

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Чистяков Дмитрий Викторович

**ОМИКСНЫЕ ПОДХОДЫ В ИЗУЧЕНИИ ВЗАИМОСВЯЗИ
ПРОФИЛЯ ОКСИЛИПИНОВ С ИЗМЕНЕНИЯМИ СИСТЕМЫ
ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА: КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ И
ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА**

1.5.8. - Математическая биология, биоинформатика

1.1.10 - Биомеханика и биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2024

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

Научный консультант: **Сергеева Марина Глебовна**
доктор химических наук

Официальные оппоненты: **Шайтан Алексей Константинович**
доктор физико-математических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Пустыльняк Владимир Олегович
доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией молекулярной патологии института медицины и медицинских технологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Шеваль Евгений Валерьевич
доктор биологических наук, заведующий лабораторией ультраструктуры клеточного ядра научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится 4 декабря 2024 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.10 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3112>

Автореферат разослан « ___ » сентября 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химический наук

И.В. Шаповалова

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

TLR - Толл-подобный рецептор

LPS - липополисахарид

PC - поли I:C

TNF α - фактор некроза опухоли альфа

12-ННТ - 12-гидроксигептадекатреновая кислота

AA - арахидоновая кислота

DHA - докозагексаеновая кислота

EPA - эйкозапентаеновая кислота

COX - циклооксигеназа

LOX - липоксигеназа

CYP - цитохром P450

НЕТЕ - гидроксикокозатетраеновые кислоты,

НДоНЕ - гидроксидокозагексаеновые кислоты

HAS - гиалуронансинтаза

HYAL - гиалуронидаза

ДЭГ - дифференциально экспрессирующийся ген

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Достижения геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики последних десятилетий не только создали “омиксные” технологии и дали новые методологические подходы к анализу данных и их интеграции, но и позволили на новом уровне изучать такие сложные системы, как врожденный иммунитет и воспаление.

Формирование представлений о том, что система врожденного иммунитета и связанные с ней воспалительные процессы вовлечены в широкий спектр проблем психического и физического здоровья, относят к важнейшим открытиям последних двух десятилетий в области медицины. В структуре заболеваемости и смертности во всем мире более 50% смертей приходится на заболевания связанные с хроническим воспалением, такие как ишемическая болезнь сердца, инсульт, рак, сахарный диабет и диабет 2 типа, ряд болезней почек и печени, аутоиммунные и нейродегенеративные состояния.

Открытие и интенсивные исследования молекулярных носителей системы врожденного иммунитета, в первую очередь, сигнальной системы Толл-подобных рецепторов (TLR), расширили наши представления о воспалении, позволили изучать патологические процессы на клеточном и молекулярном уровнях. TLR обнаружены практически на всех клетках организма человека, их активация приводит к синтезу цитокинов, оксипинонов и активации сигнальных каскадах на молекулярном уровне в

ответ на провоспалительные стимулы. Омиксные подходы открывают возможность изучать эти молекулярные характеристики в единой системе, соотносить данные белковых маркеров воспаления и оксипинов.

Оксипины – это обширное семейство биологически активных веществ, которые образуются при окислении полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Общеизвестна группа оксипинов – эйкозаноиды (простагландины, лейкотриены и др.), происходящая из арахидоновой кислоты (АА, C20:4 ω -6). В последние годы появились многочисленные работы о метаболизме и биологической активности оксипинов, происходящих из докозагексаеновой (DHA, C22:6 ω -3), эйкозапентаеновой (EPA, C20:5 ω -3), линолевой (LA, C18:2 ω -6) и других ПНЖК. Выделяют несколько полиферментных каскадов образования оксипинов, которые называют по ключевым ферментам: циклооксигеназный (COX-), липоксигеназный (LOX-), эпоксигеназный (CYP-) пути метаболизма оксипинов. Также выделяют превращение ПНЖК по анандамидному пути (ферменты эндоканнабиноидной системы) и неферментативный путь окисления. Образующиеся соединения (более 200 молекул идентифицированных на текущий момент) проявляют физиологическую активность, действуя через специфические G-белок сопряженные рецепторы плазматической мембраны, связываясь с ядерными рецепторами PPAR или другими транскрипционными факторами и белками. Функции оксипинов многочисленны: участие в апоптозе, восстановлении тканей, свертывании крови, пролиферации клеток, проницаемости кровеносных сосудов, воспалении, иммунном ответе, регуляции артериального давления и др. Значительный интерес к ПНЖК и оксипинам вызван тем, что они входят в систему врожденного иммунитета и при активации этой системы высвобождаются наряду с различными цитокинами. Более того, подобно цитокинам, оксипины бывают как провоспалительными (например, простагландин E₂, стимулирующий развитие воспаления), так и противовоспалительными веществами и медиаторами разрешения воспаления (например, DHA-производные, образующиеся по LOX-пути).

Совершенствование методов масс-спектрометрии в последнее десятилетие, в первую очередь метода жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), позволило проводить одновременное количественное определение широкого спектра оксипинов, т.е. получать омиксные данные — профили оксипинов. Это расширило представление о биологической роли этих соединений при заболеваниях, стимулировало поиск среди оксипинов биомаркеров для диагностики различных неинфекционных заболеваний, а также открыло новые возможности для поиска перспективных терапевтических подходов, основываясь на молекулярных механизмах воспалительных ответов на клеточном уровне и возможностей их модуляции низкомолекулярными

веществами, ингибиторами отдельных метаболических каскадов синтеза оксипиринов.

В настоящее время накоплены данные, что не только клетки, традиционно относимые к системе врожденного иммунитета, но и ответы на провоспалительные стимулы клеток не иммунной системы, таких как клетки ткани мышц, астроциты, фибробласты, кератиноциты и другие, могут вносить существенный вклад в развитие хронических воспалительных процессов. Это объясняет интерес к исследованию сигнальной системы TLR на клеточном уровне и созданию различных моделей клеточных адаптаций, имитирующих возможные состояния организма при неинфекционных хронических заболеваниях. В связи с этим особый интерес при изучении молекулярных механизмов, лежащих в основе воспалительных процессов и патогенеза неинфекционных заболеваний, представляют собой глиальные клетки, в первую очередь астроциты. Эти клетки не только обеспечивают трофическую поддержку нейронов и выполняют различные гомеостатические функции в ЦНС, но и играют активную роль в нейровоспалительных процессах. Астроциты вносят значительный вклад в развитие неврологических заболеваний, включая нейродегенеративные и демиелинизирующие заболевания, эпилепсию, травмы, ишемию и инфекции. Нейровоспаление может быть индуцировано на клеточном уровне, когда при действии провоспалительных стимулов астроциты меняют экспрессию генов, морфологию и выполняемые функции. При этом клетки высвобождают различные иммунные и воспалительные медиаторы, такие как про- и противовоспалительные цитокины/хемокины и оксипирины, которые впоследствии могут оказывать нейротоксическое или нейропротекторное действие. При этом адаптация астроцитов к различным внешним факторам, таким как изменение концентрации глюкозы в среде или состав внеклеточного матрикса, может значительно менять клеточный ответ астроцитов. Изучение клеточных адаптаций актуально при разработке трехмерных клеточных культур *in vitro*, способных имитировать тканевую, структурную и биохимическую среду, аналогичную *in vivo*, которые используются не только для изучения функций и поведения нейронов, но и для тканевой инженерии и регенеративной медицины, применяемых при изучении и терапии нейродегенеративных заболеваний.

В данной диссертационной работе впервые объединены и представлены результаты, характеризующие омиксные исследования состава оксипиринов: для изучения адаптации на действие провоспалительных стимулов и активации TLR-сигнальных путей на клеточном уровне, а также сочетание биоинформатических подходов анализа транскриптомных данных и профилей оксипиринов для идентификации потенциальных биомаркеров с целью диагностики заболеваний и поиска потенциальных молекулярных мишеней

лекарственных средств в клинических исследованиях различных заболеваний человека.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: комплексное изучение профилей оксипинов при активации TLR рецепторов в глиальных клетках, оценка возможности модуляции профилей с помощью низкомолекулярных ингибиторов и выявление их характеристических паттернов при различных заболеваниях человека, связанных с хроническими воспалительными процессами.

В работе были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать комплексный воспалительный ответ астроцитов при активации TLR.
2. Исследовать влияние клеточных адаптаций на активацию TLR.
3. Выяснить возможность модуляции профиля оксипинов с помощью низкомолекулярных ингибиторов.
4. Оценить возможность использования уникальных паттернов профилей оксипинов как потенциальных биомаркеров для характеристики различных заболеваний.
5. С использованием анализа транскриптомных данных соотнести изменение экспрессии генов метаболизма оксипинов с молекулярными характеристиками заболеваний с воспалительной компонентой.

Научная новизна исследования

В ходе установления молекулярных механизмов клеточного ответа на воспалительный стимул впервые проведено комплексное исследование, включающее анализ изменения синтеза цитокинов, экспрессии генов-маркеров воспаления, профиля оксипинов и ряда других маркеров воспалительного ответа в глиальных клетках ЦНС, астроцитах. Впервые показано, как длительная адаптация клеток к таким стимулам, как LPS в низких дозах, IL-4 и IL-10 меняет клеточный ответ на стимуляцию TLR4 рецептора. С использованием омиксных подходов впервые охарактеризован синтез оксипинов при адаптации клеток к повышенной концентрации глюкозы, показано, что длительная адаптация клеток вызывает толерантность к провоспалительным стимулам. Показана возможность направленной модуляции профиля оксипинов с помощью низкомолекулярных соединений, включающих в себя как уже применяемые на практике лекарственные вещества, так и перспективные молекулы, находящиеся на разных стадиях клинических и доклинических исследований. В данной работе впервые проведено комплексное изучение профилей оксипинов в биологических образцах при таких заболеваниях, как болезнь Паркинсона, рак молочной железы, болезнь Вильсона-Коновалова и первичная открытоугольная глаукома. Проведено

сопоставление получаемых профилей и стадий заболеваний, данных транскриптомного профилирования при соответствующих нозологиях, и показана возможность использовать профили оксипинов как характеристические подписи данных патологий.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты работы открывают новое направление исследований в области биосинтеза оксипинов, связанное с изучением изменения профиля окисленных производных ПНЖК и способов их регуляции при активации Толл-подобных рецепторов. В работе впервые продемонстрирована возможность глиальных клеток мозга — астроцитов — продуцировать широкий набор молекул, включая оксипины, в ответ на активацию TLR. Показаны молекулярные внутриклеточные механизмы, вовлеченные в этот ответ и установлены способы модулировать этот ответ с помощью низкомолекулярных соединений. Полученные результаты по характеристике клеточных адаптаций позволяют прогнозировать потребности трехмерных клеточных культур в глюкозе и других веществах в конкретных условиях регенеративной медицины, что открывает новые возможности для создания жизнеспособных и эффективных тканевых конструкций в биоинженерии.

Отражение изменений профиля оксипинов, показанное при различных заболеваниях на людях и анализ транскриптомных данных генов метаболизма оксипинов показывают значимость их исследования как потенциальных маркеров патогенеза онкологических и неврологических заболеваний.

Положения, выносимые на защиту

1. Активация TLR-сигнальных путей на астроцитах приводит к комплексному воспалительному ответу, включающему изменение в экспрессии цитокинов, гиалуроновой кислоты, активации внутриклеточных сигнальных каскадов MAPK и синтезу широкого спектра провоспалительных оксипинов.
2. При активации TLR4 рецептора на клеточный ответ влияют такие факторы, как концентрация сыворотки в среде культивирования и пол животного, используемого для выделения первичных клеток.
3. Воспалительный ответ в астроцитах проходит с участием механизмов деградации мРНК, включая изменение локализации стабилизирующего деградацию белка HUR и изменение экспрессии участвующего в деградации мРНК белка TTP; скорость деградации мРНК участников воспалительного ответа можно модулировать низкомолекулярными ингибиторами.
4. Клеточная адаптация астроцитов к действию цитокинов, гиалуроновой кислоты, глюкозы и низким концентрациям эндотоксина влияет на TLR-

стимулированный клеточный ответ, вызывая как активацию ответа, так и толерантность к действию стимула.

5. Профиль оксипинонов крови можно модулировать с помощью низкомолекулярных ингибиторов, снижая концентрацию провоспалительных метаболитов и повышая количество соединений, ускоряющих завершение воспалительного ответа.
6. Профиль оксипинонов может являться характеристической подписью для неврологических заболеваний на примере болезни Паркинсона, нарушения метаболизма (болезнь Вильсона-Коновалова), онкологии (рак молочной железы), заболеваний глаза (глаукома).
7. Транскрипционный профиль генов метаболизма оксипинонов в ткани патологии не соотносится с изменением профиля оксипинонов в крови. Анализ транскрипционных профилей ткани патологии выявил ключевые гены метаболизма оксипинонов, позволяющие характеризовать молекулярные подтипы заболевания (на примере рака молочной железы).

Степень достоверности данных

Обзор литературы подготовлен с использованием актуальных публикаций и соответствует теме диссертации. Данные были получены с использованием современных методов молекулярной и физико-химической биологии. Достоверность полученных результатов определяется достаточным объемом проведенных исследований, использованием в работе современных экспериментальных и биоинформатических методов. Достоверность результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах (22 статьи). Результаты исследования были представлены на 21 международной конференции.

Личный вклад автора

Результаты исследований были получены лично автором, либо сотрудниками под его непосредственным руководством. В совместных работах, посвященных клиническим исследованиям на людях, автору принадлежит ключевая роль в выборе методов исследования, постановке задач, анализе литературы и интерпретации полученных данных. Работы по характеристике профиля оксипинонов пациентов с первичной открытоугольной глаукомой были проведены совместно с Зернием Е.Ю. Работы по выделению нейронов были проведены совместно с Лопачевым А.В. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, обработке экспериментальных данных, написании публикаций и представлении полученных данных на российских и международных конференциях. В работу вошли результаты кандидатской диссертации к. фарм. н. Горяинова С.В. и дипломной работы Гурылевой М.В., выполненной под руководством автора.

Апробация материалов диссертации

Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных конференциях: объединенные научные форумы физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, Дагомыс, 2016, 2019, 2021, 2022), Съездах европейского биохимического общества FEBS (Любляна 2021, Краков 2019, Прага 2018), 7 Европейском семинаре по липидным медиаторам (Бельгия, 2018), международной конференции “Заболевания центральной нервной системы и терапия” (Вена, 2017), международной научно-практической конференции “Гармонизация подходов к фармацевтической разработке” (Москва, 2018, 2020), Немецкой конференции по биоинформатике (Хайдельберг 2020), международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2017, 2019).

Публикации

По материалам диссертации было опубликовано 22 статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science, Scopus и РИНЦ и 21 тезис в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения полученных данных, выводов и списка литературы. Работа изложена на 304 страницах, содержит 27 таблиц, 100 рисунков и 5 приложений. Список литературы включает 466 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичная культура клеток астроцитов и нейронов. Первичную клеточную культуру астроцитов выделяли из новорождённых крысят. Вкратце, головной мозг животных извлекали, не захватывая соединительнотканые оболочки и последовательно перетирали через нейлоновые сита с порами 250 и 136 мкм. Полученные клетки помещали в культуральные флаконы и культивировали в среде DMEM, содержащей глюкозу (1 г/литр), 10% бычьей сыворотки (FBS), стрептомицин (50 ед/мл) и пенициллин (50 мкг/мл), при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Отделение клеток микроглии проводили на орбитальном шейкере OS-20 (Biosan, Латвия), 280 об./мин, 90 мин. Клетки рассеивали по шестилуночным планшетам с добавлением среды DMEM (1 г/л или 4,5 г/л). Далее в зависимости от эксперимента проводилась обработка клеток веществами и культивирование их в соответствующих средах. Для получения культур нейронов использовали полушария головного мозга 18-

дневных эмбрионов крыс Вистар. Полушария промывали в сбалансированном солевом растворе Хенкса, очищали от кровеносных сосудов, препарировали и инкубировали в растворе трипсина ЭДТА (PanEco) в течение 20 мин при 37 °С. После инактивации трипсина препарат промывали и клетки ресуспендировали и рассеивали в 6- и 96-луночные планшеты, предварительно обработанные полиорнитином (Sigma, St. Louis, MO, США). Клетки культивировали в течении 24 часов в инкубаторе, затем среду заменяли на Neurobasal Medium (NBM) (Gibco, Thermo Fisher, США) с 2% B-27 Serum Free Supplement (Gibco), 100 U/mL пенициллина-стрептомицина и 1% GlutaMAX (Gibco). После этого культуры выдерживали в инкубаторе в течение 10-12 дней. Половину объема среды обновляли каждые 3 дня.

Оценка изменения экспрессии генов. Суммарную мРНК выделяли с помощью набора для очистки РНК GeneJET (Thermo Scientific, США) и синтез первой цепи проводили с помощью MMLV RT kit (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Относительный уровень экспрессии генов определяли с помощью количественной ПЦР с красителем SYBR Green, используя 5× PCR-HS-SYBR микс (Евроген, Россия) на амплификаторе DTlite4 (ДНК-технология, Россия).

Иммуноблоттинг для оценки внутриклеточных изменений. Методом иммуноблоттинга оценивалось изменение экспрессии белков. После проведения клеточного эксперимента образцы лизировали и после выравнивания концентраций белка подвергали стандартному SDS-электрофорезу в 10%-ном ПААГ. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,2 мкм (Bio Rad, США) проводили по методу полусухого переноса в приборе Trans Blot sd (Bio Rad, США). После блокирования мембраны маркировали первичными антителами против соответствующих белков. После добавления вторичных антител количество белка анализировалось с использованием хемилюминесцентного субстрата. Фотосъемку мембран проводили с применением камер фирмы Bio Rad. Для количественного анализа экспрессии использовали приложение QuantityOne 4.6.9 (Bio Rad, США).

