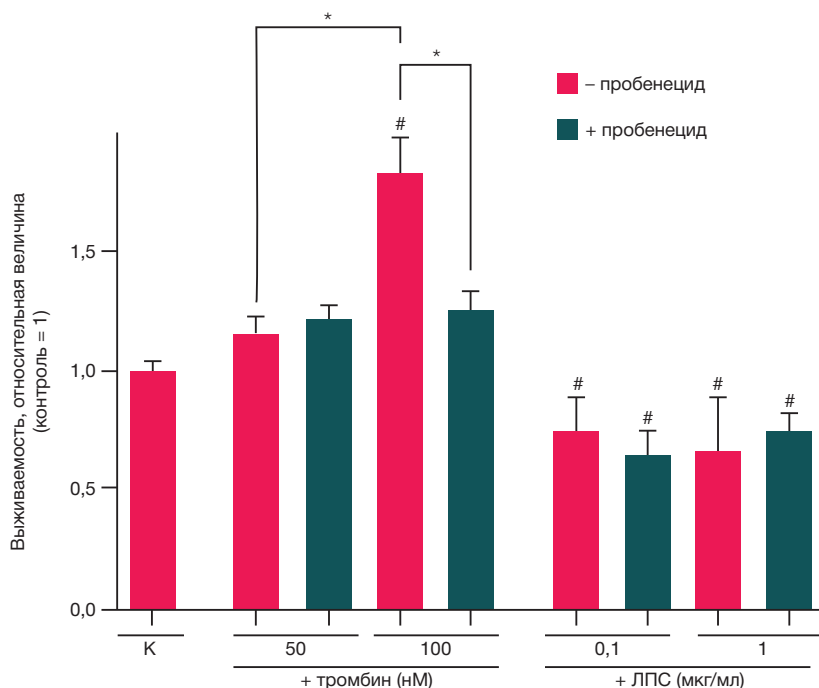


Рис. 1. Влияние блокады Pаnх1 на выживаемость активированных тромбином или ЛПС астроцитов. * — $p < 0,05$, # — $p < 0,05$ (по сравнению с контролем); К — контроль; $n \geq 8$

методу, предложенному Schwartz LB и соавторами [8] в супернатанте и внутриклеточно для последующего расчета секреции фермента по формуле:

$$X / (X + Y) \times 100\%$$

где X — оптическая плотность образца, отражающая активность фермента в среде культивирования за вычетом оптической плотности фона; Y — оптическая плотность образца, отражающего активность внутриклеточного пула фермента за вычетом оптической плотности фона.

Далее секрецию БГА представляли в относительных единицах по отношению к контролю, принятому за 1.

Измерение уровня секреции IL6 астроцитами

Секрецию IL6 через 6 ч после воздействия исследуемых веществ на первичную культуру астроцитов оценивали с помощью коммерческого набора ELISA (Mouse IL6 ELISA kit (abcam ab 222503) в соответствии с протоколом производителя. Предел чувствительности IL6 составлял 30 пг IL6/мл. После воздействия исследуемых веществ отбирали культуральную среду, в которой определяли с помощью набора содержание IL6. Клетки в лунках планшета промывали натрий-фосфатным буфером и лизировали с помощью RIPA-буфера с добавлением ингибиторов протеаз. Лизаты центрифугировали при 14 000 g 15 мин при 4 °C, после чего в супернатанте измеряли содержание общего белка с помощью реактива Бредфорда. Секрецию IL6 представляли в пг/мг общего белка.

Статистическая обработка

Анализ данных производили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc.; США). Нормальность распределения выборок проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения групп использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим апостериорным анализом при

помощи критерия Тьюки. Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка (SEM), различия считали статистически значимыми (*) при $p < 0,05$. Количество экспериментов (n , число посадок астроцитов) указаны в каждом случае отдельно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние пробенецида на выживаемость активированных тромбином и ЛПС астроцитов

Тромбин является одним из участников воспалительного ответа, поскольку система гемостаза одной из первых реагирует на повреждение тканей. В первой серии экспериментов нейровоспаление моделировали добавлением тромбина в среду культивирования астроцитов мыши. Продемонстрировано, что тромбин в концентрации 100 нМ значимо ($p < 0,05$) повышает число живых астроцитов, а обработка клеток пробенецидом снижает данный показатель до контрольных значений, что может свидетельствовать об участии Pаnх1 каналов в тромбин-индуцированной пролиферации астроцитов (рис. 1). В отличие от тромбина, ЛПС в данных условиях во всех используемых концентрациях вызывал снижение выживаемости, что может свидетельствовать о его токсическом действии на астроциты (рис. 1). Пробенецид не изменял эффект ЛПС (рис. 1).

Влияние пробенецида на секрецию NO активированными астроцитами

Увеличение продукции NO в очаге поражения является признаком развития нейровоспаления. Исследование влияния тромбина и ЛПС на секрецию NO астроцитами показало, что через 24 ч после аппликации тромбина 100 нМ, но не 50 нМ происходит значительное накопление нитритов в культуральной среде астроцитов, при этом пробенецид отменяет тромбин-вызванную секрецию NO, что указывает на необходимость участия в данном