Экстракция липидов и высокоэффективная жидкостная хроматография-тандемная масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС). Выделение оксипинолов из образцов клеточного супернатанта, плазмы крови, внутриглазной жидкости и слезной жидкости проводили методом твердофазной экстракции с использованием картриджей Oasis Prime® HLB (60 мг, 3 куб. см, Waters, Германия). После нанесения на картридж образцы промывали 2 мл 15% метанола с 0,1% муравьиной кислоты, и далее липиды последовательно элюировали 500 мкл безводного метанола и 500 мкл ацетонитрила. Полученные фракции перемешивали, и далее концентрировали путем выпаривания растворителя в токе азота. Далее образцы растворялись в 100 мкл безводного метанола, переносились в вials

для ВЭЖХ и хранили при температуре -80 °С до дальнейшего анализа концентрации оксипинолов. Липидные медиаторы анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС серии 8040 (Shimadzu, Япония). ВЭЖХ, состоящая из бинарного насоса, автодозатора и термостатированного отсека колонок, проводилась с использованием колонки Phenomenex C8 (2,1 мм 150 мм 2,6 мм). Скорость потока составляла 0,4 мл/мин. Охладитель образца и температура колонки были установлены на 5°С и 40°С, соответственно. Объем вкола составлял 20 мл. Градиентное элюирование проводилось с использованием (А) 0,1% (v/v) муравьиной кислоты и (В) ацетонитрила. Градиент подвижной фазы В был следующим: 10% (0 мин) - 25% (5 мин) - 35% (10 мин) - 75% (20 мин) - 95% (20,1 мин) - 95% (25 мин) - 10% (25,1 мин) - 10% (30 мин). Параметры масс-спектрометрии: поток распыляющего газа, 3 л/мин; осушающий газ, 10 л/мин; температура теплового блока, 400 °С; температура линии десольватации, 250 °С; давление диссоциации, вызванной столкновениями, 230 кПа. Целевые липиды были идентифицированы и количественно определены в соответствии с точным m/z и временем удерживания путем сравнения их параметров UPLC, MS и MS/MS с соответствующими данными, полученными для дейтерированных внутренних стандартных соединений с использованием программного обеспечения Lipid Mediator Version 2 (Shimadzu, Япония).

Иммунофлуоресцентный анализ белков. Клеточный эксперимент проводили на чашках Петри со стеклянным дном. Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде, блокировали FBS и затем инкубировали в течение ночи с первичными антителами против HuR (1:300), GFAP (1:200), IB-4 (1:200). Использовались вторичные антитела Alexa Alexa 488 и Alexa 633. Изображения получали с помощью микроскопа Axiovert 100M (Zeiss, Геттинген, Германия), оснащенного программным обеспечением для конфокальной микроскопии LSM 510. Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ (1.51s).

Определение концентрации цитокинов с помощью иммуноферментного анализа. После проведения экспериментов супернатанты собирали и хранили при -70 °С для дальнейшего анализа. Уровни высвобожденных цитокинов и гиалуроновой кислоты определяли с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа и планшетного ридера Synergy H4 (BioTek, Winooski, VT, США), следуя инструкциям производителя.

Клинические исследования. Все исследования проводились в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации. Пациенты/участники предоставили письменное информированное согласие на участия в проводимых исследованиях в соответствии с руководством, утвержденным в рамках протоколов (статья 20, Федеральный закон "Об охране здоровья граждан Российской Федерации"

N323-ФЗ, 11.21.2011). Для каждого исследования было получено одобрение этического комитета: Комитет по этике Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №534, 7 марта 2020 г., РМЖ), Комитет по этике Научного центра неврологии (протокол №4-5/19 15.05.19, болезнь Паркинсона; протокол №4-4/19 15.05.19, болезнь Вильсона-Коновалова), национального медицинского исследовательского центра глазных болезней имени Гельмгольца (код протокола №49/1, 7 февраля 2019 года и №50/2, 24 ноября 2020 года, первичная открытоугольная глаукома).

Биоинформатические подходы к анализу транскриптомных данных. Исходные данные были получены из архива Sequence Read Archive (SRA) с помощью инструментария SRA. Транскрипты были аннотированы с использованием референсного транскриптома человека GRCh38.v32. Первичная обработка данных проведена инструментом Salmon, далее суммировалась экспрессия на уровне генов и на уровне транскриптов с помощью пакета R tximport. Дифференциальный анализ экспрессии проводили с помощью пакета DESeq2. Дифференциально экспрессированные гены (ДЭГ) определяли с использованием стандартных критериев, а именно p -значения (скорректированного с помощью процедуры Беньямини-Хохберга) $< 0,05$ и разницы в кратности изменения более чем в два раза.

Методы машинного обучения

Для анализа экспрессионных данных использовали модель машинного обучения: модель Random Forest (RF), построенная на языке программирования R с использованием пакета RandomForest и набора пакетов для обработки данных tidyverse. Отбор важных признаков производился алгоритмом Boruta, реализованном в одноименном пакете в среде R. Алгоритм Sequential Feature Selector (SFS) был применен для определения минимального набора генов, которому соответствует наибольшая эффективность классификации.

Статистическая обработка данных. Значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение из трех независимых экспериментов, проведенных в трех повторностях. Нормальность наборов данных оценивалась с помощью теста Шапиро-Уилка. Для определения статистической значимости данные подвергались одностороннему ANOVA с последующим post hoc тестом Бонферрони. $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Данные метаболомики анализировали с помощью пакета mixOmics R версии 6.1.1. Сравнение относительных концентраций проводили с помощью двухвыборочного двустороннего t -теста с последующей поправкой Бонферрони-Холма для множественных сравнений. $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Разделение классов анализировали с помощью частичного дискриминантного анализа по

методу наименьших квадратов (PLS-DA). Отсечение для VIP-баллов было принято равным 1,5 в соответствии со стандартной инициативой метаболомики (уровень MSI = 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение молекулярных механизмов клеточного ответа на активацию Толл-подобных рецепторов (TLR) и изменение профиля оксипиринов

Участие астроцитов в развитии нейровоспаления было показано ранее, однако отсутствовала комплексная характеристика ответа на уровне клеточных культур. Для различных провоспалительных стимулов нами проведена такая характеристика на основании определения: 1) уровня высвобождения во внеклеточную среду цитокинов, ПНЖК и оксипиринов; 2) изменения уровня экспрессии и/или активности маркеров внутриклеточных сигнальных путей. Также проведена оценка влияния на клеточный ответ 1) пола животных, из которых получены клетки, 2) процессов деградации мРНК на провоспалительные маркеры, 3) концентрации сыворотки в среде культивирования.

Комплексная характеристика воспалительного ответа на астроцитах

Комплексную характеристику при стимуляции клеток в течении 4 и 24 ч агонистом TLR4 рецептора LPS (100 нг/мл) оценивали по следующим параметрам: 1) изменение синтеза цитокинов на уровне мРНК и на уровне белка; 2) изменение внутриклеточных каскадов при активации TLR сигнального пути (изменение фосфорилирования митоген-активированных протеинкиназ (MAPK) - p38, киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK), c-Jun N-концевой киназы (JNK) и транскрипционного фактора NF- κ B); 3) изменение в выбросе сигнальных липидов (оксипиринов и ПНЖК); 4) изменение экспрессии генов различных метаболических процессов, сопряженных с развитием ответов астроцитов на провоспалительные стимулы. Сравнили полученные характеристики с ответами астроцитов при активации других TLR рецепторов, для чего использовали стимулы: пептидогликан (PGN, 5 мкг/мл; агонист TLR1/2), флагеллин (FGL, 5 мкг/мл; агонист TLR5) и поли:IC (PIC, 10 мкг/мл; агонист TLR3). Также сравнили процессы активации системы врожденного иммунитета через TLR рецепторы с другими стимулами, которые участвуют в патологиях, связанных с нейровоспалением: тромбин, АТФ, TNF α , интерлейкины IL-1 α , IL-10. Общая схема получения данных при комплексной характеристике представлена на Рис. 1.

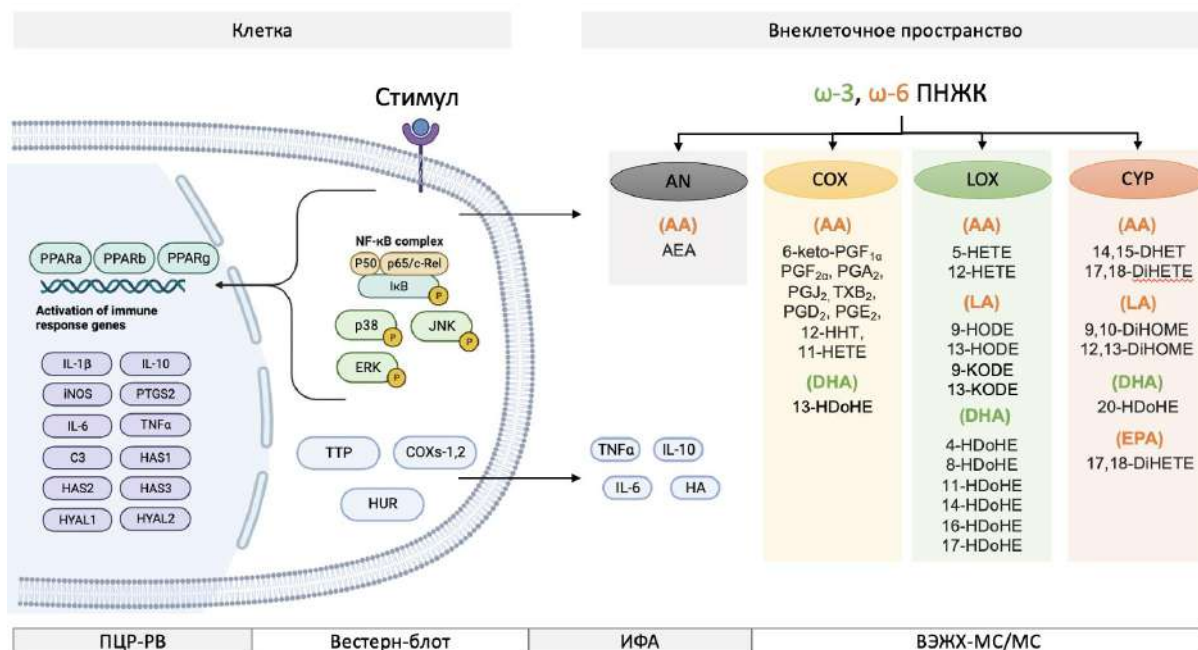


Рис. 1. Общая схема получения данных при комплексной характеристике ответов астроцитов на действие провоспалительных стимулов.

Характеристики воспалительных процессов наблюдались для всех указанных стимулов. Получено, что LPS (100 нг/мл, 4 ч) увеличивает экспрессию мРНК цитокинов TNFα (↑ x50), IL-10 (↑ x20), IL-1β (↑ x100), IL-6 (↑ x100), а также генов маркеров воспалительного ответа C3 (↑ x10), iNOS (↑ x100) и COX-2 (↑ x30). Для сопряженных генов показано: 1) увеличение экспрессии на уровне мРНК гена белка, участвующего в деградации мРНК тристетрапролина (TTP) (↑ x7), в то время как экспрессия на уровне мРНК белка человеческого антигена R (HuR), вовлеченного в стабилизацию мРНК, не изменялась; 2) увеличение экспрессии генов, вовлеченных в синтез гиалуроновой кислоты гиалуронансинтаз HAS1 (↑ x8) и HAS2 (↑ x120), при этом не изменялась экспрессия HAS3 и генов ферментов деградации гиалуроновой кислоты гиалуронидаз HYAL1 и HYAL2; 3) изменение в экспрессии транскрипционных факторов, рецепторов активаторов пролиферации пероксисом (PPAR): снижение экспрессии PPARα (↓ x1,5) и PPARγ (↓ x1,2) и увеличение экспрессии PPARβ (↑ x1,5).

На уровне белка мы наблюдали увеличение концентрации в супернатанте цитокинов TNFα (↑ x3), IL-10 (↑ x7), IL-6 (↑), а также снижение количества белка COX-1 (↓ x1,2) и увеличение COX-2 (↑ x4). Помимо этого, стимуляция астроцитов LPS вызывала увеличение фосфорилирования MAPK: p-p38/p38 (↑ x4), p-JNK/JNK (↑ x5), p-ERK/ERK (↑ x1,8) и транскрипционного фактора NF-κB: pNF-κB/NF-κB (↑ x2,8).

Для разных стимуляций во внеклеточной среде проанализированы ПНЖК и образующиеся из них оксипирины. Всего во внеклеточной среде мы характеризовали 29 соединений, включающих 12 производных AA, 8 производных DHA, 6 производных LA, а также свободные ПНЖК AA, DHA, EPA. Из них 9 образовались по COX-пути, 12 по LOX-пути, 5 по CYP-

пути. Впервые на астроцитах получен профиль оксипинов при активации TLR-сигнального пути. При стимуляции астроцитов в первую очередь наблюдали значительное увеличение синтеза оксипинов, образующихся по COX-пути. Таким образом, вне зависимости от природы стимула наблюдается схожий паттерн ответа: увеличение выброса провоспалительных цитокинов, оксипинов образующихся по COX-пути и активация внутриклеточных маркеров.

При развитии воспалительных процессов в нервной системе важной функцией астроцитов является их пролиферация, поэтому для характеристики роли оксипинов исследовали изменение пролиферации при обработке клеток простагландинами (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ и PGD_2) (Рис. 2А), циклопентеноновыми простагландинами (PGA_2 , 15d-PGJ_2) и 2-циклопентен-1-оном (в качестве контроля) (Рис.2Б). $\text{PGF}_{2\alpha}$ и 2-циклопентен-1-он не влияли на пролиферацию. Для других простагландинов наблюдали следующий порядок активности (% ингибирования при концентрации соединения 20 мкМ): PGE_2 (5%) < 15d-PGA_2 (20%) < PGD_2 (40%) < PGA_2 (80%) < 15d-PGJ_2 (90%). Хотя концентрации оксипинов, определяемые в клеточных экспериментах, находятся в наномолярной области, полученные результаты позволили сделать предположение, что эффект может достигаться не за счет повышения концентрации отдельных эндогенных веществ, а за счет комбинации слабых модуляций, т.е. изменения профиля оксипинов и соотношения внутри профиля про- и противовоспалительных компонентов (Chistyakov *et al.* 2018). Это также актуализировало задачу выявления сигнальных путей, на которые можно воздействовать для получения заданных свойств смесей синтезируемых оксипинов.

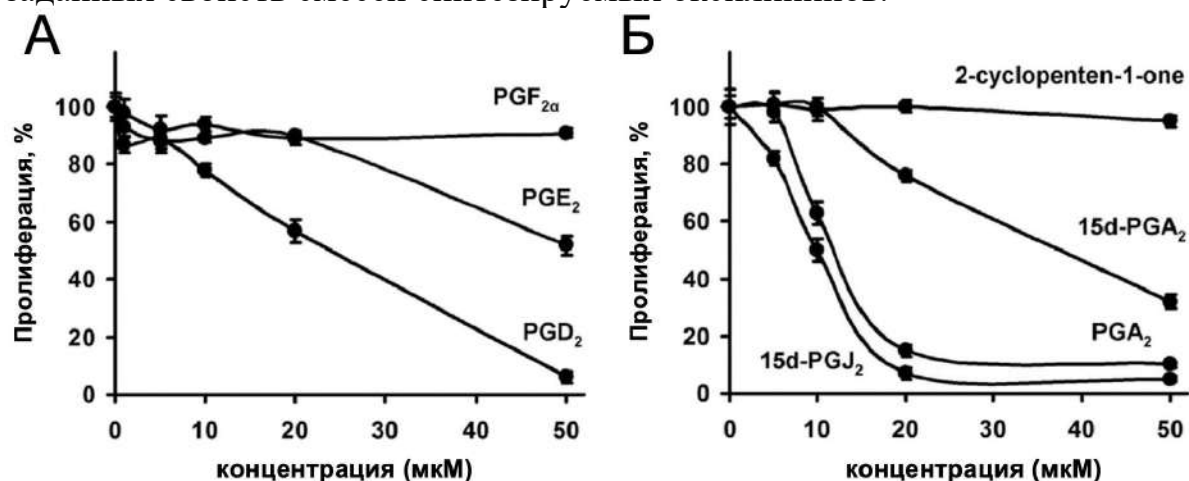


Рис. 2. Сравнение действия первичных простагландинов (А) и циклопентеноновых простагландинов (Б) на пролиферацию астроцитов. Простагландины добавляли одновременно с сывороткой в культуры, предварительно синхронизированные депривацией по сыворотке, пролиферацию оценивали через 48 ч по методике с BrdU. За 100% взята пролиферация без добавления тестируемых соединений (контроль).

Зависимость ответа астроцитов при активации TLR4 от пола животных, из которых получены первичные клетки

Многие неврологические и психиатрические расстройства демонстрируют четкую зависимость от пола, однако молекулярный механизм этого процесса не ясен. Астроциты считаются наиболее активными стероидогенными клетками в мозге, они экспрессируют ферменты, участвующие в синтезе и метаболизме стероидов, и чувствительны к их присутствию. Чтобы изучить гипотезу о том, что астроциты могут участвовать в опосредованных полом различиях воспалительных реакций, мы сравнили характеристики ответа на LPS у культур клеток, полученных из особей разного пола.

Показано, что астроциты, выделенные из эмбрионов крыс мужского и женского пола, имеют схожую морфологию, но демонстрируют различия в реакции на LPS: синтез ряда оксипинов из группы COX-зависимого пути имеет значительные половые различия: концентрация PGE₂ и PGD₂ была меньше, а 6-кето-PGF_{1α} больше в клетках, полученных из самок (Рис. 3А); больше провоспалительного цитокина TNFα и меньше противовоспалительного цитокина IL-10 вырабатывалось в клетках, полученных из самцов (Рис.3Б). Увеличение соотношения TNFα/IL-10 и концентрации PGE₂ и PGD₂ в клетках, полученных из самцов, указывает на более сильный ответ на действие провоспалительного стимула. Трилостан (TR), ингибитор ключевого фермента стероидных превращений 3β-гидроксистероиддегидрогеназы, подавлял индуцированное LPS высвобождение PGE₂, PGD₂ и 6-кето-PGF_{1α} в астроцитах, полученных из самок (Рис. 3В). Это указывает на возможность использования трилостана как противовоспалительного препарата для женских особей. Далее мы исследовали клетки, при получении которых использовали одинаковое количество эмбрионов из самцов и самок, чтобы нивелировать различия.