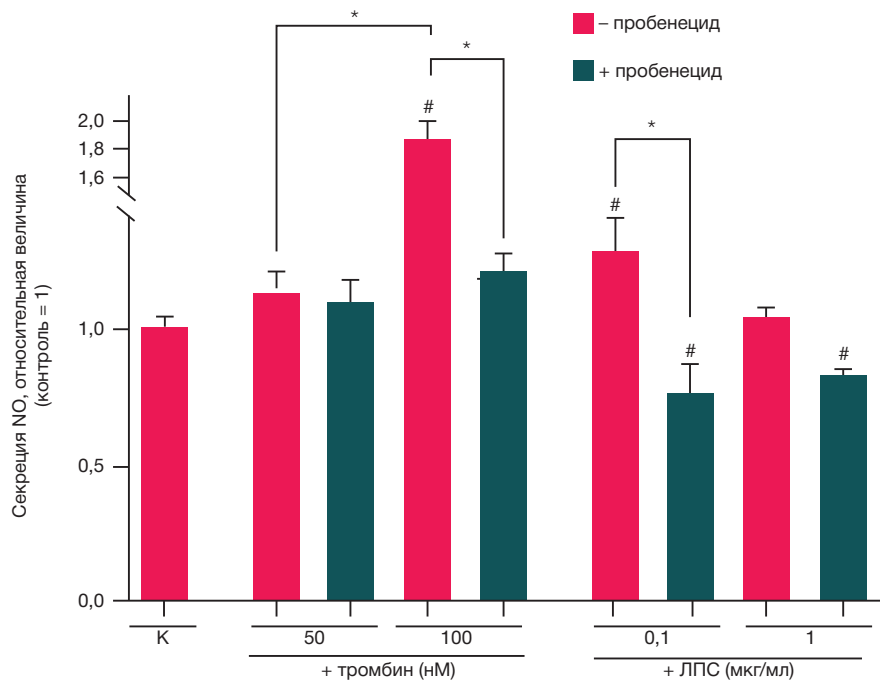


Рис. 2. Влияние блокады каналов Pax1 пробенецидом на секрецию NO астроцитами при их инкубации с тромбином/ЛПС. К — контроль; * — $p < 0,05$, # — $p < 0,05$ по сравнению с контролем, $n \geq 6$

процессе Pax1 (рис. 2). В случае с 24-часовой инкубацией клеток с ЛПС наиболее выраженный рост секреции был обнаружен при концентрации 0,1 мкг/кг ЛПС, который удавалось отменить блокадой Pax1 . При повышении концентрации ЛПС до 1 мкг/кг секреция NO не отличалась от контрольных значений и не зависела от Pax1 (рис. 2).

Влияние пробенецида на секрецию β -гексозаминидазы активированными астроцитами

Другим маркером провоспалительной активации астроцитов может быть высвобождение из клеток лизосомного фермента β -гексозаминидазы (БГА).

Оценку влияния пробенецида на секрецию БГА астроцитами осуществляли через 24 и 48 ч после их активации тромбином в концентрации 50 и 100 нМ и ЛПС 0,1 и 1 мкг/мл. Через 24 ч наблюдали провоспалительное

действие тромбина в концентрации 100 нМ и привлечение к реализации данного эффекта Pax1 , поскольку его блокада пробенецидом значительно снижает секрецию БГА (рис. 3). Апликация ЛПС в концентрации 0,1 мкг/мл вызывала через 24 ч активацию клеток, в отличие от влияния 1 мкг/мл ЛПС (рис. 3). В обоих случаях блокада Pax1 -каналов пробенецидом не изменяла эффекта эндотоксина (рис. 3).

Увеличение времени экспозиции тромбина с 24 до 48 ч привело к более выраженному повышению секреции БГА астроцитами и было опосредовано Pax1 , поскольку на фоне пробенецида данный показатель снижается до контрольных значений (рис. 4). Секреция БГА на фоне ЛПС, аналогично тромбину, более выражена через 48 ч после воздействия. При этом противовоспалительный эффект пробенецида проявляется только на фоне ЛПС в концентрации 1 мкг/мл — секреция БГА клетками снижается до уровня контроля (рис. 4).

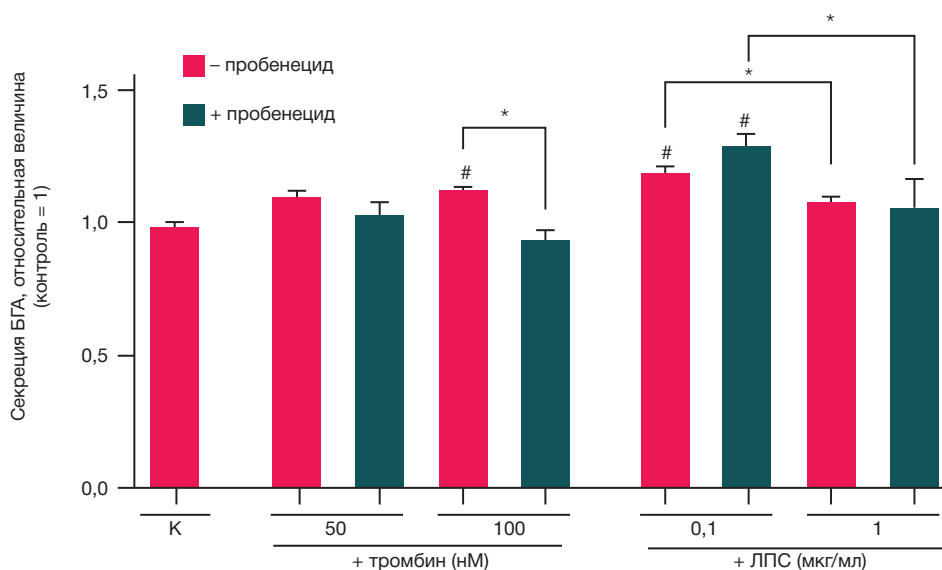


Рис. 3. Влияние блокады Pax1 на тромбин/ЛПС-вызванную секрецию БГА астроцитами мыши. Секрецию БГА оценивали через 24 ч после воздействия тромбина/ЛПС. К — контроль; * — $p < 0,05$, # — $p < 0,05$ по сравнению с контролем, $n \geq 6$

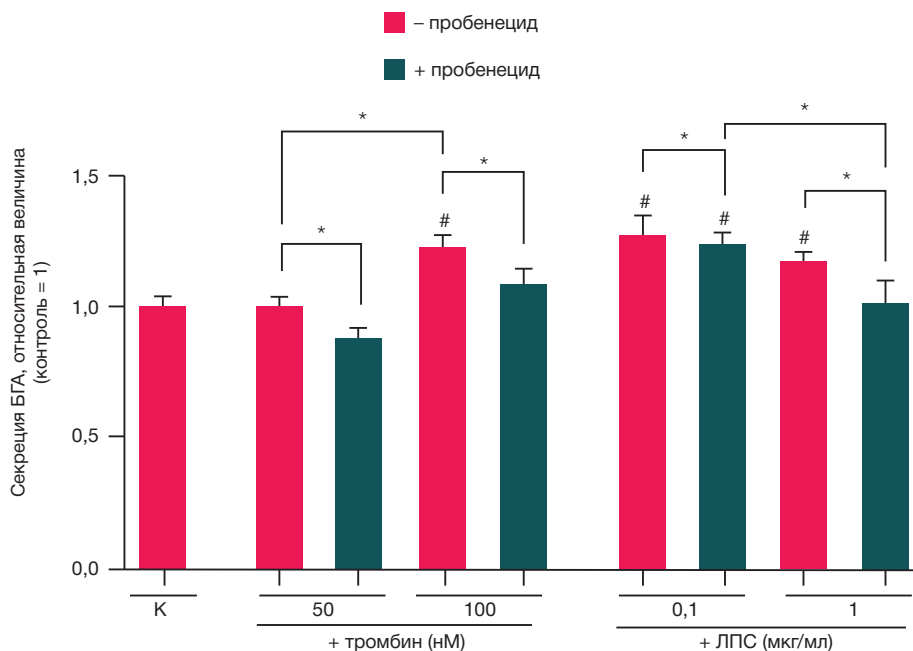


Рис. 4. Влияние блокады Panx1 на тромбин/ЛПС-вызванную секрецию БГА астроцитами мыши. Секрецию БГА оценивали через 48 ч после воздействия тромбина/ЛПС. К — контроль; * — $p < 0,05$, # — $p < 0,05$ по сравнению с контролем, $n \geq 6$

Влияние пробенецида на секрецию IL6 активированными астроцитами

Активация астроцитов сопряжена с секрецией провоспалительных цитокинов, в частности, IL6. Высокие концентрации тромбина и ЛПС вызвали увеличение уровня секреции IL6 через 6 ч после индукции. При этом эффект ЛПС был в 2 раза более выраженным по сравнению с действием тромбина ($p < 0,05$). Таким образом, ЛПС оказался более специфичным провоспалительным агентом. Пробененид в обоих случаях имел противовоспалительный эффект и отменял провоспалительную активацию астроцитов, вызванную как тромбином, так и ЛПС, существенно снижая уровень секреции IL6 (рис. 5), что указывает на участие Panx1 в реализации секреторной функции реактивных астроцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хроническое нейровоспаление является патогенетическим фактором, запускающим процессы нейродегенерации и повышающим риск необратимого повреждения ЦНС. Астроциты, наиболее многочисленные клетки мозга, обеспечивающие взаимодействие глии и нейронов, могут участвовать в регуляции нейровоспаления. Провоспалительная активация астроцитов сопряжена с усилением их пролиферативной и секреторной активности и может сопровождаться открытием каналов Panx1 [9].

Высвобождение АТФ из клеток, в том числе через Panx1, является сигналом для множества функций: от миграции, пролиферации и роста в физиологических условиях до запуска нейровоспаления и нейродегенерации при патологических состояниях. Эффекты АТФ реализуются

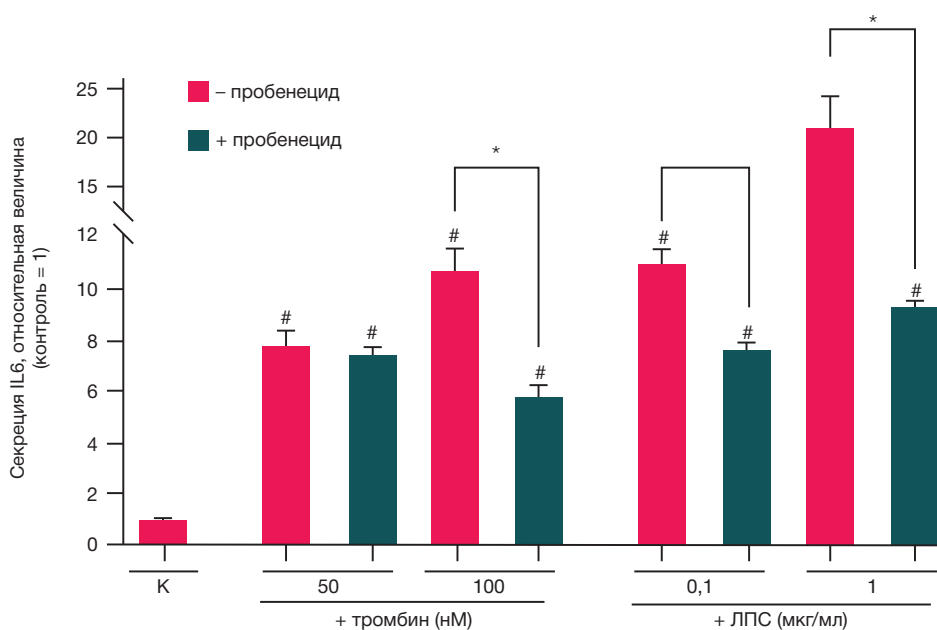


Рис. 5. Влияние блокады Panx1 на секрецию IL6 астроцитами мыши под воздействием тромбина/ЛПС в течение 6 ч. К — контроль; * — $p < 0,05$, # — $p < 0,05$ по сравнению с контролем, $n \geq 3$