Таким образом, астроциты, полученные от мужских и женских особей, по-разному реагируют на действие LPS на уровне выработки цитокинов и простагландинов. Опосредованные полом различия в про- и противовоспалительных ответах должны быть приняты во внимание для эффективного лечения заболеваний, сопровождающихся нейровоспалением.

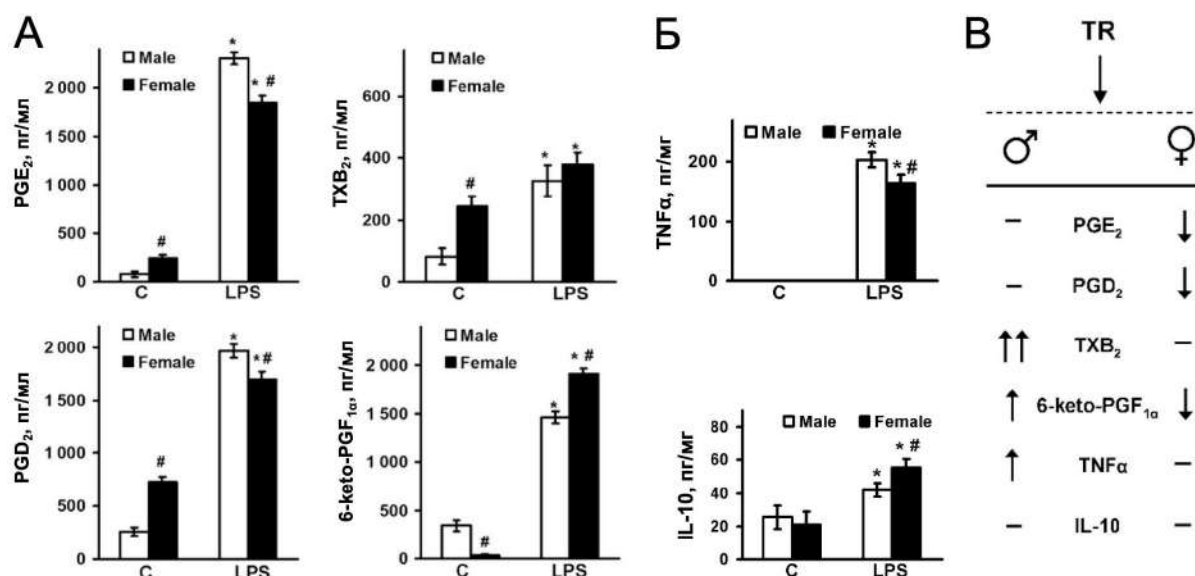


Рис. 3. Влияние пола животного на LPS-стимулированный клеточный ответ астроцитов. Первичные астроциты выделяли из самцов (Male) или самок (Female), и после культивирования обрабатывали LPS (100 нг/мл) в течении 4 часов (А,Б), или предобрабатывали 0,5 ч трилостаном (TR; 25 мкМ) перед добавлением LPS, и далее анализировали простагландины (А) и цитокины TNFα и IL-10 (Б). (В) Схема, суммирующая различия в синтезе простагландинов и высвобождении TNFα и IL-10 в мужских и женских астроцитах при обработке трилостаном LPS-стимулированных клеток (↑: повышенное высвобождение, ↑↑: сильно повышенное высвобождение, ↓: пониженное высвобождение, -: отсутствие эффекта). * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками, # $p < 0,05$ по сравнению с аналогичными обработками астроцитов выделенных из самцов.

Регуляция способности астроцитов отвечать на провоспалительные стимулы через модуляцию скорости деградации мРНК

В настоящее время описан механизм посттранскрипционного контроля экспрессии воспалительных генов через модуляцию скорости деградации мРНК, в первую очередь с участием так называемого ARE-опосредованного пути, который вовлекает белки TTP (тристетрапролин, он же ZFP36) и HuR (human antigen R, он же ELAV1), имеющие негативную и позитивную посттранскрипционную регуляцию соответственно. ARE - опосредованный процесс посттранскрипционной регуляции на клетках иммунной системы описан для таких медиаторов воспаления, как COX-2, TNFα, IL-10, и др. Этот процесс может быть терапевтически значимой мишенью, однако он не был изучен на астроцитах.

Проведенные исследования изменения скорости деградации мРНК по стандартному протоколу с актиномицином D как ингибитором транскрипции показали, что период полураспада мРНК IL-10, COX-2 и TNFα в наивных астроцитах составлял 70, 44 и 19 мин, соответственно (Рис. 4А). Стимуляция LPS вызывала 2-кратное увеличение скорости распада

мРНК IL-10 и COX-2, т.е. при активации TLR4 увеличивается скорость деградации мРНК COX-2 и IL-10, но не TNF α . Полученные результаты свидетельствуют о роли посттранскрипционного контроля экспрессии воспалительных генов через модуляцию скорости деградации мРНК на астроцитах. Добавление росиглитазона (RG, гипогликемический препарат из группы тиазолидиндионов) снижает скорость деградации до исходного уровня, что раскрывает потенциал использования этого препарата в модуляции нейровоспаления.

Для характеристики ARE-опосредованного пути на астроцитах оценили наличие TTP и HuR и охарактеризовали особенности их регуляции после стимуляции провоспалительными стимулами — тромбином, АТФ и агонистами TLR4 и TLR2. Все провоспалительные стимулы повышали уровень мРНК TTP, но не мРНК HuR. Транскрипты HuR и TTP стабилизировались при обработке LPS (Рис. 4Б), и этот эффект снимался при добавлении SB203580 (SB, ингибитор p38 MAPK). Методом иммунофлуоресценции показано, что LPS индуцировал транслокацию белка HuR из ядра в цитоплазму (Рис. 4В). Уровень TTP в цитоплазме через 15 и 120 мин после обработки LPS повышался, однако его транслокации между цитоплазмой и ядром в указанные временные точки не наблюдалось (Рис. 4Г). Таким образом, астроциты экспрессируют TTP и повышают его экспрессию при стимуляции LPS, накапливая белок в цитоплазме после кратковременного воздействия LPS. Наши данные впервые показали специфичность регуляции ARE-связывающих белков в астроцитах и возможность манипулирования воспалительными процессами в мозге через посттранскрипционные механизмы с помощью низкомолекулярных ингибиторов.

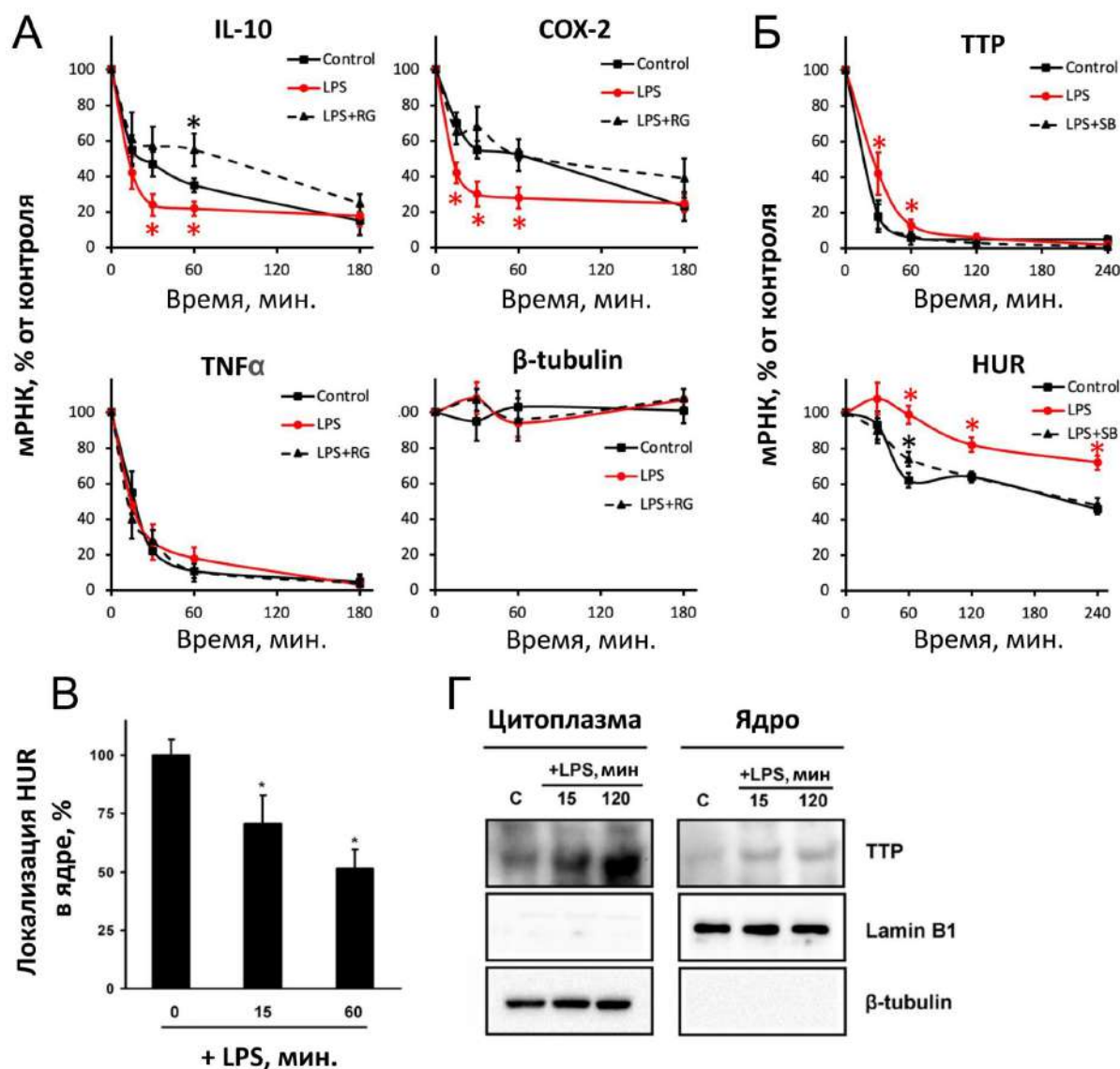


Рис. 4. Регуляция скорости деградации мРНК при стимуляции LPS и обработке низкомолекулярными соединениями. (А,Б) Росиглитазон (RG, 10 мкМ) или SB 203580 (SB, 20 мкМ) добавляли за 30 мин до стимуляции LPS (100 нг/мл, 1 ч), затем инкубировали с актиномицином D (5 мкг/мл) в течение 15, 30, 60, 180 или 240 мин. Контроль = 100% (В) Результаты денситометрии транслокации NuR из ядра в цитозоль после обработки LPS (100 нг/мл) в течение 15 или 60 мин. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками. (Г) Экспрессия TTP при субклеточном фракционировании после 15 и 120 мин обработки LPS.

Анализ изменения ответов при активации системы Толл-подобных рецепторов при адаптации астроцитов к различным факторам внешней среды

Ответ эукариотических клеток на стимул вызывает изменения в ядре, увеличение или уменьшение транскрипции участвующих в ответе генов. Насколько это воздействие “перепрограммирует” клетки и меняет их ответы на последующее действие провоспалительных стимулов — неясно. Исследования памяти врожденного иммунитета (training innate immunity)

проводятся преимущественно на клетках мезенхимального происхождения (в первую очередь моноцитах и макрофагах), хотя данные по изменению TLR-сигналинга на клетках эктодермального происхождения могут иметь важное значение для понимания протекания нейродегенеративных заболеваний.

Для моделирования различных процессов длительного воздействия внешних факторов на клеточные культуры мы предположили, что действие любого фактора, на фоне которого происходит прохождение клеток по клеточному циклу, вызывает адаптацию, поэтому условно отнесли обработку до 12 часов как “острый” ответ, а обработку клеток более 24 часов как длительный, т.е. предполагается, что за 24 ч клетки адаптировались к действию обработки, и если на такие клетки воздействовать стимулом, то эта адаптация будет проявляться в ответе. Исследовали следующие адаптации: 1) нормальная (NG, 5 мМ) и высокая (HG, 22,5 мМ) концентрации глюкозы в среде культивирования; 2) низкие концентрации LPS (10 нг/мл); 3) действие противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10); 4) полимеров гиалуроновой кислоты разной длины. Клеточные адаптации позволили моделировать на клеточном уровне: 1) влияние гипергликемии, 2) влияние эндотоксинового хронического воспаления, 3) терапевтическое воздействие противовоспалительных цитокинов, 4) изменение внеклеточного матрикса при воспалении. Эти модели дали возможность охарактеризовать профили оксипиринов и изучить изменения воспалительных ответов астроцитов при адаптациях.

Изучение клеточного ответа при активации системы Толл-подобных рецепторов при различных условиях адаптации к глюкозе

Клеточные модели, имитирующие условия гипергликемии, начали исследовать относительно недавно. Ранее первичные клетки обычно выделяли и культивировали с высокой концентрацией глюкозы, поскольку они лучше растут при данных условиях. Известно, что гипергликемия связана с рядом осложнений в головном мозге. Поскольку в мозге за метаболизм глюкозы отвечают астроциты, воздействие повышенной концентрации глюкозы вызывает дисрегуляцию их функций. На клеточном уровне не было охарактеризовано влияние этой адаптации на метаболизм оксипиринов и ответ на провоспалительные стимулы.

Мы исследовали влияние адаптации к повышенным концентрациям глюкозы в среде культивирования на способность астроцитов отвечать на активацию TLR-сигнального пути. Показано, что культивирование клеток в высокой концентрации глюкозы в течении 48 ч не меняет клеточную морфологию (Рис. 5А), при этом изменяются TLR-опосредованные ответы провоспалительных маркеров и уровни экспрессии PPAR (факторов транскрипции, сопрягающих провоспалительные реакции и энергетический метаболизм), в том числе: i) увеличилось высвобождение во внеклеточную

среду провоспалительного цитокина TNF α , индуцированное агонистами TLR4 (LPS) или TLR3 (PIC), и синтез PGE $_2$ (Рис. 5Б,В), ii) изменились сигнальные пути TLR4/MAPK (наблюдалось увеличение активности p38 MAPK и снижение активности JNK на ранних стадиях активации TLR (Рис. 5Д); iii) в сигнальном пути TLR4/p38/PPAR β наблюдалось снижение экспрессии PPAR β при ингибировании p38 при нормальной глюкозе и противоположный эффект при повышенной глюкозе (Рис. 5Г).

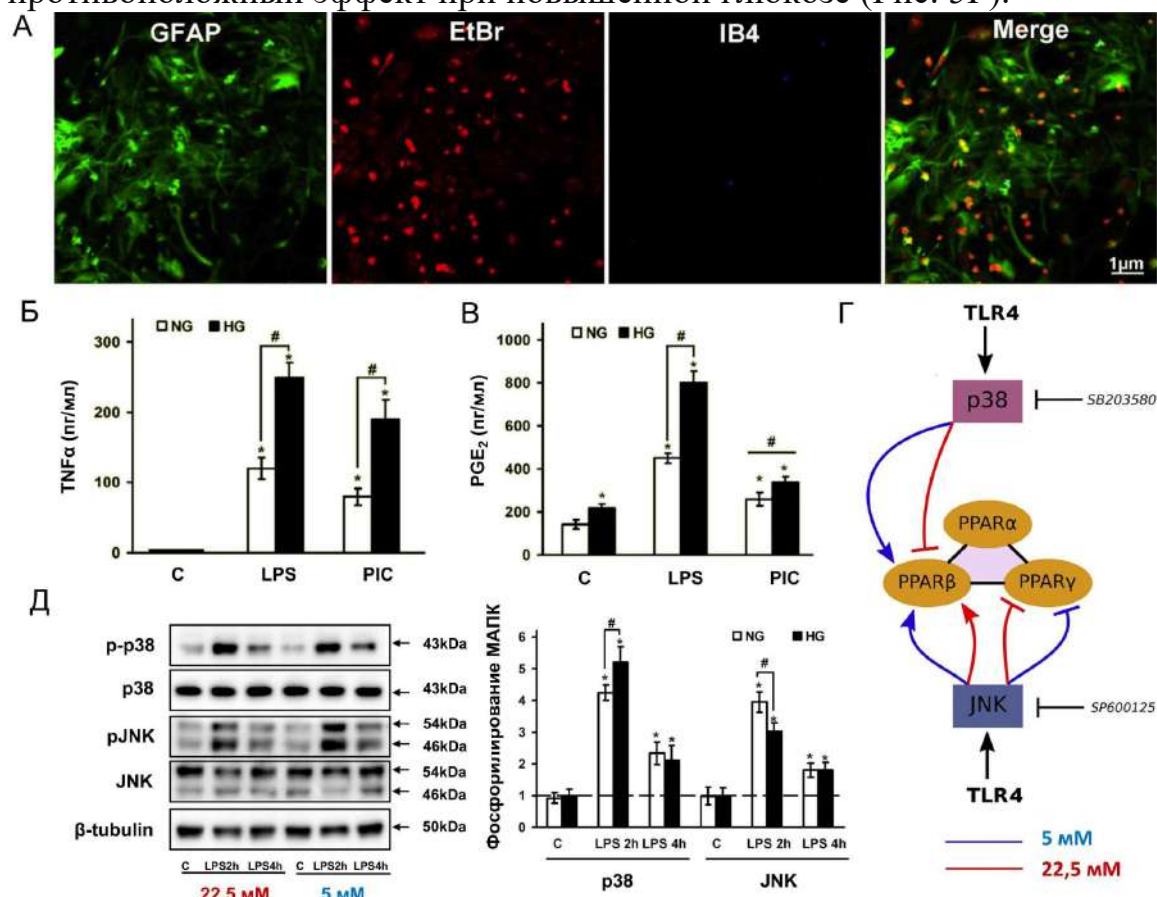


Рис. 5. Сравнение ответов астроцитов, культивируемых в среде с высокой (22,5 мМ; HG) и нормальной (5,5 мМ; NG) концентрацией глюкозы в течение 48 ч. Клетки стимулировали агонистами TLR: липополисахаридом (LPS; 100 нг/мл, TLR4) и поли:IC (PIC; 10 мкг/мл, TLR3) в течение 4 ч. (А). Иммуноцитохимия культур астроцитов (GFAP, зеленый), ядро (EtBr, красный) и микроглиальные клетки (IB4, синий). (Б), (В) Сравнение влияния агонистов TLR на высвобождение TNF α и PGE $_2$. (Г) Схема влияния ингибиторов p38 и JNK MAPK на экспрессию PPAR. (Д) Влияние глюкозы на фосфорилирование MAPK в LPS-стимулированных клетках. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками, # $p < 0,05$ по сравнению с указанными обработками.