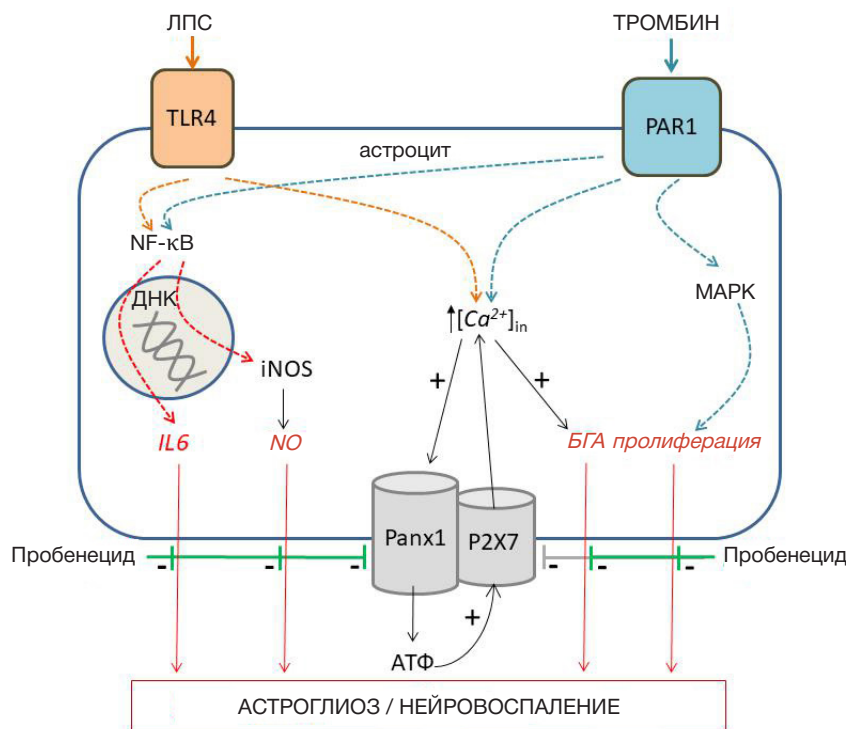


Рис. 6. Влияние пробенецида на тромбин/ЛПС-вызванную активацию астроцитов

через пуриnergические рецепторы: лиганд-управляемые ионные каналы (P2X) и метаболитные рецепторы, связанные с G-белком (P2Y). В запуске нейровоспаления важная роль принадлежит P2X7-рецепторам. Таким образом, пробенецид через блокаду Panx1 способен ограничивать высвобождение АТФ и опосредованно — пуриnergическую передачу сигналов [6]. Однако есть сведения, что пробенецид может непосредственно блокировать P2X7-рецепторы [10].

Интересно, что кооперация Panx1 с рецепторами P2Y1 и P2Y2 через PLC-каскад вызывает рост уровня Ca^{2+} в клетке, что повышает активацию Panx1 [11]. Предположительно Ca -индуцированная активация Panx1 происходит через фосфорилирование CaMKII, открытие Panx1 и высвобождение АТФ [12].

При ишемии головного мозга и развитии эксайтотоксичности происходит гиперактивация NMDAR, что активирует Panx1 и запускает проапоптотические сигналы [13]. Активация Panx1 инициирует сборку инфламмасом — мультимерных белковых комплексов в цитозоле всех клеток, которые контролируют воспалительную реакцию. Активация инфламмасы обеспечивает появление активной формы провоспалительной каспазы-1, которая расщепляет про-IL1 β и про-IL18 с образованием зрелых цитокинов IL1 β и IL18 [3, 6]. Через каспазу-1 запускается и пироптоз — провоспалительная форма гибели клеток, сопровождающаяся высвобождением провоспалительных сигналов. Высвобождение АТФ, например через Panx1, в окружающую среду и последующая активация P2X7R также ведут к активации воспалительных процессов, сборке инфламмасом и продукции IL1 β [6].

Интересно, что в системе совместного культивирования нейроны-астроциты АТФ и глутамат, высвобождаемые из астроцитов, обработанных кондиционированной средой от активированной микроглии, вызывают гибель нейронов за счет активации Panx1 нейронов [14]. Таким образом, Panx1 регулирует высвобождение АТФ и других нуклеотидов,

сборку инфламмасом и секрецию цитокинов, что может определять его вклад в развитие нейродегенерации. Поэтому Panx1 является потенциальной мишенью для фармакотерапии нейродегенеративных заболеваний и острых повреждений мозга. Показано возможное сопряжение PAR1 с каналами Panx1 [15].

Нами продемонстрирован рост числа астроцитов под действием тромбина (рис. 1). Подобный эффект может быть сопряжен с тромбин/PAR1-опосредуемым фосфорилированием ERK1/2 или активацией PLC ϵ , которая в свою очередь регулирует MAPK/NF- κ B-внутриклеточный каскад [16]. Этот эффект может быть также связан с запуском тромбин/PAR1-зависимой секрецией IL6 астроцитами и передачей дальнейшего сигнала через IL6/STAT3-путь, развитием астроглиоза, в том числе увеличением уровня кислого фибриллярного белка астроцитов (GFAP) и виментина. В работе показано, что пробенецид ингибирует тромбин-опосредованный рост числа астроцитов и возвращает данный показатель к контрольным значениям, что указывает на возможность вовлечения Panx1-каналов в данный процесс. Это согласуется с данными, полученными на эпителиальных клетках легких и эндотелиоцитах человека, где продемонстрирована тромбин-зависимая активация каналов Panx1 [15, 17]. Однако механизмы подобной кооперации еще предстоит изучить.

Для моделирования воспалительного ответа в эксперименте широко применяют провоспалительный фактор ЛПС. Известно, что провоспалительную активацию клеток под действием ЛПС опосредует TLR4. Через TLR4 запускается активация всего ансамбля факторов, включая NF- κ B, через сигнальный комплекс MyD88-IRAK-TRAF6-TAK1 [18]. В результате возможны изменение пролиферации астроцитов, экспрессия провоспалительных цитокинов через активацию MAPK/NF- κ B [19]. Кроме этого, показано, что в ЛПС-опосредованном воспалении может быть задействован каскад Akt/ERK/JNK, поскольку при его блокаде снижалась секреция

провоспалительных цитокинов [20]. Существуют данные о ЛПС/TLR4-зависимом повышении уровня пролиферации астроцитов мыши.

В настоящей работе показано, что ЛПС снижает выживаемость клеток, но активирует секрецию первичных культивируемых кортикальных астроцитов мыши. Ожидается, что вызванная ЛПС активация астроцитов приводила к стойкому увеличению секреции провоспалительного интерлейкина IL6 (рис. 5) и в меньшей степени — NO и БГА (рис. 3, 4). Интересно, что блокада Pаnх1-каналов пробенецидом значимо снижала ЛПС-вызванную провоспалительную секрецию астроцитов.

Провоспалительная активация астроцитов сопровождается увеличением продукции множества хемокинов, цитокинов, а также активацией индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и секрецией NO [21, 22]. Показано, что повышение образования NO сопутствует течению многих нейродегенеративных заболеваний, например болезни Альцгеймера и Паркинсона, а также может участвовать в образовании активных форм азота, оказывая цитотоксическое действие на нервные клетки [23, 24]. В астроцитах индукторами синтеза NO могут выступать как эндогенные, так и экзогенные провоспалительные факторы [21, 24]. Так, нами показано повышение секреции NO первичными астроцитами мыши под действием тромбина и ЛПС (рис. 3). Ранее на клетках астроцитомы были продемонстрированы PAR1-опосредованная секреция NO и активация iNOS [25]. Наблюдаемая нами тромбин-вызванная продукция NO культивируемыми астроцитами при блокаде Pаnх1 пробенецидом снижалась (рис. 3). Этот факт указывает на возможность кооперации тромбинового рецептора PAR1 и Pаnх1. Известно, что активацию Pаnх1-канала может индуцировать высокая концентрация внутриклеточного Ca^{2+} , которая, в свою очередь, может быть следствием активации сигнального пути тромбин/PAR1/Gq/PKC/IP3 [4]. Pаnх1-зависимый выброс АТФ через P2X7 усиливает тромбин-вызванное увеличение внутриклеточного кальция [26] и активацию nNOS и eNOS в астроцитах.

Нами показано, что ЛПС-стимулируемая секреция NO астроцитами так же, как и вызванная тромбином, отменяется в присутствии пробенецида (рис. 2). Другие исследователи наблюдали зависимость эффектов ЛПС от Pаnх1 на НК-2-клетках. Например, обнаружено облегчение течения ЛПС-индуцированного воспаления на фоне блокады Pаnх1, выраженное в ингибировании NLRP3 и снижении экспрессии Вах и Bcl2 [27].

Известно, что уровень активации иммунокомпетентных клеток (макрофагов, тучных клеток) может быть оценен по уровню секреции БГА. В нашей работе мы оценили по субстрат-ферментной реакции активность БГА в среде культивирования астроцитов через 24 и 48 ч после аппликации тромбина и ЛПС. Как в случае действия тромбина, так и ЛПС увеличение секреции БГА было более выражено через 48 ч, что, вероятно, связано с «отставленной» активацией астроцитов по принципу положительной обратной связи. Эти результаты согласуются с данными о тромбин-зависимом росте секреции БГА в тромбоцитах и тучных клетках, на которых показано вовлечение P2X7 рецепторов в активацию дегрануляции [28].

К специфичным маркерам воспаления относится провоспалительный цитокин IL6. Анализ его уровня в исследуемых нами культурах астроцитов подтвердил выраженный провоспалительный эффект как тромбина, так и, в большей степени, ЛПС (рис. 5). Подобный

провоспалительный эффект тромбина был ранее показан на астроцитах [29]. Данный эффект протеазы связывают с тромбин/PAR1-зависимой активацией белка G12/13, запускающего каскад RhoGEF/RhoA/фосфолипаза Cε — DAG и PKC — PKD, завершающийся повышением экспрессии IL6, COX-2 и других провоспалительных генов [30]. Выраженное провоспалительное действие ЛПС на астроциты с индукцией секреции IL6 было так же продемонстрировано другими исследователями [31]. Вместе с тем, в настоящем исследовании мы впервые показали пробенецид-зависимое снижение тромбин- и ЛПС-вызванной секреции IL6 на первичных культурах астроцитов (рис. 6). Z. Zhang с соавторами при сепсисе в гипотампе, а L. Wei с коллегами на клетках U87-MG наблюдали пробенецид-вызванное ингибирование экспрессии TNFα, IL6, IL1β и IL8, в том числе в присутствии ЛПС [19, 32]. В то же время существуют работы, которые не подтверждают участие Pаnх1 и потенциальных гетеродимеров P2X4/P2X7 в P2X7-зависимом высвобождении IL6, CCL2 и TNFα в микроглии [33].