В другой клеточной модели использовали адаптацию астроцитов к повышенной концентрации глюкозы в течение 12 дней. На Рис. 6 представлены данные по метаболитам COX-опосредованного синтеза оксипинов, поскольку именно по этому пути были выявлены изменения. В этих условиях для адаптированных клеток характерно: провоспалительное состояние нестимулированных клеток, оцениваемое по

уровню оксипинов (Рис. 6А); проявление толерантности в ответе на LPS (Рис. 6Б). Также показано, что адаптация к глюкозе не влияла на высвобождение IL-6, т.е. наблюдалось нарушение баланса в ответе на провоспалительный стимул между цитокинами и оксипинами (Chistyakov *et al.* 2021).

Дополнительно охарактеризована зависимость синтеза оксипинов от концентрации сыворотки в среде культивирования, поскольку известно, что астроциты чувствительны к изменениям концентрации сыворотки, а также что оксипины способны связываться с внеклеточными белками. Использовали 22,5 мкМ глюкозы как стрессор длительного воздействия, вызывающий адаптацию клеток, а различные концентрации сыворотки как стрессор острого воздействия. Сравнили эффекты 10% (нормальная концентрация для культивирования клеток), 5% и 1% сыворотки на фоне стимуляции астроцитов LPS. Получено, что концентрация сыворотки меняет количественный и качественный состав профиля оксипинов для клеток, адаптированных к разным концентрациям глюкозы (Chistyakov *et al.* 2021). Результаты этой серии экспериментов существенны в методическом плане: при изучении механизмов клеточного сигналинга следует учитывать концентрацию глюкозы и содержание сыворотки в среде культивирования, а также влияние этих параметров на выбор детектируемых соединений.

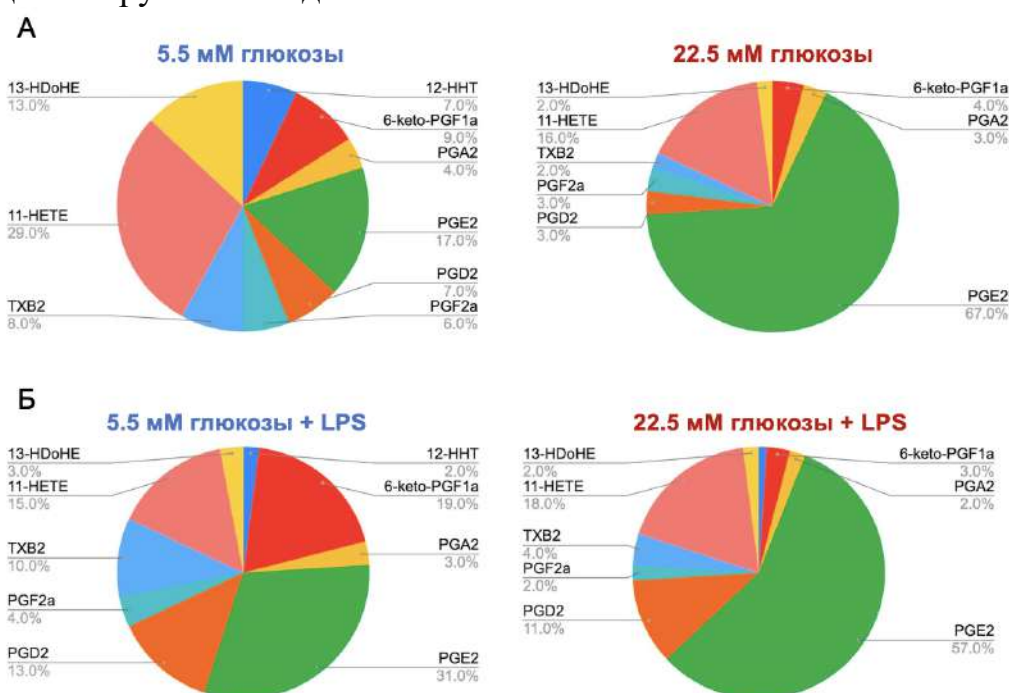


Рис. 6. Влияние глюкозы на распределение COX-производных арахидоновой кислоты. Астроциты культивировали в среде с нормальной (5,5 мМ) или повышенной (22,5 мМ) концентрацией глюкозы 12 дней, затем стимулировали LPS (4ч, 100 нг/мл). (А) нестимулированные клетки, (Б) LPS-стимулированные клетки.

Таким образом, охарактеризован TLR-стимулированный ответ на клеточных моделях адаптации астроцитов к короткому (2 дня) и длительному (12 дней) культивированию в среде с повышенной (22,5 мМ) концентрацией глюкозы: 1) двухдневная адаптация приводит к увеличенному синтезу PGE2 и TNF α при TLR3 и TLR4 стимуляции, увеличению активности JNK, но не p38 MAPK; 2) в сигнальном пути TLR4/p38/PPAR β наблюдается снижение экспрессии PPAR β при ингибировании p38 в условиях нормальной глюкозы и противоположный эффект при повышенной глюкозе; 3) 12-дневная адаптация приводит к провоспалительному состоянию астроцитов, что проявляется в изменениях профилей оксипинов и их соотношения с высвобождаемыми цитокинами; такая адаптация приводит к снижению чувствительности клеток к действию LPS на уровне синтеза оксипинов и провоспалительных цитокинов.

Взаимосвязь системы метаболизма гиалуроновой кислоты и сигнального пути TLR4 на астроцитах

Известно, что в процессах функционирования астроцитов большую роль играют их контакты между собой, а также состояние внеклеточного матрикса. Гиалуроновая кислота (ГК), основной гликозаминогликан внеклеточного матрикса, обладает клеточными сигнальными функциями, которые зависят от ее молекулярного веса. Для различных клеток миелоидного ряда, включая микроглию, описаны противовоспалительные свойства для высокомолекулярной (HMW) ГК и провоспалительные свойства для низкомолекулярной (LMW) ГК. Астроциты — клетки эктодермального происхождения, играющие ключевую роль в воспалении мозга, но связь между ГК разного молекулярного веса и воспалительным ответом в этих клетках не была изучена. Поэтому мы проверили действие HMW ГК и LMW ГК в первичных астроцитах крыс, стимулированных PIC (агонист TLR3) и LPS (агонист TLR4). Астроциты обрабатывали полимерами ГК разной молекулярной массы 0,5 ч (острая стимуляция) или 48 ч (длительное воздействие), затем добавляли стимулы TLR на 4ч. В профиле оксипинов были идентифицированы метаболиты HDoNEs (из DHA), -HETEс, простагландины (из AA), DiHOMEs и HODEs (из LA). Как HMW HA, так и LMW HA снижали метаболизм ПНЖК по COX-пути, а LMW HA также снижал метаболизм ПНЖК по LOX пути (Рис. 7). Гиалуроновые кислоты с разной молекулярной массой также модулируют ответы астроцитов на стимуляцию агонистами TLR. Получено, что LMW HA и HMW HA (i) влияют на цитокины (TNF α , IL-6, IL-10), ферменты iNOS, COX-2 и уровень оксипинов во внеклеточной среде культивируемых астроцитов, (ii) вызывают клеточную адаптацию при длительном применении, (iii) модулируют TLR4- и TLR3-сигнальные пути (Рис. 7) (Chistyakov *et al.* 2019a). Эффекты HMW и LMW HA проявляются

преимущественно в TLR4- и TLR3-опосредованных ответах, соответственно. Таким образом, острое добавление различных полимеров ГК меняет профиль оксипинов, а длительное добавление приводит к адаптации клеток, что снижает их способность отвечать на провоспалительный стимул.

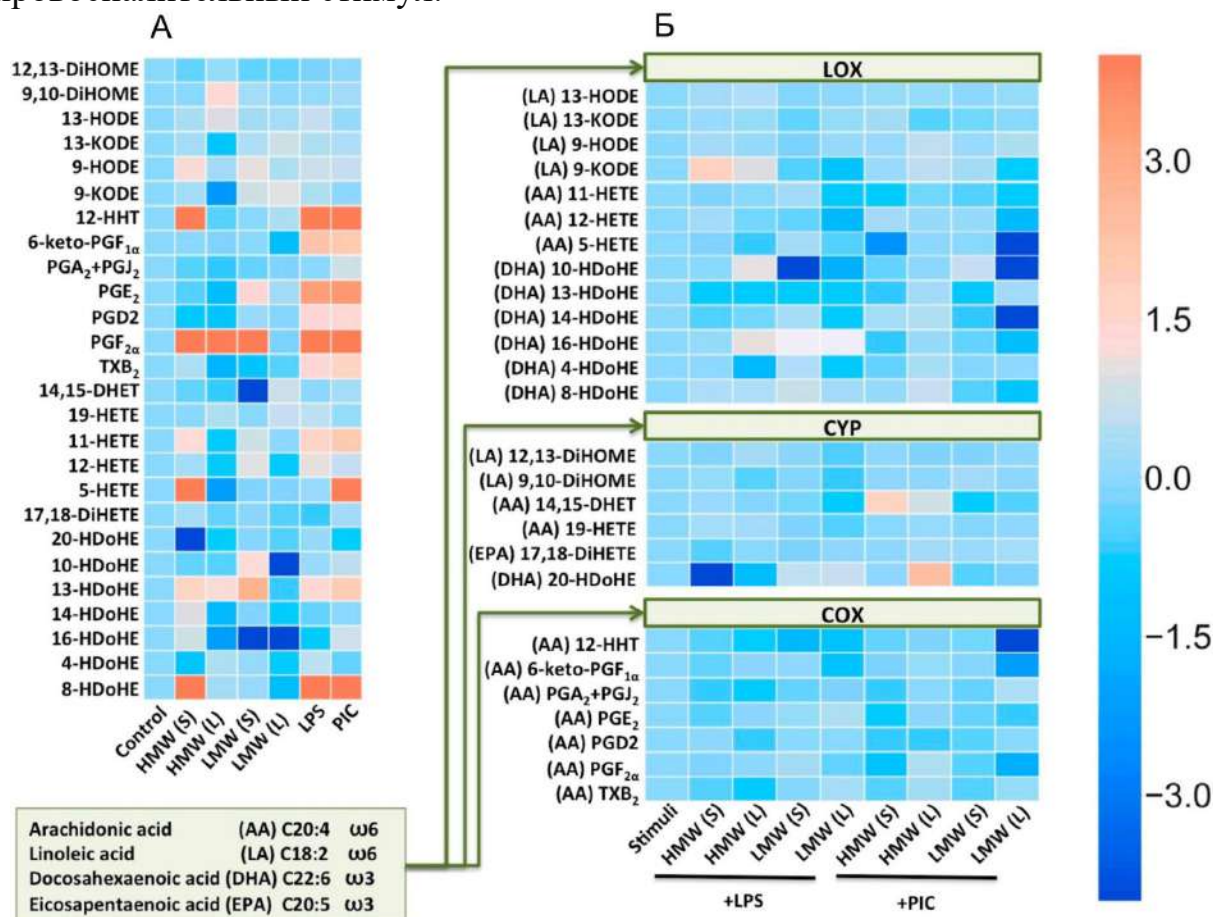


Рис. 7. Влияние гиалуроновой кислоты на синтез оксипинов в астроцитах. (А) Астроциты обрабатывали высокомолекулярной гиалуроновой кислотой (HMW, 450 мкг/мл) и низкомолекулярной гиалуроновой кислотой (LMW, 450 мкг/мл) в течение 0,5 ч (S) или 48 ч (L), (Б) а также LPS (100 нг/мл) или PIC (10 мкг/мл) в течение 4 ч. Тепловая карта показывает относительное количество каждого липидного медиатора по сравнению с (А) контролем, (Б) соответствующим стимулом.

Для поиска возможности управления клеточным ответом через воздействие на метаболизм ГК мы протестировали 4-метилумбеллиферон (4-MU), специфический ингибитор внутриклеточного синтеза ГК (Рис. 8). Показано, что 4-MU (i) оказывает противовоспалительное действие в процессе активации TLR4, снижая уровень цитокинов TNF α , IL-6 и IL-1 β и повышая IL-10 (Chistyakov *et al.* 2020b), (ii) снижает синтез простагландинов (Рис. 8А), не влияя на экспрессию COX-1 и COX-2 (Рис. 8В), (iii) модулирует синтез ГК и снижает экспрессию мРНК ГК-синтаз, индуцированных LPS (HAS1, HAS2), но не влияет на мРНК HAS3, HYAL1 и HYAL2 (Рис. 8Б, Г); (iv) эффекты 4-MU проявляются преимущественно

через JNK, но не через p38, ERK MAPK или NF-κB (Рис. 8Д). Впервые было показано, что 4-MU эффективен в регуляции воспалительного ответа астроцитов.

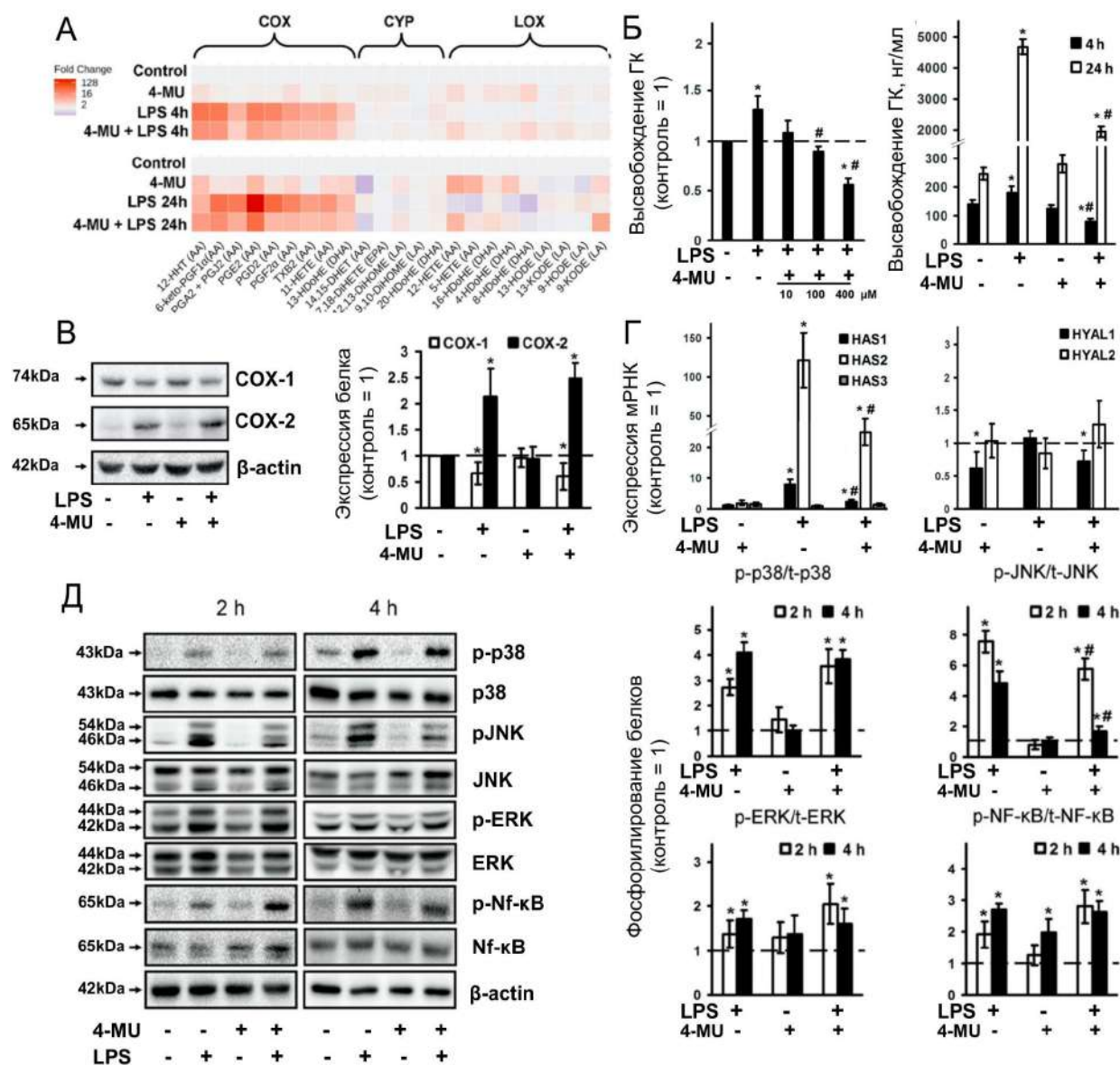


Рис. 8. Влияние 4-метилумбеллиферона (4-MU) на высвобождение оксипинов и экспрессию циклооксигеназ (А,В), высвобождение гиалуриновой кислоты (ГК) (Б), ферментов метаболизма ГК (Г), активности MAPK и NF-κB (Д) в LPS-стимулированных астроцитах. Первичные крысиные астроциты предварительно обрабатывали в течение 30 мин 4-MU (400 мкМ), а затем стимулировали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 4 ч или 24 ч. (А) Тепловая карта показывает относительное количество каждого липидного медиатора по сравнению с контролем. (В) Изменение экспрессии белков COX-1 и COX-2. (Б) Выброс ГК из астроцитов под действием стимулов. (Г) Экспрессия мРНК ферментов метаболизма ГК. (Д) Сравнение активности MAPK. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками, # $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

Таким образом, установлена взаимосвязь TLR сигнальной системы и системой метаболизма гиалуроновой кислоты (ГК) на астроцитах, показана способность адаптации клеток к длительному действию ГК. Выявлены особенности ответов астроцитов при воздействии HMW (высокомолекулярные полимеры) и LMW (низкомолекулярные полимеры) ГК, а также способности различных полимеров ГК модулировать TLR4 и TLR3 сигнальные пути. Показано, что адаптация астроцитов к ГК различной молекулярной массы снижает их способность отвечать на действие агонистов TLR3 и TLR4. Ингибитор биосинтеза ГК 4-MU (4-метилумбеллиферон) эффективен в регуляции воспалительного ответа астроцитов, поскольку снижает синтез простагландинов и провоспалительных цитокинов.