В качестве потенциального нейропротектора мы исследовали эффекты пробенецида, вещества с широким спектром действия. Пробенецид свободно проникает через ГЭБ благодаря высокой растворимости в липидах. Он способен взаимодействовать с мембранными белками-каналами TRPV2 и переносчиками органических анионов (OAT1-3) и катионов (OCT1-3), а также полуканалами, образованными Pаnх1, что указывает на его потенциальное терапевтическое использование, например, в качестве адъюванта для увеличения биодоступности некоторых лекарств в ЦНС. Перспективным и интересным видится применение пробенецида в качестве блокатора полуканалов Pаnх1 для подавления нейровоспаления, являющегося нейродегенеративным компонентом многих заболеваний ЦНС [6]. Учитывая множественность активирующих Pаnх1 стимулов и полифункциональность его эффектов, важно учитывать двойственность эффектов пробенецида: с одной стороны, он может запускать провоспалительные эффекты, сдерживая активацию инфламмосом, с другой стороны, снижение глияльно-нейронального взаимодействия и пластичности повышает риск дополнительного повреждения ткани. В пользу противовоспалительного и нейропротекторного действия пробенецида указывает снижение на фоне его воздействия уровня экспрессии AQP4, NLRP3 и каспазы-1 в культуре астроцитов при кислородно-глюкозной депривации [34]. Пробенецид повышал выживаемость астроцитов через снижение продукции АФК и подавление экспрессии NLRP3, каспазы-1 и IL1β [6].

Таким образом, применение пробенецида, ингибитора Pаnх1, в качестве противовоспалительного агента (рис. 6), может представлять интерес при разработке новых направлений эффективного контроля нейровоспаления, одного из важных факторов, потенцирующих повреждение мозга при травмах и нейродегенеративных заболеваниях [35, 36].

ВЫВОДЫ

Провоспалительная активация астроцитов мышей аппликацией тромбина (50 и 100 нМ) и липополисахарида (0,1 и 1 мкг/мл) приводила к изменению их функционального профиля, сопровождающегося изменением пролиферации и секреторной активности клеток. При этом на фоне ЛПС наблюдается наиболее выраженное повышение секреции IL6, в отличие от тромбина, который оказывал более

выраженное действие на секрецию NO и пролиферацию астроцитов. Продemonстрировано, что индуцируемую этими факторами секрецию NO, БГА и IL6 отменял пробенецид, блокатор каналов Pannx1. Интересно, что пробенецид отменял влияние тромбина на пролиферацию астроцитов, но не на эффект ЛПС. Выраженность ингибирования секреции IL6 и БГА пробенецидом так же различалась на фоне ЛПС и тромбина. Полученные

результаты свидетельствуют о возможном участии каналов, образованных Pannx1, в тромбин- и липополисахарид-вызванной провоспалительной активации астроцитов и индукции астроглиоза. Однако поиск механизмов и ключевых участников сигнального каскада, запускаемого в условиях тромбин- и ЛПС-вызванного нейровоспаления на фоне предобработки клеточных культур пробенецидом, требует дальнейшего исследования.