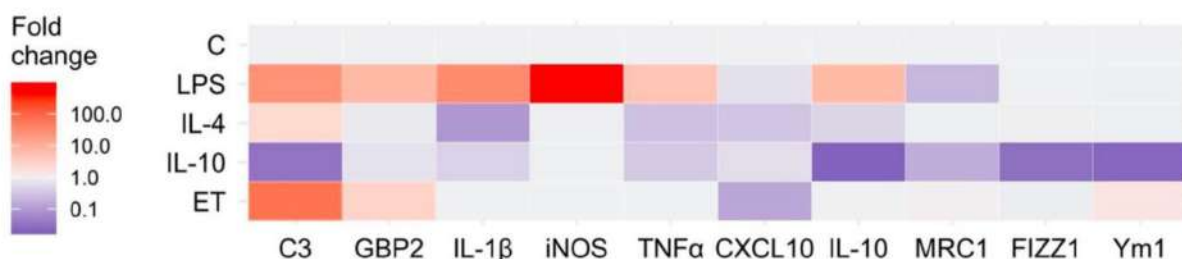
Сравнение адаптации клеток к длительному воздействию противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10 и провоспалительного стимула LPS

Представление о том, что клетки могут приобретать различные фенотипы в зависимости от микроокружения, в настоящее время подтверждается большим количеством данных. Однако вопрос о том, как адаптация к микроокружению (например, действие про- или противовоспалительных стимулов в течение длительного времени) может изменить ответы клеток на провоспалительные стимулы, остается открытым. Механизмы таких изменений и возможность их направленной регуляции оставались неизученными. Поэтому мы стимулировали астроциты интерлейкинами с противовоспалительными свойствами (IL-4, IL-10) и LPS в течение 24 ч и охарактеризовали с использованием ранее предложенных маркеров фенотипирования: экспрессия генов IL-10, MRC1, FIZZ1, Ym1 как противовоспалительная адаптация; гены IL-1 β , iNOS, TNF α , C3, GBP2, CXCL10 как провоспалительная (классическая) адаптация (Jang *et al.* 2013; Hartmann *et al.* 2019) (Рис. 9А). Дополнительно мы проверили, меняет ли адаптация к низкой концентрации LPS (10 нг/мл) экспрессию генов-маркеров (рис. 9А). Такую обработку клеток низкой концентрацией LPS обозначили ET (эндотоксин), чтобы отличить ее стимуляции клеток более высокими концентрациями LPS (100 нг/мл) (рис. 9А).

Получено, что LPS вызывает классическую адаптацию, в то время как IL-4 и IL-10 выявляют два подмножества альтернативной адаптации (Рис. 9А). Действительно, стимуляция LPS заметно активировала большинство провоспалительных генов (C3, GBP2, IL-1 β , iNOS, TNF α) и противовоспалительный ген IL-10, но не влияла на экспрессию FIZZ1, Ym1 или провоспалительного гена CXCL10 и даже приводила к снижению альтернативного маркерного гена MRC1 (рис. 9А). Напротив,

антивоспалительные цитокины IL-4 и IL-10 не оказывали значительного влияния на провоспалительные гены и даже снижали их по сравнению с контрольными уровнями экспрессии (Рис. 9А).

А экспрессия генов



Б профиль оксипинов

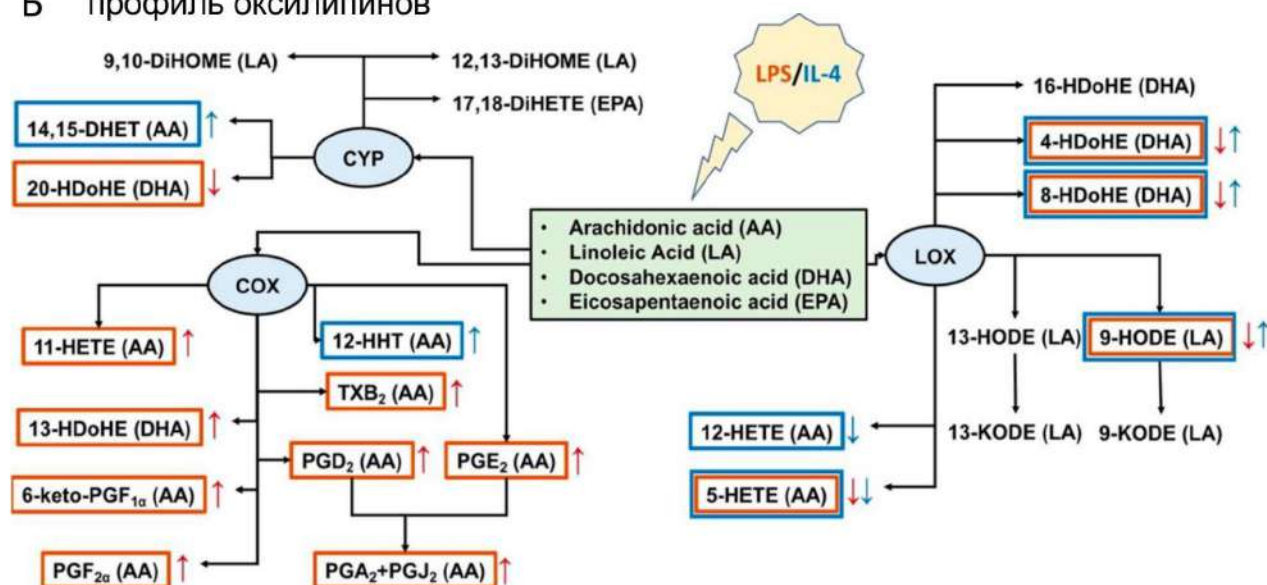


Рис. 9. Идентификация клеточного ответа астроцитов при их адаптации к различным про- и антивоспалительным стимулам. (А) Тепловая карта данных экспрессии мРНК генов-маркеров при обработке клеток LPS (100 нг/мл), IL-4 (10 нг/мл), (IL-10, 20 нг/мл) в течении 24 часов и (ET, LPS 10 нг/мл, 48 ч). (Б) Схема профилей оксипинов для классической (LPS) и альтернативной (IL-4) адаптации астроцитов. Детектируемые оксипины отмечены красной рамкой для классической и синей рамкой для альтернативной адаптации. Стрелка соответствующего цвета означает снижение (↓) или повышение (↑) синтеза метаболита.

При анализе профилей оксипинов получено следующее. В клетках, адаптированных к LPS, наблюдали значительное увеличение концентрации метаболитов AA: 6-кето-PGF_{1α}, PGA₂ + PGJ₂, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, TXB₂ и 11-НЕТЕ, а также метаболита DHA 13-НДоНЕ, при этом снижались метаболиты DHA 20-НДоНЕ, 8-НДоНЕ, 4-НДоНЕ и метаболит AA 5-НЕТЕ (рис. 9Б). В клетках, адаптированных к IL-4, наблюдали увеличение 12-ННТ, 14,15-ДНЕТ, 4-НДоНЕ, 8-НДоНЕ и 9-НОДЕ, а также снижение 5-

НЕТЕ (Рис. 9Б). В клетках, адаптированных к IL-10, не было выявлено изменений в метаболитах, образующихся по СОХ-пути, но наблюдали изменения в метаболитах, образующихся из LOX (увеличение 8-HDoHE, 9-NODE и снижение 12-НЕТЕ, 5-НЕТЕ), также наблюдали снижение СУР-производного метаболита DHA 20-HDoHE и метаболитов LA 12,13-DiHOME, 9,10-DiHOME (Chistyakov *et al.* 2020c). При ЕТ-адаптации наблюдали увеличения PGE₂, PGA₂ и PGJ₂ (путь AA-СОХ). Профили оксипинов также выявили изменения в используемых как субстраты ПНЖК: наблюдали снижение содержания 9-NODE, 13-NODE (путь LA-LOX), 8-HDoHE (DHA, LOX или неферментативный путь) и увеличение 13-HDoHE (путь DHA-СОХ). Это означает, что ЕТ-адаптация ближе к классическим ответам астроцитов (Chistyakov *et al.* 2020c). Таким образом, наряду с генами маркерами, профили оксипинов могут служить маркерами про- или противовоспалительных адаптаций. Мы наблюдали преобладающее участие ω-6 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и циклооксигеназной ветви для классической (LPS) провоспалительной адаптации и ω-3 ПНЖК и липоксигеназной ветви для альтернативной (IL-4) противовоспалительной адаптации.

На следующем этапе изучили, как адаптации различаются по способности клеток отвечать на острую стимуляцию LPS (100 нг/мл в течение 4 ч) (Рис. 10). Ответы оценивали по экспрессии генов-маркеров провоспалительных заболеваний (рис. 10А), высвобождению белков IL-1β и TNFα (Рис. 10Б), профилю оксипинов (Рис. 10В).

В клетках, адаптированных к ЕТ, наблюдали снижение PGF_{2α}, 6-кето-PGF_{1α}, 12-ННТ, 14,15-DHET, 12-НЕТЕ и 5-НЕТЕ и повышение PGA₂+PGJ₂, PGE₂, PGD₂, TXB₂, 11-НЕТЕ и 13-HDoHE (Рис. 10В). Для клеток, адаптированных к IL-4, наблюдали снижение PGF_{2α}, 16-HDoHE и 20-HDoHE, и увеличение 12-ННТ, PGA₂+PGJ₂, PGD₂, TXB₂, 11-НЕТЕ, 14,15-DHET (Рис. 10В) при стимуляции LPS. В клетках, адаптированных к IL-10, LPS-модуляция метаболитов СОХ-пути не изменилась по сравнению с LPS-стимулированными клетками без обработки, но было заметно снижение метаболитов DHA: 16-HdoHE и 20-HDoHE (Рис. 10В). Таким образом, различные адаптации астроцитов меняют ответы клеток на острую стимуляцию LPS.

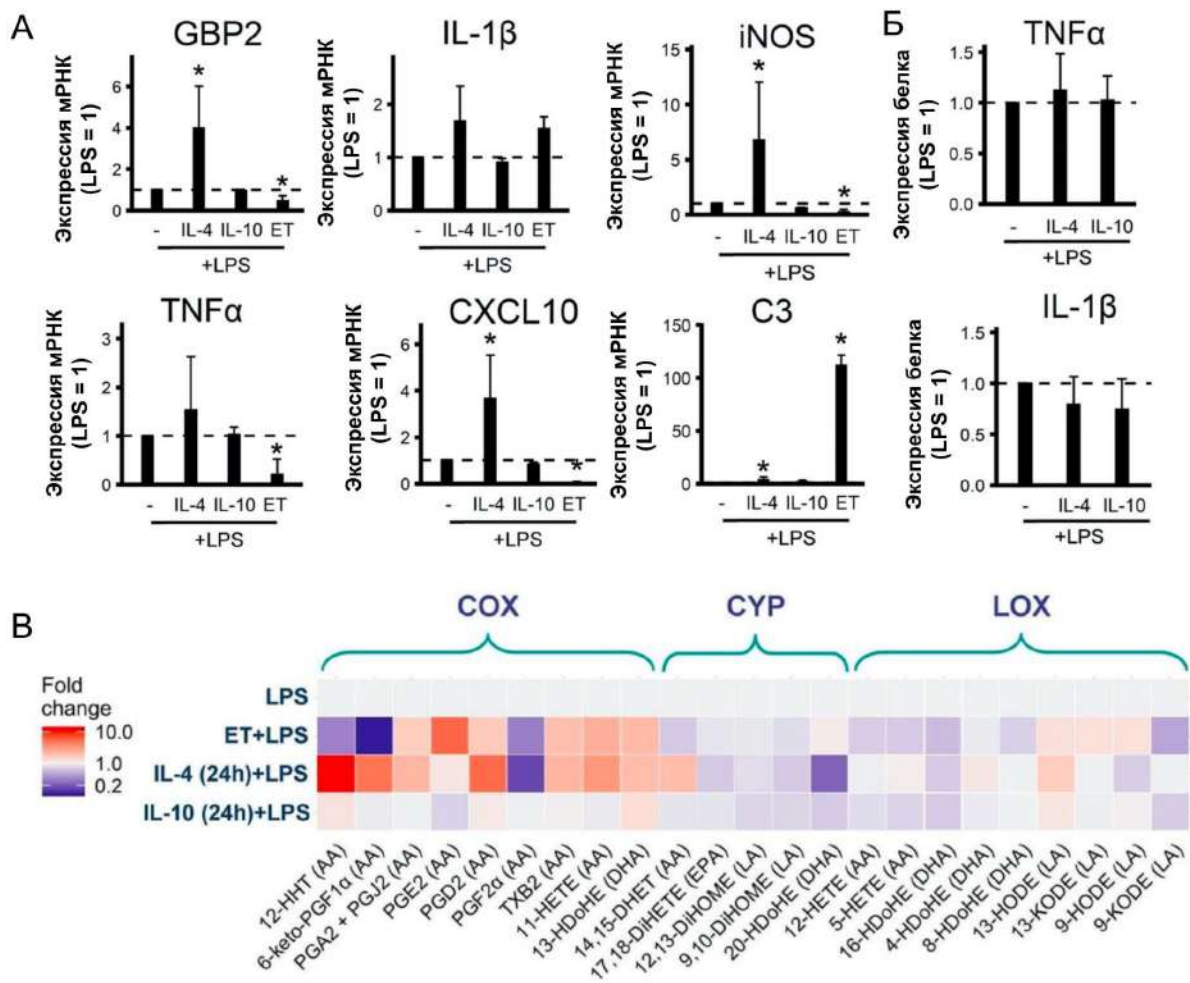


Рис. 10. Влияние клеточных адаптаций на LPS-стимулированный клеточный ответ. Первичные культуры астроцитов крысы предварительно обрабатывали IL-4 (10 нг/мл) или IL-10 (20 нг/мл) в течение 24 ч или адаптировали к эндотоксину в модели толерантности (LPS 10 нг/мл, 48 ч, ET), а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч. (А): экспрессия провоспалительных генов (значение при стимуляции LPS отмечено пунктирной линией). (Б): высвобождение белков TNFα и IL-1β. * $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками. (В): тепловая карта показывает относительное количество липидных медиаторов по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

Важные результаты также получены с культурами астроцитов, адаптированных к низким концентрациям LPS (ET адаптация). Для клеток системы врожденного иммунитета, таких как моноциты/макрофаги, был описан феномен толерантности, когда предварительное воздействие на клетки низких концентраций LPS приводит к тому, что клетки становятся менее чувствительными к действию высоких концентраций LPS при остром ответе. Для астроцитов этот феномен предполагался, но не был изучен. Мы показали, что маркеры воспаления, т.е. провоспалительный цитокин TNFα, индуцибельные ферменты COX-2 и iNOS (Chistyakov *et al.* 2019b), противовоспалительный цитокин IL-10, обнаруженные на уровне мРНК и белка, выявили сходство между астроцитами и макрофагами в данной

модели: 1) толерантность по провоспалительным маркерам; 2) прайминг по IL-10 (Chistyakov *et al.* 2019b). При синтезе оксипинов в ответ на LPS прайминг происходил в следующих соединениях: 11-гидроксиэйкозатетраеновая кислота (11-НЕТЕ), простагландины D₂ (PGD₂) и E₂ (PGE₂), циклопентеноновые простагландины (PGA₂+PGJ₂), тромбоксан В₂ (ТХВ₂). Толерантность наблюдалась в случае 12-гидроксигептадекатриеновой кислоты (12-ННТ), простагландина F_{2α} (PGF_{2α}) и 6-кето-простагландина F_{1α} (6-кето-PGF_{1α}). Синтез этих веществ был практически остановлен (Рис. 11). Таким образом, для астроцитов характерны эффекты прайминга и толерантности при действии LPS, что отражается на соотношении оксипинов, образующихся по СОХ-пути из АА, и экспрессии генов-маркеров воспаления.

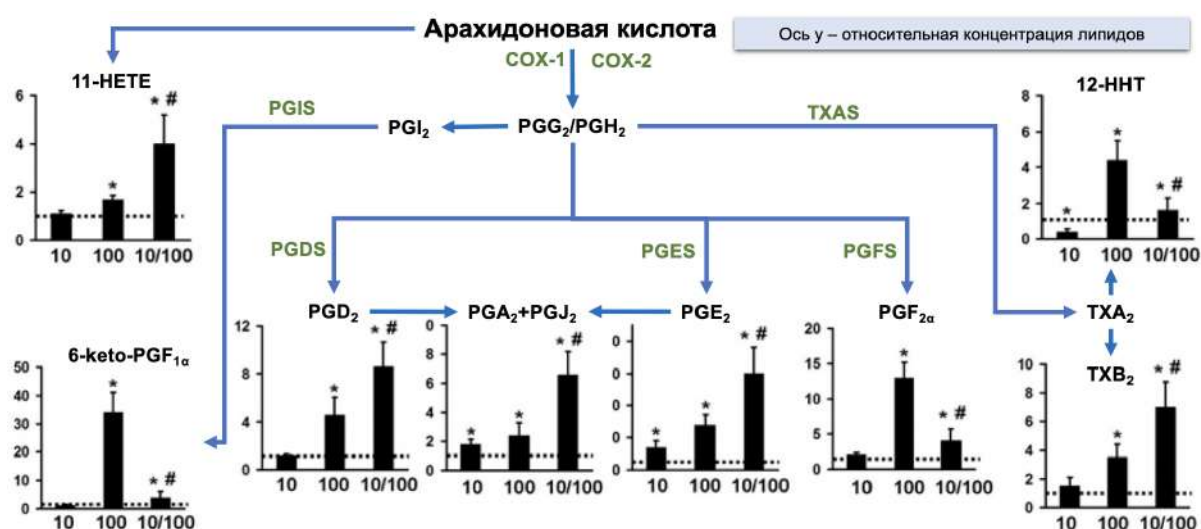


Рис. 11. Сравнительный профиль эйкозаноидов в астроцитах, стимулированных LPS 10 нг/мл в течение 48 ч отдельно или в сочетании с LPS 100 нг/мл в течение 4ч. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками, # $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

Астроциты адаптируются к длительному воздействию как провоспалительных (LPS), так и противовоспалительных (IL-4, IL-10) стимулов. Между разными адаптациями существуют различия в профилях оксипинов и маркеров воспалительных ответов, проявляющиеся в функциональных свойствах этих адаптационных состояний, т.е. ответах на острую стимуляцию LPS. Таким образом, впервые охарактеризована TLR-сигнальная система при адаптации клеток к провоспалительному стимулу (LPS), противовоспалительным цитокинам (IL-4, IL-10). Показано, что профили оксипинов могут служить маркерами про- или противовоспалительных адаптаций.

Модулирование профиля оксипинов, выбрасываемых астроцитами, снижает нейротоксичность

Астроциты высвобождают различные иммунные и воспалительные медиаторы, такие как про- и противовоспалительные цитокины и оксипины, которые могут оказывать нейротоксическое или нейропротекторное действие, однако природа таких сигналов остается под вопросом. Ранее действие отдельных оксипинов проверялось на их нейропротекторную или нейротоксическую активность. Полученные данные свидетельствуют о том, что изучение отдельных веществ может быть полезным в поиске потенциальных терапевтических препаратов; однако для понимания биологии воспалительных процессов оксипины необходимо изучать в смесях, поскольку активация клеток, вызванная провоспалительным стимулом, вызывает одновременное высвобождение различных типов оксипинов, и их действие может проявляться как комбинация эффектов отдельных оксипинов. Из этого следует, что нейропротекторные свойства следует проверять не для отдельных оксипинов, а для их смесей.

Было известно, что супернатанты астроцитов, реагируя на воспалительные стимулы, вызывают гибель нейронов. Чтобы оценить вклад оксипинов в наблюдаемые токсические эффекты, мы провели серию экспериментов с LPS и ингибиторами 12-LOX (ML355) и 5-LOX (Zileuton, зилеутон). Астроциты стимулировали LPS (100 нг/мл, 24 ч) или ингибиторы + LPS, затем выделяли липидную фракцию и добавляли её к культуре нейронов. Липидные фракции, выделяемые обработанными LPS астроцитами, обладали нейротоксической активностью и вызывали снижение жизнеспособности первичной культуры нейронов коры головного мозга крысы на $28 \pm 1,5\%$ ($p < 0,001$) (Рис. 12Б, левая пара столбцов). Липидные фракции после обработки зилеутоном были токсичными, как из наивных, так и из обработанных LPS астроцитов (рис. Рис. 12Б). Фракции астроцитов, обработанных зилеутоном или зилеутоном плюс LPS, снижали жизнеспособность на $24,3 \pm 3,6\%$ ($p < 0,001$) или $30,3 \pm 2,2\%$ ($p < 0,001$) соответственно, по сравнению с контрольной культурой. Фракции из астроцитов, обработанных ML355, не влияли на жизнеспособность культуры нейронов ($p = 0,64$). Более того, добавление ML355 устраняло токсический эффект LPS. Жизнеспособность культур нейронов, обработанных LPS и ML355, была на $21 \pm 5,2\%$ выше, чем у культур, обработанных LPS ($p = 0,001$). Таким образом, модуляция синтеза оксипинов с помощью ML355 устраняет токсический эффект липидной фракции.

Чтобы определить разницу между фракциями липидов, мы проанализировали профили оксипинов из астроцитов, обработанных только LPS, ML355 и зилеутоном или их комбинациями в течение 24 ч (Рис. 12А). Для дальнейшего анализа мы разделили липидные фракции, согласно

данным, представленным на рисунке 1, на "токсичные" (LPS, зилеутон, зилеутон + LPS) и "нетоксичные" (контроль, ML355, LPS + ML355). Сравнение отдельных метаболитов, различающихся между нетоксичными и токсичными группами, выявило два метаболита, концентрация которых была значительно увеличена (4-HDoHE, 8-HDoHE), и семь метаболитов, концентрация которых была значительно снижена (13-HDoHE, PGE₂, PGA₂ + PGJ₂, PGD₂, PGF_{2α}, 11-HETE, 6-кето-PGF_{1α}) (Рис. 12В). Проведенный частичный дискриминантный анализ по методу наименьших квадратов (PLS-DA) (Рис. 13Г) выявил три оксипирина (13-HDoHE, 4-HDoHE и 17-HDoHE), которые являются производными ДНА, как потенциальные нейротекторные субстанции из липидных фракций астроцитов.

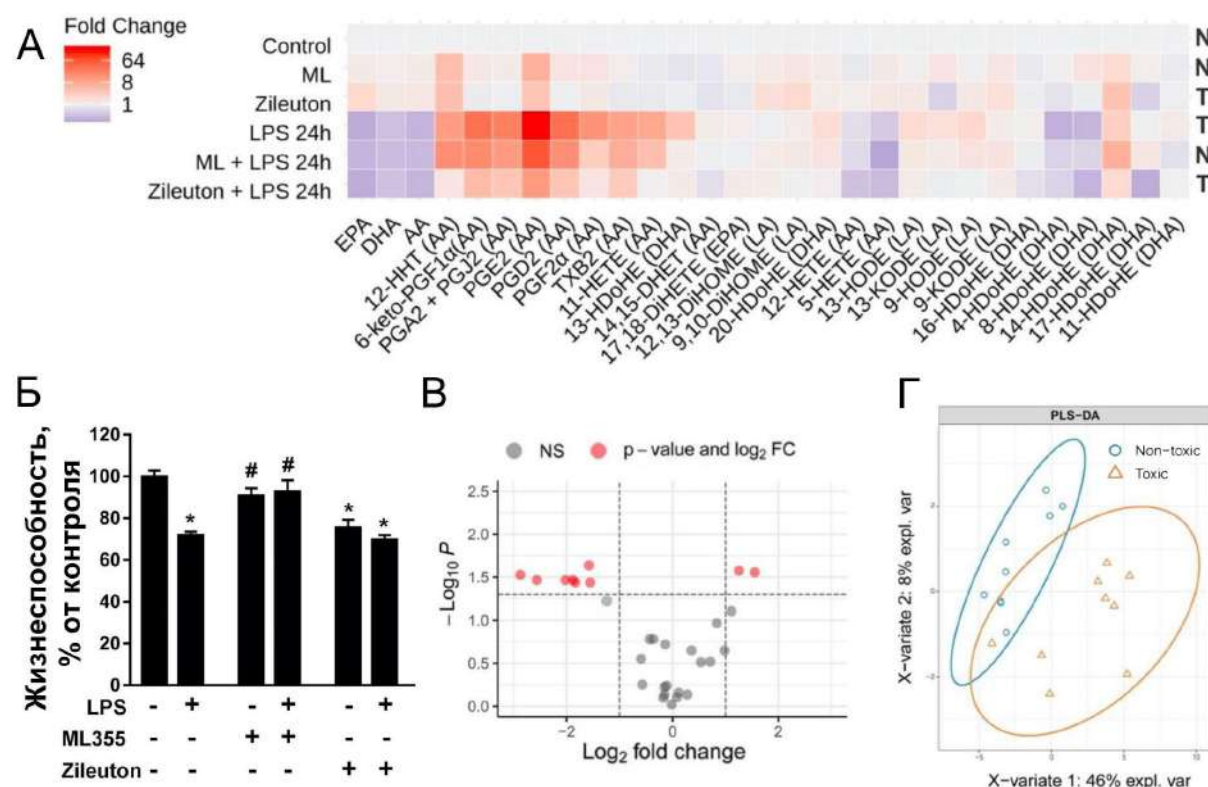


Рис. 12. Влияние предобработки астроцитов ML355 или зилеутоном на состав профиля оксипиринов и нейротоксичность липидных фракций. Первичную культуру нейронов коры головного мозга крысы инкубировали в течение 48 ч с липидными фракциями, полученными из внеклеточной среды астроцитов, активированных в течение 24 ч только LPS (100 нг/мл) или с зилеутоном (10 мкМ) или ML355 (10 мкМ). (А) липидный профиль фракций, полученных после обработки. (Б) жизнеспособность нейронов при обработке фракциями. (В, Г) сравнение профилей оксипиринов липидных фракций. *p<0,05 по сравнению с нейронами, обработанными липидной фракцией, полученной из нативных астроцитов; #p<0,05 по сравнению с нейронами, обработанными липидной фракцией, полученной из LPS-стимулированных астроцитов.

Таким образом, оба испытанных ингибитора синтеза оксилипинов — ML355 и зилеутон — снижают LPS-стимулированный клеточный ответ астроцитов, при этом только ингибитор 12-LOX ML355 может изменить свойство липидных фракции с нейротоксических на нетоксические. Это может быть обусловлено повышением в смеси оксилипинов концентрации производных n-3 докозагексаеновой кислоты — 4-HDoHE, 8-HDoHE и 17-HDoHE.

Антивоспалительные свойства агонистов и антагонистов ядерных рецепторов PPAR

Регуляция ответов астроцитов на воспалительные стимулы с помощью малых молекул является потенциальной терапевтической стратегией. Многие оксилипины считаются эндогенными лигандами ядерных лигандов PPAR. Известны три типа PPAR: α , β , γ . Все эти типы характерны для астроцитов, и к ним существуют агонисты и антагонисты, многие из которых являются терапевтическими средствами с гипогликемическими, гиполипидемическими, урикозурическими и антиагрегационными свойствами. Они также изучаются как потенциальные противовоспалительные препараты.

В серии экспериментов мы исследовали способность синтетических лигандов ядерных рецепторов PPAR модулировать ответ астроцитов на LPS по следующим параметрам: 1) высвобождение ПНЖК и оксилипинов; 2) высвобождение цитокинов TNF α и IL-10; 3) фосфорилирование p38, JNK, ERK MAPKs. В наших экспериментах астроциты обрабатывали LPS отдельно или в комбинации с лигандами (агонист/антагонист) PPAR: PPAR α (фенофибрат/GW6471); PPAR β (GW501516/GSK0660); PPAR γ (росиглитазон/GW9662). Анализировали профили из 28 оксилипинов, классифицированных в соответствии с их метаболическими путями, а также ПНЖК (AA, DHA, EPA). Выявлено, что все протестированные лиганды PPAR снижают уровень оксилипинов, образующихся по COX-пути (Рис. 13А); наиболее сильным эффектом обладают оба лиганда PPAR β (Рис. 13 А, Б). Агонист PPAR β GW501516 является сильным индуктором прорезорбтивных веществ, производных DHA: 4-HDoHE, 11-HDoHE, 17-HDoHE (Рис. 13. Б). Все протестированные лиганды PPAR снижали высвобождение провоспалительного цитокина, TNF α (Chistyakov *et al.* 2020a). Агонист PPAR β GW501516 и агонист PPAR γ , росиглитазон индуцировали высвобождение противовоспалительного цитокина IL-10; индекс цитокинов, (IL-10/TNF α) был больше для GW501516 (Рис. 13. В). Лиганды PPAR β , GW501516 и GSK0660, также являются сильнейшими ингибиторами LPS-индуцированного фосфорилирования p38, JNK, ERK MAPK (Chistyakov *et al.* 2020a). В целом, наши данные показали, что лиганды PPAR β являются потенциальными про- и противовоспалительными препаратами для воздействия на процессы нейровоспаления с участием астроцитов.

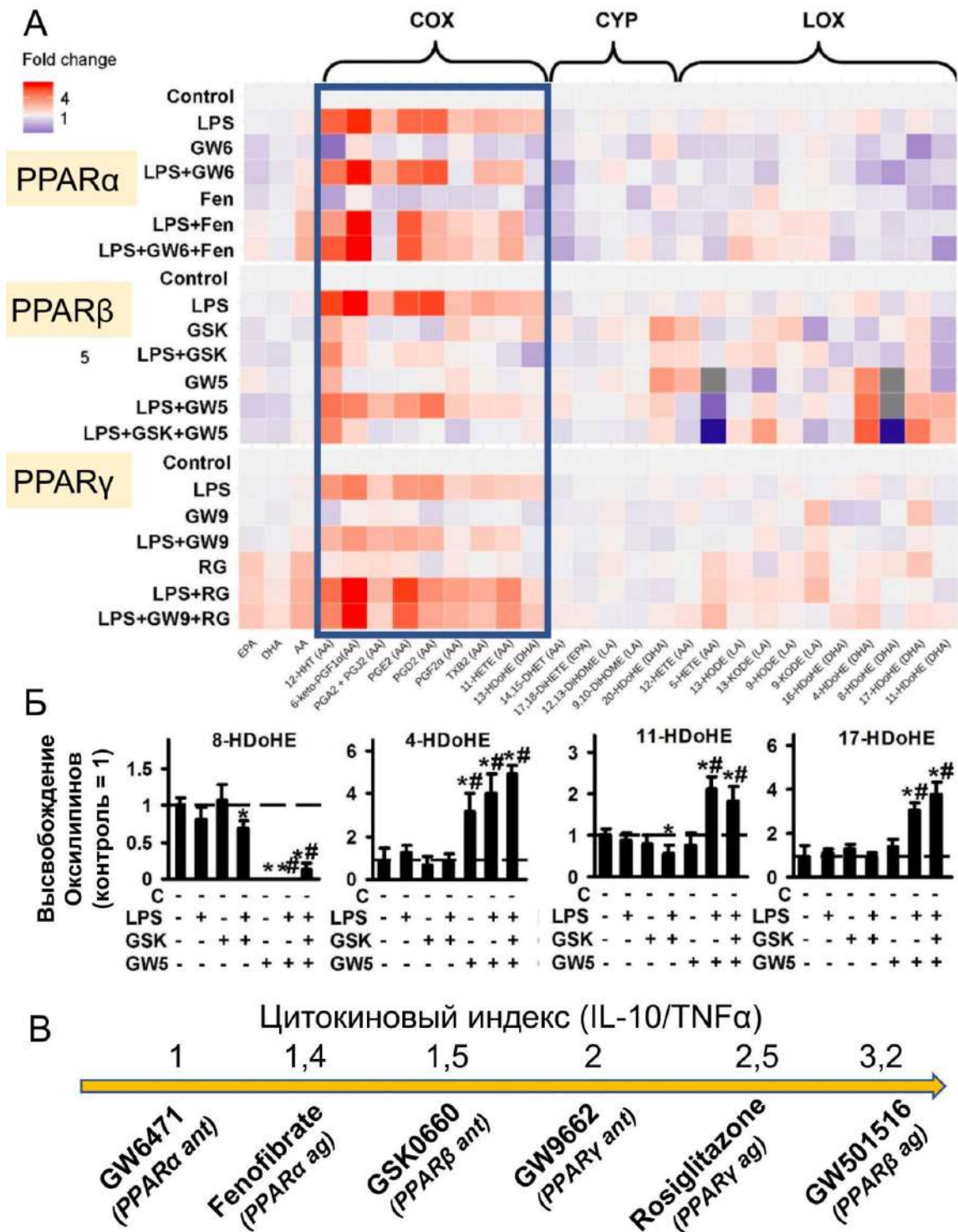


Рис. 13. Влияние агонистов и антагонистов PPAR на LPS-стимулированный клеточный ответ. Первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 30 мин агонистами (Fenofibrate (Fen, 50 μ M), GW501516 (GW5, 25 μ M), rosiglitazone (RG, 20 μ M)) или антагонистами (GW6471 (GW6, 5 μ M), GSK0660 (GSK, 5 μ M), GW9662 (GW9, 5 μ M)) или в комбинации, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч. (А) Профиль оксипинов, (Б) изменение производных ДНА под действием агониста/антагониста PPAR β , * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками (В) изменение соотношения белков IL-10/TNF α в клеточном супернатанте под действием исследуемых соединений.

Профили оксипинов как характеристическая подпись при заболеваниях человека

Для выявления возможности использования оксипинов как характеристической подписи при различных неинфекционных хронических заболеваниях, для которых описано участие воспалительных процессов, мы изучили профили оксипинов в биологических образцах пациентов с неврологическими заболеваниями, раком молочной железы и глаукомой. В ходе работы оценивали, может ли профиль оксипинов отражать наличие заболевания, его стадию и давать новую информацию о его патогенезе.

Профили оксипинов в плазме пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова (БВК)

На первом этапе была выбрана болезнь Вильсона-Коновалова (БВК). Это редкое аутосомно-рецессивное метаболическое расстройство, возникающее в результате мутаций в гене медь-транспортирующей АТФ-азы Р-типа АТР7В. В то же время влияние эпигенетики, окружающей среды, возраста и половых факторов на фенотип БВК осложняет диагностику и клинические проявления. Мы идентифицировали 43 оксипина в профилях плазмы 39 пациентов с различными клиническими проявлениями БВК и сравнили этот профиль с данными, полученными у 16 здоровых контрольных пациентов (КГ). Анализ данных с помощью VolcanoPlot и частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA) показал, что восемь оксипинов и липидов определяют различия между БВК и КГ: ЕРА, ОЕА, 9-HODE, 9-KODE, 12-ННТ, PGD₂, PGE₂ и 14,15-DHET (14,15-дигидроксиэйкозатриенная кислота) (**Рис. 14А, Б**). Соединения 9-HODE, 9-KODE, ОЕА, ЕРА относят к окислительному стрессу. 9-HODE, 9-KODE, PGE₂, 12-ННТ, PGD₂ рассматривают как маркеры воспаления. 9-HODE, 9-KODE, ОЕА, ЕРА, 14,15-DHET являются лигандами PPAR. Наши результаты свидетельствуют об изменении профилей оксипинов плазмы у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова. Биологическая характеристика выявленных соединений указывает на вовлеченность окислительного стресса, воспалительных процессов и сигнальных путей PPAR в данное заболевание, что открывает новые возможные терапевтические мишени и стратегии вмешательства для лечения БВК (Azbukina *et al.* 2020).