Литература

- Choi SH, Da YL, Seung UK, Byung KJ. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons in vivo: Role of microglial NADPH oxidase. *Journal of Neuroscience*. 2005; 25: 4082–90.
- D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, De Bock M, et al. Pannexin channels in ATP release and beyond: An unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cellular Signalling*. 2011; 23: 305–16.
- Koval M, Cwiek A, Carr T, Good ME, Lohman AW, Isakson BE. Pannexin 1 as a driver of inflammation and ischemia–reperfusion injury. *Purinergic Signalling*. 2021; 17: 521–31.
- Galkov MD, Surin AM, Lisina OYu, Gorbacheva LR. Neurodegeneration and Neuroinflammation: The Role of Pannexin 1. *Neurochemical Journal*. 2023; 17: 727–39.
- Rusiecka OM, Tournier M, Molica F, Kwak BR. Pannexin1 channels — a potential therapeutic target in inflammation. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 1020826.
- García-Rodríguez C, Mujica P, Illanes-González J, López A, Vargas C, Sáez JC, et al. Probenecid, an Old Drug with Potential New Uses for Central Nervous System Disorders and Neuroinflammation. *Biomedicines*. 2023; 11.
- Иванова А. Е., Горбачева Л. Р., Струкова С. М., Пинелис В. Г., Райзер Г. Участие активированного протеина С и тромбина в регуляции функций астроцитов. *Биол мембраны*. 2013; 30: 387–97.
- Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic Release of β -Hexosaminidase and β -Glucuronidase from Purified Rat Serosal Mast Cells. *The Journal of Immunology*. 1979; 123: 1445–50.
- Penuela S, Gehi R, Laird DW. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et Biophysica Acta — Biomembranes*. 2013; 1828: 15–22.
- Bhaskaracharya A, Dao-Ung P, Jalilian I, Spildrejorde M, Skarratt KK, Fuller SJ, et al. Probenecid Blocks Human P2X7 Receptor-Induced Dye Uptake via a Pannexin-1 Independent Mechanism. *PLoS ONE*. 2014; 9: e93058.
- Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Letters*. 2006; 580: 239–44.
- Yang K, Xiao Z, He X, Weng R, Zhao X, Sun T. Mechanisms of Pannexin 1 (PANX1) Channel Mechanosensitivity and Its Pathological Roles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23.
- Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*. 2010; 47: 122–9.
- Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MVL, Naus CC, et al. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *Journal of Neurochemistry*. 2011; 118: 826–40.
- Gödecke S, Roderigo C, Rose CR, Rauch BH, Gödecke A, Schrader J. Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012; 302: 915–23.
- Chen X, Zhang H, Hao H, Zhang X, Song H, He B, et al. Thrombin induces morphological and inflammatory astrocytic responses via activation of PAR1 receptor. *Cell Death Discovery*. 2022; 8.
- Seminario-Vidal L, Kreda S, Jones L, O'Neal W, Trejo JA, Boucher RC, et al. Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of Rho- and Ca²⁺-dependent signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284: 20638–48.
- Fiebich BL, Batista CRA, Saliba SW, Yousif NM, de Oliveira ACP. Role of microglia TLRs in neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018; 12.
- Zhang Z, Lei Y, Yan C, Mei X, Jiang T, Ma Z, et al. Probenecid Relieves Cerebral Dysfunction of Sepsis by Inhibiting Pannexin 1-Dependent ATP Release. *Inflammation*. 2019; 42: 1082–92.
- Yu D-K, Lee B, Kwon M, Yoon N, Shin T, Kim N-G, et al. Phlorofucofuroeckol B suppresses inflammatory responses by down-regulating nuclear factor κ B activation via Akt, ERK, and JNK in LPS-stimulated microglial cells. *International Immunopharmacology*. 2015; 28: 1068–75.
- Kozuka N, Itofusa R, Kudo Y, Morita M. Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines require different astrocyte states to induce nitric oxide production. *J of Neuroscience Research*. 2005; 82: 717–28.
- Chen Q, Liang Z, Yue Q, Wang X, Siu SWI, Pui-Man Hoi M, et al. A Neuropeptide Y/F-like Polypeptide Derived from the Transcriptome of *Turbinaria peltata* Suppresses LPS-Induced Astrocytic Inflammation. *J Nat Prod*. 2022; 85: 1569–80.
- Liu B, Gao H-M, Wang J-Y, Jeohn G-H, Cooper CL, Hong J-S. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 962: 318–31.
- Li T, Xu T, Zhao J, Gao H, Xie W. Depletion of iNOS-positive inflammatory cells decelerates neuronal degeneration and alleviates cerebral ischemic damage by suppressing the inflammatory response. *Free Radic Biol Med*. 2022; 181: 209–20.
- Boven LA, Vergnolle N, Henry SD, Silva C, Imai Y, Holden J, et al. Up-Regulation of Proteinase-Activated Receptor 1 Expression in Astrocytes During HIV Encephalitis. *The Journal of Immunology*. 2003; 170: 2638–46.
- Isakson BE, Thompson RJ. Pannexin-1 as a potentiator of ligand-gated receptor signaling. *Channels*. 2014; 8: 118–23.
- Huang G, Bao J, Shao X, Zhou W, Wu B, Ni Z, et al. Inhibiting pannexin-1 alleviates sepsis-induced acute kidney injury via decreasing NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis. *Life Sciences*. 2020; 254.
- Wareham KJ, Seward EP. P2X7 receptors induce degranulation in human mast cells. *Purinergic Signalling*. 2016; 12: 235–46.
- Ponath G, Park C, Pitt D. The role of astrocytes in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9.
- Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, et al. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*. 2004; 76 (2): 265–76.
- Krasovska V, Doering LC. Regulation of IL6 secretion by astrocytes via TLR4 in the fragile X mouse model. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018; 11: 272.
- Wei L, Sheng H, Chen L, Hao B, Shi X, Chen Y. Effect of pannexin-1 on the release of glutamate and cytokines in astrocytes. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2016; 23: 135–41.
- Shieh CH, Heinrich A, Serchov T, van Calker D, Biber K. P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL6, CCL2, and TNF- α in cultured mouse microglia. *GLIA*. 2014; 62: 592–607.
- Jian Z, Ding S, Deng H, Wang J, Yi W, Wang L, et al. Probenecid protects against oxygen–glucose deprivation injury in primary

astrocytes by regulating inflammasome activity. *Brain Research*. 2016; 1643: 123–9.

35. Hainz N, Wolf S, Tschernig T, Meier C. Probenecid Application Prevents Clinical Symptoms and Inflammation in Experimental

Autoimmune Encephalomyelitis. *Inflammation*. 2016; 39: 123–8.

36. Wang Q, Li H, Ling Z, Chen G, Wei Z-Y. Inhibition of Schwann cell pannexin 1 attenuates neuropathic pain through the suppression of inflammatory responses. *J Neuroinflammation*. 2022; 19: 244.