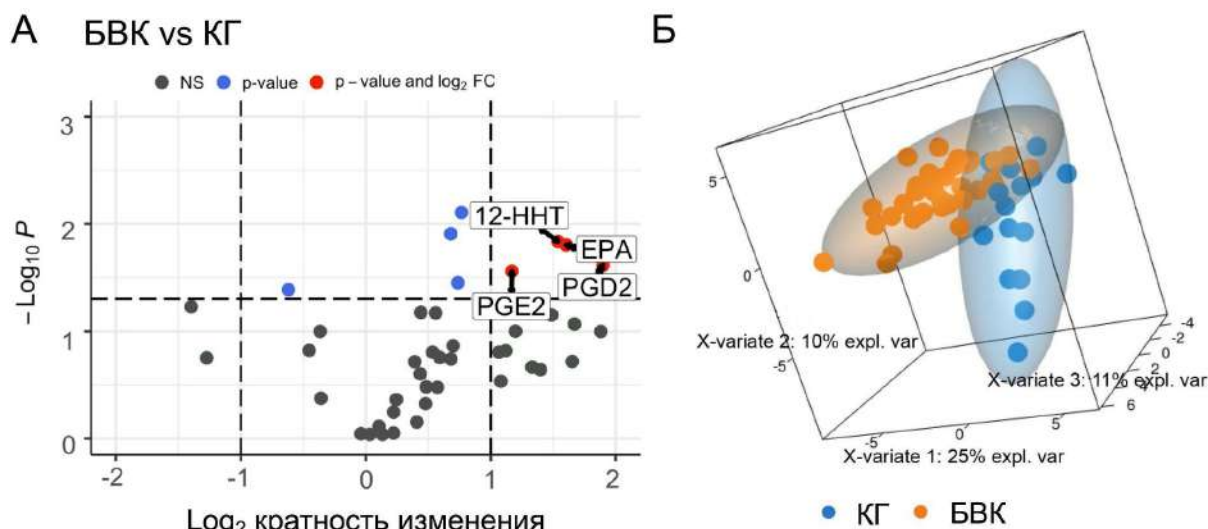


Рис. 14. Изменения в содержании сигнальных липидов в плазме пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова. (А) Вулканная диаграмма, показывающая значительно изменившиеся соединения. (Б) Модель PLS2-DA, представленная в трехмерном виде, демонстрирует разделение между пациентами из группы КГ и БВК.

Профили оксипинов во внутриглазной жидкости пациентов с первичной открытоугольной глаукомой

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) характеризуется дегенерацией ганглиозных клеток сетчатки, связанной с повышением внутриглазного давления (ВГД) из-за затрудненного дренажа внутриглазной жидкости (ВГЖ) через трабекулярную сеть и увеосклеральный путь. Известно, что ПНЖК и оксипины являются сигнальными липидами, регулирующими нейровоспаление, выживание нейронов и отток ВГЖ. Однако исследований об изменениях оксипинов в ВГЖ пациентов с ПОУГ ранее не проводилось. Мы изучили профиль сигнальных липидов при глаукоме путем определения их изменений в ВГЖ, сопровождающих рост ВГД и прогрессирование заболевания. Глазные жидкости были собраны у пациентов с ПОУГ различных стадий (24 пациента) и у пациентов с катарактой без глаукомы (14 пациентов использовали как контроль).

Липидомный анализ позволил идентифицировать 22 соединения ПНЖК и оксипинов в ВГЖ пациентов с ПОУГ. Мы провели попарные сравнения концентрации каждого из выявленных соединений у больных и здоровых доноров с поправкой на возраст и пол, используя ANCOVA. Как видно из полученного графика вулканов с поправкой Холма-Бонферрони, разницу между группами обеспечивали только два LA-производных оксипинов — 12,13-DiHOME и 13-KODE, которые продемонстрировали значительное увеличение при глаукоме (Рис. 15А). Оценка соединений с помощью PLS-DA выявила те же оксипины 12,13-DiHOME и 13-KODE,

дополненные фосфолипидным производным lyso-PAF, который также был повышен при ПОУГ (Рис. 15Б).

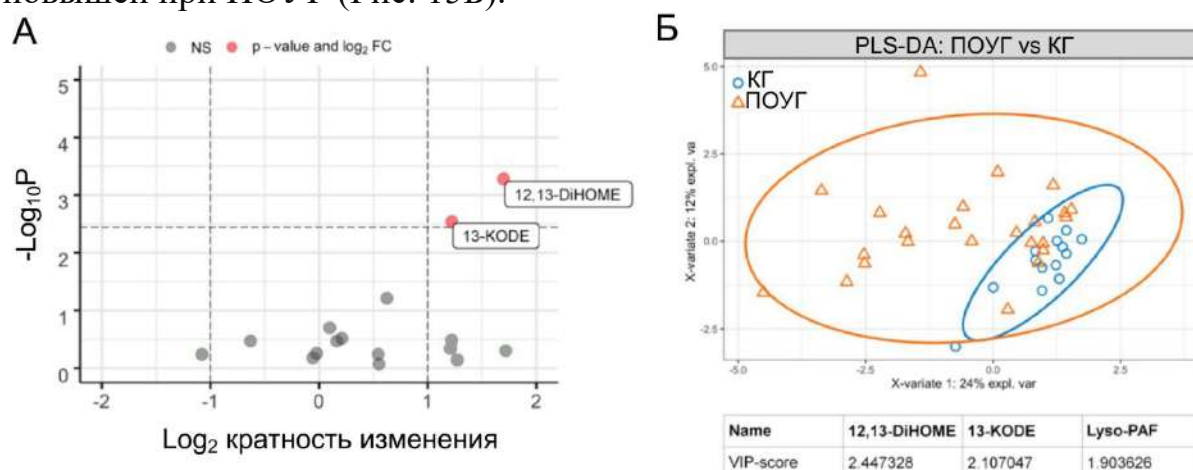


Рис. 15. Изменения в содержании сигнальных липидов в АГ в общей когорте пациентов с ПОУГ. (А) На вулканической диаграмме представлены соединения, дискриминирующие общую группу пациентов с ПОУГ и контрольную группу. (Б) результаты частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA), выявляющего соединения, отличающие пациентов с тотальной глаукомой (ПОУГ) от контрольных лиц (КГ).

Учитывая, что ПОУГ является медленно прогрессирующим заболеванием, определили, какие сигнальные липиды ВГЖ подвергаются изменениям при развитии заболевания. PLS-DA использовали для сравнения данных для каждой из подгрупп ПОУГ в зависимости от стадии, с данными контрольной группы. Изменения чаще всего обеспечивались одними и теми же соединениями, а именно 12,13-DiHOME, 13-KODE и лизо-PAF. Также дополнительно регистрировали различия в содержании АА и 9-HODE, концентрации которых были повышены у больных по сравнению с контрольной группой и увеличивались по мере прогрессирования заболевания.

Выявленное изменение профиля оксипинов расширяет представление о возможности лечения глаукомы через направленное модулирование сигнальных путей с участием этих липидов. В настоящее время в качестве фармакотерапии различных глазных заболеваний испытываются ингибиторы эпоксидгидролаз. Показанное нами увеличение 12,13-DiHOME, продукта этих ферментативных путей, может указывать на молекулярные механизмы положительных терапевтических эффектов ингибиторов при глаукоме. Показанное увеличение оксипинов HODEs/KODEs, связанных с окислительным стрессом, дает дополнительное обоснование для включения антиоксидантов в комплексную терапию этого заболевания. Важно отметить, что сходные изменения профиля оксипинов были обнаружены в слезной жидкости при анализе тех же пациентов (Azbukina *et al.* 2021). Поскольку слезную

жидкость можно собирать с помощью неинвазивной процедуры, это указывает на возможность рассматривать данные оксипирины как биомаркеры глаукомы.

Профили оксипиринов в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона.

Болезнь Паркинсона (БП) — это дегенеративное заболевание центральной нервной системы, этиология которого до сих пор плохо изучена. Охарактеризовано несколько молекулярных механизмов, вовлеченных в патогенез заболевания, в том числе агрегация α -синуклеина, окислительный стресс, генетические мутации, дисфункция митохондрий, а также нейровоспаление. Хотя связь отдельных липидов, в том числе оксипиринов, с различными процессами, проявляющимися при болезни Паркинсона, была показана ранее, оставалось неясным, могут ли профили оксипиринов в крови отражать различные стадии заболевания.

Мы проанализировали профили оксипиринов в плазме крови 36 добровольцев контрольной группы (КГ) и 73 пациентов с БП, разделенных на раннюю (L/M, 29 пациентов) и позднюю (Н, 44 пациента) стадии на основании шкалы Хен-Яра (Рис. 16А). Для оценки отдельных метаболитов, различающихся между группами L/M и КГ или Н и КГ, проведены попарные сравнения нормализованных концентраций метаболитов. Результаты были проиллюстрированы с помощью вулканной диаграммы с поправкой Холма-Бонферрони (Рис. 16 Б,В). При сравнении L/M с КГ ни одна из концентраций метаболитов не была значительно повышена, в то же время концентрация широкого спектра метаболитов снизилась, включая АА и пять производных АА (АЕА, ТХВ₂, РGE₂, 15-НЕТЕ, 11-НЕТЕ), двух производных ДНА (14-НДоНЕ и 16-НДоНЕ) (Рис. 16Б). Сравнение Н с КГ показало снижение концентрации АЕА, LTE₄ и повышение концентрации четырех производных АА (19-НЕТЕ, 12-НЕТЕ, РGD₂, РGA₂+РGJ₂), одного производного ДНА (8-НДоНЕ), трех производных LA (9-КОДЕ, 13-КОДЕ, 13-НОДЕ) и ЕРА (Рис. 16В).

Анализ результатов показал, что воспалительные процессы на уровне синтеза оксипиринов активируются по мере прогрессирования БП: на начальных стадиях концентрации СОХ/ЛОХ производных АА и ЛОХ-производных ДНА снижались, а при тяжелой стадии наблюдалось увеличение синтеза АА-производных по СОХ-пути и LA-производных по ЛОХ пути. Результаты позволяют предположить, что может быть перспективно добавлять ингибиторы ферментов, ответственных за синтез оксипиринов (СОХs и ЛОХs) к стандартной терапии БП в отдельных когортах с III-IV стадиями по шкале Хен-Яра, поскольку они потенциально могут помочь в снижении нейровоспаления и замедлении прогрессирования БП путем модуляции профиля оксипиринов. С другой стороны, на более ранних и средних стадиях заболевания может быть

перспективно использование добавок с такими молекулами, как анандамид или специализированные медиаторы разрешения воспаления.

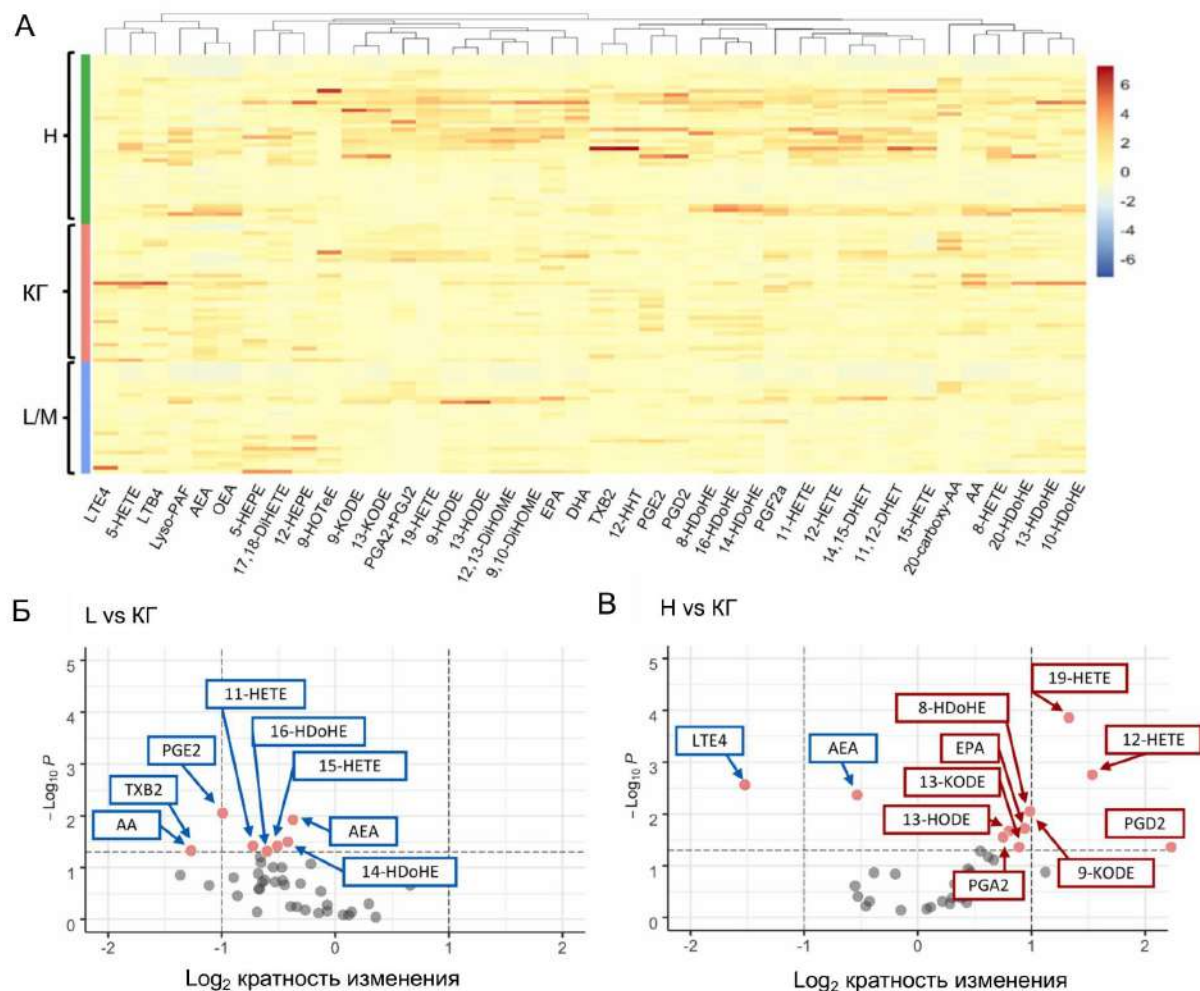


Рис. 16. Стадии БП по шкале Хен-Яра - корреляция с концентрацией метаболитов оксипинов в плазме. (А) Тепловая карта концентраций оксипинов. Н - пациенты 3-4 стадии Хен-Яра, КГ - здоровый контроль, L/M - пациенты 1-2 стадии Хен-Яра. (Б,В) Вулканные диаграммы, показывающие значительно измененные соединения. Соединения, которые изменились незначительно, обозначены серым цветом. Красными точками обозначены соединения, для которых $p < 0,05$.

Профили оксипинов в плазме крови при раке молочной железы (РМЖ)

Участие оксипинов и ПНЖК в патогенезе рака известно давно, однако в наше время с развитием методов детекции появилась возможность системного подхода к этим исследованиям. Более того, существует большое количество открытых баз данных изменения транскриптомов, полученных из различных биоматериалов пациентов с данным заболеванием. Целью нашего исследования было выяснить изменения в метаболизме оксипинов как характеристики больных раком молочной железы. Мы сравнили профиль оксипинов в плазме крови 152 здоровых добровольцев (КГ) и 169 пациентов с различными стадиями рака молочной

железы (РМЖ). Было выявлено 18 оксипинов, метаболитов омега-3 и омега-6 ПНЖК, которые дифференциально экспрессировались между пациентами КГ и РМЖ, включая анандамид, простагландины и гидроксидокозагексаеновые кислоты (Рис. 17).

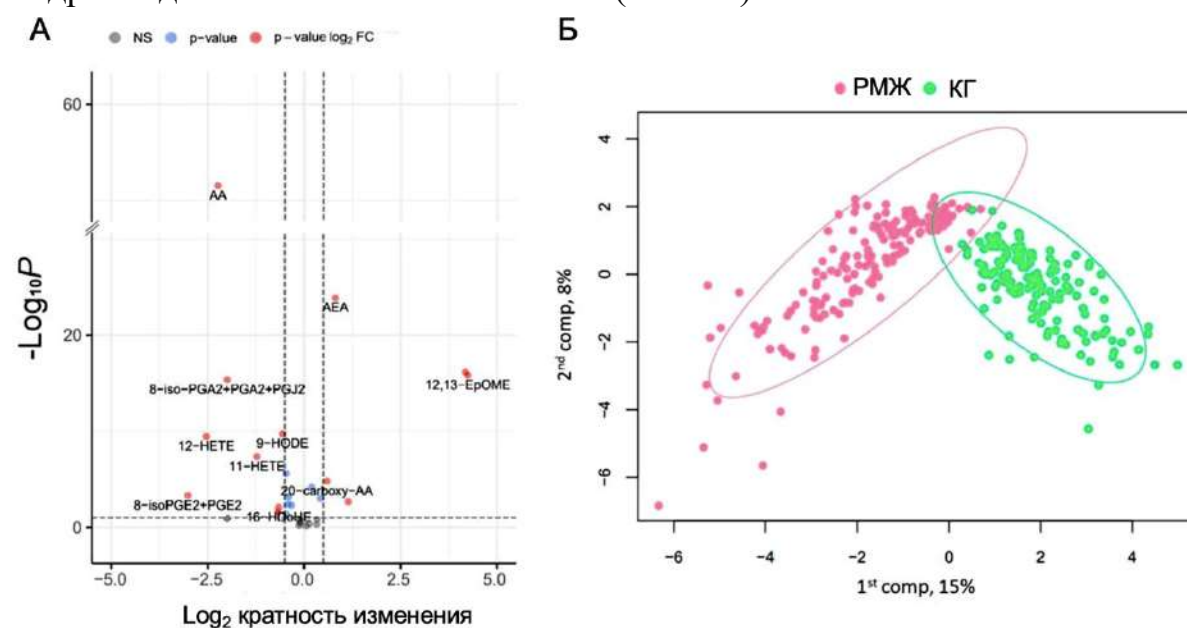


Рис. 17. Изменения в содержании сигнальных липидов в плазме пациентов с раком молочной железы. (А) Вулканная диаграмма, показывающая значительно измененные соединения. Красными точками отмечены соединения, которые изменились более чем в два раза и имели p-value (скорректированное) <0,05. (Б) Модель PLS-DA, дискриминирующая ГК и РМЖ. Объясненная дисперсия каждого компонента указана в скобках на соответствующей оси.