References

- Choi SH, Da YL, Seung UK, Byung KJ. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons in vivo: Role of microglial NADPH oxidase. *Journal of Neuroscience*. 2005; 25: 4082–90.
- D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, De Bock M, et al. Pannexin channels in ATP release and beyond: An unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cellular Signalling*. 2011; 23: 305–16.
- Koval M, Cwiek A, Carr T, Good ME, Lohman AW, Isakson BE. Pannexin 1 as a driver of inflammation and ischemia–reperfusion injury. *Purinergic Signalling*. 2021; 17: 521–31.
- Galkov MD, Surin AM, Lisina OYu, Gorbacheva LR. Neurodegeneration and Neuroinflammation: The Role of Pannexin 1. *Neurochemical Journal*. 2023; 17: 727–39.
- Rusiecka OM, Tournier M, Molica F, Kwak BR. Pannexin1 channels — a potential therapeutic target in inflammation. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 1020826.
- García-Rodríguez C, Mujica P, Illanes-González J, López A, Vargas C, Sáez JC, et al. Probenecid, an Old Drug with Potential New Uses for Central Nervous System Disorders and Neuroinflammation. *Biomedicines*. 2023; 11.
- Ivanova AE, Gorbacheva LR, Strukova SM, Pinelic VG, Rajzer G. Uchastie aktivirovannogo proteina S i trombina v regulaciji funkcij astrocitov. *Biol membrany*. 2013; 30: 387–97.
- Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic Release of β -Hexosaminidase and β -Glucuronidase from Purified Rat Serosal Mast Cells. *The Journal of Immunology*. 1979; 123: 1445–50.
- Penuela S, Gehi R, Laird DW. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et Biophysica Acta — Biomembranes*. 2013; 1828: 15–22.
- Bhaskaracharya A, Dao-Ung P, Jalilian I, Spildrejrde M, Skarratt KK, Fuller SJ, et al. Probenecid Blocks Human P2X7 Receptor-Induced Dye Uptake via a Pannexin-1 Independent Mechanism. *PLoS ONE*. 2014; 9: e93058.
- Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Letters*. 2006; 580: 239–44.
- Yang K, Xiao Z, He X, Weng R, Zhao X, Sun T. Mechanisms of Pannexin 1 (PANX1) Channel Mechanosensitivity and Its Pathological Roles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23.
- Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*. 2010; 47: 122–9.
- Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MVL, Naus CC, et al. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *Journal of Neurochemistry*. 2011; 118: 826–40.
- Gödecke S, Roderigo C, Rose CR, Rauch BH, Gödecke A, Schrader J. Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012; 302: 915–23.
- Chen X, Zhang H, Hao H, Zhang X, Song H, He B, et al. Thrombin induces morphological and inflammatory astrocytic responses via activation of PAR1 receptor. *Cell Death Discovery*. 2022; 8.
- Seminario-Vidal L, Kreda S, Jones L, O'Neal W, Trejo JA, Boucher RC, et al. Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of Rho- and Ca²⁺-dependent signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284: 20638–48.
- Fiebich BL, Batista CRA, Saliba SW, Yousif NM, de Oliveira ACP. Role of microglia TLRs in neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018; 12.
- Zhang Z, Lei Y, Yan C, Mei X, Jiang T, Ma Z, et al. Probenecid Relieves Cerebral Dysfunction of Sepsis by Inhibiting Pannexin 1-Dependent ATP Release. *Inflammation*. 2019; 42: 1082–92.
- Yu D-K, Lee B, Kwon M, Yoon N, Shin T, Kim N-G, et al. Phlorofucofuroeckol B suppresses inflammatory responses by down-regulating nuclear factor κ B activation via Akt, ERK, and JNK in LPS-stimulated microglial cells. *International Immunopharmacology*. 2015; 28: 1068–75.
- Kozuka N, Itofusa R, Kudo Y, Morita M. Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines require different astrocyte states to induce nitric oxide production. *J of Neuroscience Research*. 2005; 82: 717–28.
- Chen Q, Liang Z, Yue Q, Wang X, Siu SWI, Pui-Man Hoi M, et al. A Neuropeptide Y/F-like Polypeptide Derived from the Transcriptome of *Turbinaria peltata* Suppresses LPS-Induced Astrocytic Inflammation. *J Nat Prod*. 2022; 85: 1569–80.
- Liu B, Gao H-M, Wang J-Y, Jeohn G-H, Cooper CL, Hong J-S. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 962: 318–31.
- Li T, Xu T, Zhao J, Gao H, Xie W. Depletion of iNOS-positive inflammatory cells decelerates neuronal degeneration and alleviates cerebral ischemic damage by suppressing the inflammatory response. *Free Radic Biol Med*. 2022; 181: 209–20.
- Boven LA, Vergnolle N, Henry SD, Silva C, Imai Y, Holden J, et al. Up-Regulation of Proteinase-Activated Receptor 1 Expression in Astrocytes During HIV Encephalitis. *The Journal of Immunology*. 2003; 170: 2638–46.
- Isakson BE, Thompson RJ. Pannexin-1 as a potentiator of ligand-gated receptor signaling. *Channels*. 2014; 8: 118–23.
- Huang G, Bao J, Shao X, Zhou W, Wu B, Ni Z, et al. Inhibiting pannexin-1 alleviates sepsis-induced acute kidney injury via decreasing NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis. *Life Sciences*. 2020; 254.
- Wareham KJ, Seward EP. P2X7 receptors induce degranulation in human mast cells. *Purinergic Signalling*. 2016; 12: 235–46.
- Ponath G, Park C, Pitt D. The role of astrocytes in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9.
- Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, et al. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*. 2004; 76 (2): 265–76.
- Krasovska V, Doering LC. Regulation of IL6 secretion by astrocytes via TLR4 in the fragile X mouse model. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018; 11: 272.
- Wei L, Sheng H, Chen L, Hao B, Shi X, Chen Y. Effect of pannexin-1 on the release of glutamate and cytokines in astrocytes. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2016; 23: 135–41.
- Shieh CH, Heinrich A, Serchov T, van Calker D, Biber K. P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL6, CCL2, and TNF- α in cultured mouse microglia. *GLIA*. 2014; 62: 592–607.
- Jian Z, Ding S, Deng H, Wang J, Yi W, Wang L, et al. Probenecid protects against oxygen–glucose deprivation injury in primary astrocytes by regulating inflammasome activity. *Brain Research*. 2016; 1643: 123–9.
- Hainz N, Wolf S, Tschernig T, Meier C. Probenecid Application Prevents Clinical Symptoms and Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Inflammation*. 2016; 39: 123–8.
- Wang Q, Li H, Ling Z, Chen G, Wei Z-Y. Inhibition of Schwann cell pannexin 1 attenuates neuropathic pain through the suppression of inflammatory responses. *J Neuroinflammation*. 2022; 19: 244.