Мы наблюдали повышение концентрации производных АА, синтезируемых по СОХ-пути, снижение концентрации метаболитов, синтезируемых по эпоксигеназному пути (метаболиты АА и LA), LOX-пути (метаболиты DHA), а также снижение концентрации эндогенного каннабиноида анандамида (AEA) в крови больных РМЖ. Это согласуется с данными, полученными ранее в литературе для отдельных соединений, таких как PGE2 или LOX-метаболиты линолевой и линоленовой кислот. Наши данные показывают, что спектр профиля оксипинов смещен в сторону провоспалительного ответа, поскольку наблюдается увеличение PGE2, снижение AEA и других производных с противовоспалительными свойствами.

Поскольку известно, что оксипины способны синтезироваться непосредственно в клетках опухоли, в пораженном органе вокруг опухоли, в клетках крови, эндотелиальных клетках сосудов и других частях организма, и все эти источники могут вносить вклад в состав оксипинов плазмы крови, поэтому мы сопоставили данные липидомики, транскриптомики и геномики, проанализировав транскриптом 10 открытых наборов данных, полученных из образцов биопсии тканей пациентов с

РМЖ и клеток крови пациентов с РМЖ. Всего было проанализировано 125 образцов больных и 94 здоровых контролей.

Анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГи) образцов тканей и крови пациентов с РМЖ показал, что 19 генов биосинтеза оксипинов изменяют уровень экспрессии (Рис. 18), однако мы не наблюдали прямой корреляции между профилем оксипинов плазмы крови и изменениями на уровне экспрессии генов в тканях и клетках крови пациентов с РМЖ. Проведенный совместный анализ данных профиля оксипинов плазмы и транскриптомов позволяет предположить, что изменения оксипинов в крови отражают общее состояние организма, а не изменения, наблюдаемые в конкретной опухолевой ткани.

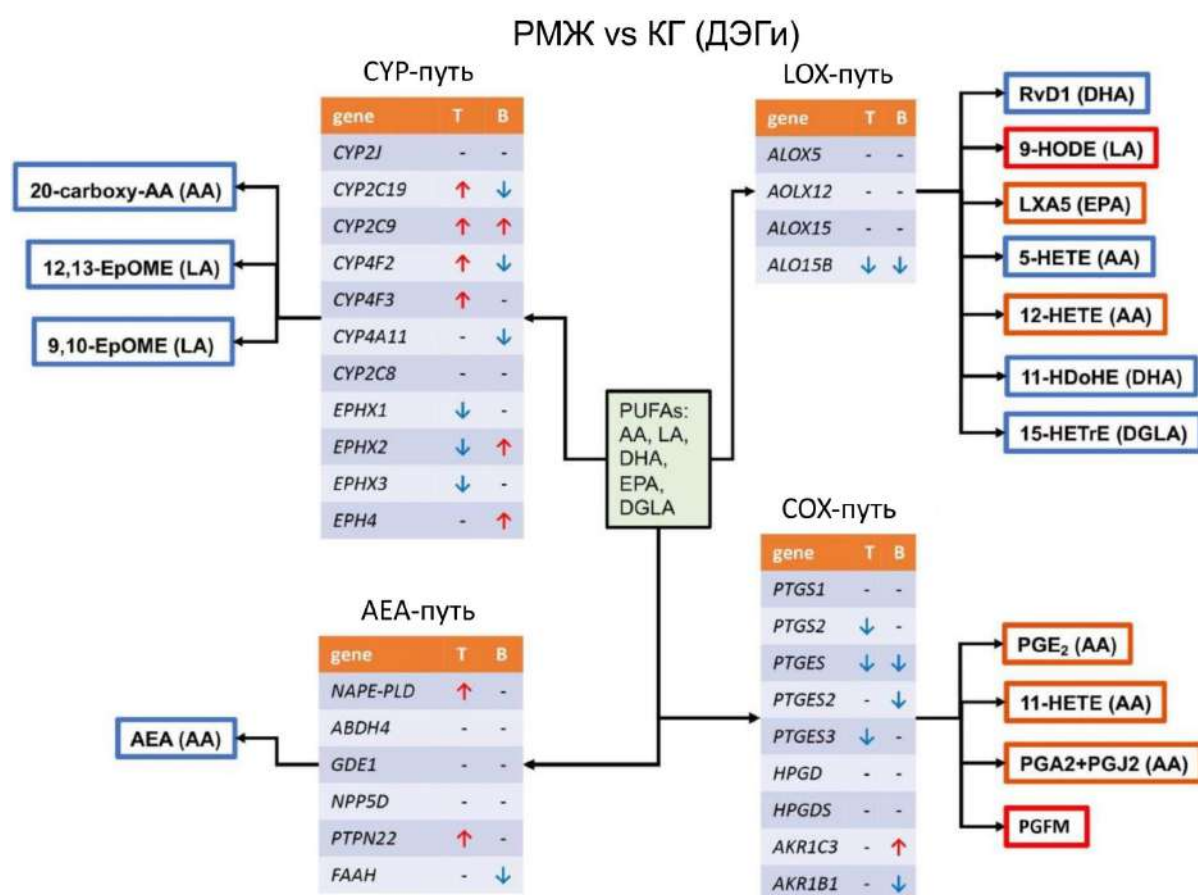


Рис. 18. Сопоставление измененных оксипинов у пациентов с РМЖ и ДЭГов в наборах данных транскриптомики тканей (Т) и крови (В) пациентов с РМЖ. Идентифицированные ДЭГ отмечены красной стрелкой для индуцированных генов при РМЖ и синей стрелкой для сниженных генов у пациентов с РМЖ.

Влияние молекулярного подтипа заболевания на экспрессию генов метаболизма оксипинов на примере рака молочной железы

РМЖ является ведущей причиной смертности от рака среди женщин во всем мире, однако систематического изучения метаболизма ПНЖК как системы взаимосвязанных процессов при этом заболевании не

проводилось. Используя подходы машинного обучения (сочетание непараметрических методов и алгоритма случайного леса (RF)), из 202 известных генов метаболизма оксипинов выявлено 33 гена, измененных в тканях рака молочной железы по сравнению с нормальными тканями, и 46 генов для разделения молекулярных подтипов РМЖ. Для каждого молекулярного подтипа рака молочной железы получены специфические закономерности изменения метаболизма ПНЖК, среди которых ген ELOVL5 оказался наиболее важным для общей классификации, в первую очередь для базального и люминального А подтипов. Экспрессия гена FABP7 оказала наибольшее влияние на выделение люминального подтипа В, а экспрессия гена ELOVL2 - на подтип, обогащенный HER2. Таким образом, подтипы РМЖ могут быть дифференцированы по генам метаболизма жирных кислот, а выявленные гены могут стать потенциальными биомаркерами и терапевтическими мишенями для различных подтипов РМЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашего исследования продемонстрировали, что астроциты способны активно отвечать на стимуляцию Толл-подобных рецепторов, при этом активно участвуя в синтезе провоспалительных оксипинов, в первую очередь производных арахидоновой кислоты, с вовлечением COX-пути их биосинтеза. Клеточные адаптации, такие как длительная обработка клеток цитокинами, глюкозой и гиалуроновой кислотой, меняют спектр синтезируемых оксипинов и значительно влияют на TLR4-активированный клеточный ответ.

В то же время использование разнообразных низкомолекулярных ингибиторов способно не только снижать провоспалительный клеточный ответ на уровне синтеза цитокинов и оксипинов, но и стимулировать синтез липидных медиаторов, производных ДНА, способствующих разрешению воспалительного ответа. Таким образом, можно предположить, что астроциты являются перспективной мишенью для терапии заболеваний с воспалительной компонентой не только за счет их участия в энергетическом метаболизме, но и за счет активной роли в синтезе широкого спектра оксипинов, липидных медиаторов воспаления.

Профиль оксипинов рассматривается как перспективный маркер различных заболеваний, характеризующий состояние организма. На примере нескольких заболеваний мы показали, что профиль оксипинов позволяет отделить больных от здоровых, может использоваться как маркер раннего начала заболевания, а также отражает стадию заболевания, имея характерные изменения в профиле в зависимости от типа патологии. Причем, по всей видимости, изменение состава оксипинов крови является маркером общего состояния организма и может быть не связано

напрямую с конкретным заболеванием (онкологией или неврологическими патологиями).

ВЫВОДЫ

1. Комплексная характеристика ответов астроцитов при активации TLR-сигнального пути позволила впервые соотнести высвобождение про- и противовоспалительных цитокинов с высвобождением ПНЖК и образующихся из них оксипинонов, получить характеристики изменений внутриклеточных регуляторных участков (MAPK, PPAR, NF- κ B), выявить связи TLR-сигнального пути с генами метаболизма гиалуроновой кислоты.

2. Астроциты, полученные от мужских и женских особей, по-разному реагируют на действие LPS на уровне выработки цитокинов и простагландинов; трилостан (ингибитор ключевого фермента стероидных превращений 3β -гидроксистероиддегидрогеназы) проявляет противовоспалительные свойства в астроцитах, полученных от самок.

3. Охарактеризован посттранскрипционный механизм регуляции TLR4-стимулированного ответа астроцитов, включающих ARE-связывающие белки TTP и HuR и изменение скорости деградации мРНК провоспалительных генов. Показано, что гипогликемический препарат росиглитазон снижает скорость деградации мРНК.

4. Предложены клеточные модели адаптации астроцитов к действию цитокинов, гиалуроновой кислоты, глюкозы и низким концентрациям эндотоксина. Охарактеризовано изменение TLR-стимулированного клеточного ответа, выявлены эффекты прайминга и толерантности на уровне внутриклеточных сигнальных каскадов, высвобождения цитокинов и оксипинонов.

5. При активации TLR4 на астроцитах внеклеточная липидная фракция обладает нейротоксичностью; свойство липидной фракции с нейротоксическими на нетоксические может быть изменено с помощью ингибитора 12-липоксигеназы, меняющего профиль оксипинонов в сторону повышения концентрации метаболитов ω -3 докозагексаеновой кислоты.

6. Исследование 6 синтетических лигандов трех подтипов ядерных рецепторов PPAR показало, что все они обладают противовоспалительными свойствами, снижают уровень оксипинонов, образующихся через COX-путь; наиболее выраженным эффектом на синтез оксипинонов и увеличению соотношения IL-10/TNF α обладают лиганды рецептора PPAR β , которые могут рассматриваться как потенциальные регуляторы нейровоспаления в ЦНС.

7. Изменение профиля оксипинонов является характеристической подписью при различных патологиях: болезнь Паркинсона, болезнь Вильсона-Коновалова, рак молочной железы и первичная открытоугольная глаукома, выявляя не только наличие заболевания, но и степень его прогрессирования.

8. Транскриптомный профиль генов метаболизма оксипинов ткани патологии не соотносится с изменением профиля оксипинов крови (показано для рака молочной железы и болезни Паркинсона), однако анализ транскрипционных профилей образцов рака молочной железы с использованием подходов машинного обучения (метод случайного леса) выявил ключевые гены метаболизма оксипинов, позволяющие характеризовать молекулярные подтипы рака молочной железы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus, WoS и RSCI (в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах):

1. **Dmitry V Chistyakov**, Nadezhda V Azbukina, Alexander V Lopachev, Sergei V Goriainov, Alina A. Astakhova, Elena V Ptitsyna, Anna S. Klimenko, Vsevolod V Poleshuk, Rogneda B. Kazanskaya, Tatiana N. Fedorova, Marina G. Sergeeva. Plasma oxylipin profiles reflect Parkinson's disease stage. // *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* – 2023; P106788, doi:10.1016/j.prostaglandins.2023.106788, JIF (для WoS) = **2,5**, (0,63/0,38).
2. **Д.В. Чистяков**, Л.В. Коваленко, М.Ю. Донников, М.Г. Сергеева. Профили оксипинов в крови как маркеры патогенеза онкологических заболеваний. // *Биохимия* - 2023 том 88, № 5, стр. 761-772; doi: 10.31857/S0320972523050056, SJR (для Scopus) = **0,14**, (0,56/0,45).
3. **Chistyakov Dmitry V.**, Guryleva Mariia V., Stepanova Elena S., Makarenkova Lyubov M., Ptitsyna Elena V., Goriainov Sergei V., Nikolskaya Arina I., Astakhova Alina A., Klimenko Anna S., Bezborodova Olga A., Rasskazova Elena A., Potanina Olga G., Abramovich Rimma A., Nemtsova Elena R., Sergeeva Marina G. Multi-Omics Approach Points to the Importance of Oxylipins Metabolism in Early-Stage Breast Cancer. // *Cancers* - 2022, V. 14, № 8; P2041, doi: 10.3390/cancers14082041, JIF (для WoS) = **4,5**, (0,94/0,56).
4. **Chistyakov Dmitry V.**, Goriainov Sergei V., Astakhova Alina A., Sergeeva Marina G. High Glucose Shifts the Oxylipin Profiles in the Astrocytes towards Pro-Inflammatory States. // *Metabolites* - 2021, V. 11, № 5, p. 311; doi:10.3390/metabo11050311, JIF (для WoS) = **3,4**, (0,88/0,7).
5. Guryleva Mariia V., **Chistyakov Dmitry V.**, Lopachev Alexander V., Goriainov Sergei V., Astakhova Alina A., Timoshina Yulia A., Khutorova Anastasiya V., Fedorova Tatiana N., Sergeeva Marina G. Modulation of the Primary Astrocyte-Enriched Cultures' Oxylipin Profiles Reduces Neurotoxicity. // *Metabolites* - 2021, V. 11, № 8; P.498, doi:10.3390/metabo11080498, JIF (для WoS) = **3,4**, (0,81/0,49).
6. Azbukina Nadezhda V., **Chistyakov Dmitry V.**, Goriainov Sergei V., Kotelin Vladislav I., Fedoseeva Elena V., Petrov Sergey Yu, Sergeeva Marina G., Iomdina Elena N., Zernii Evgeni Yu. Targeted Lipidomic Analysis of Aqueous Humor Reveals Signaling Lipid-Mediated Pathways in Primary Open-Angle

- Glaucoma. // *Biology* - 2021, V. 10, № 7, P.658; doi:10.3390/biology10070658, JIF (для WoS) = **3,6**, (1,06/0,64).
7. **Chistyakov Dmitry V.**, Astakhova Alina A., Goriainov Sergei V., Sergeeva Marina G. Comparison of PPAR Ligands as Modulators of Resolution of Inflammation, via Their Influence on Cytokines and Oxylipins Release in Astrocytes. // *International Journal of Molecular Sciences* - 2020, V. 21, № 24, P. 9577; doi:10.3390/ijms21249577, JIF (для WoS) = **4,9**, (1/0,8).
 8. **Chistyakov Dmitry V.**, Nikolskaya Arina I., Goriainov Sergei V., Astakhova Alina A., Sergeeva Marina G. Inhibitor of Hyaluronic Acid Synthesis 4-Methylumbelliferone as an Anti-Inflammatory Modulator of LPS-Mediated Astrocyte Responses. // *International Journal of Molecular Sciences* - 2020, V. 21, № 21, P. 8203; doi:10.3390/ijms21218203, JIF (для WoS) = **4,9**, (1/0,6).
 9. **Chistyakov Dmitry V.**, Gavrish Gleb E., Goriainov Sergei V., Chistyakov Viktor V., Astakhova Alina A., Azbukina Nadezda V., Sergeeva Marina G. Oxylipin Profiles as Functional Characteristics of Acute Inflammatory Responses in Astrocytes Pre-Treated with IL-4, IL-10, or LPS. // *International Journal of Molecular Sciences* - 2020, V. 21, № 5, P. 1780; doi:10.3390/ijms21051780, JIF (для WoS) = **4,9**, (0,88/0,53).
 10. Azbukina Nadezhda V., Lopachev Alexander V., **Chistyakov Dmitry V.**, Goriainov Sergei V., Astakhova Alina A., Poleshuk Vsevolod V., Kazanskaya Rogneda B., Fedorova Tatiana N., Sergeeva Marina G. Oxylipin Profiles in Plasma of Patients with Wilson's Disease. // *Metabolites* - 2020, V. 10, № 6; P.222, doi:10.3390/metabo10060222, JIF (для WoS) = **3,4**, (0,94/0,56).
 11. **Chistyakov Dmitry V.**, Astakhova Alina A., Azbukina Nadezda V., Goriainov Sergei V., Chistyakov Viktor V., Sergeeva Marina G. Cellular Model of Endotoxin Tolerance in Astrocytes: Role of Interleukin 10 and Oxylipins. // *Cells* - 2019, V. 8, № 12, P. 1553; doi:10.3390/cells8121553, JIF (для WoS) = **5,1**, (0,63/0,5).
 12. **Chistyakov DV**, Astakhova AA, Azbukina NV, Goriainov SV, Chistyakov VV, Sergeeva MG. High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Influences Oxylipins Synthesis in Course of Neuroinflammation. // *International Journal of Molecular Sciences* - 2019, V. 20, № 16, P. 3894; doi:10.3390/ijms20163894, JIF (для WoS) = **4,9**, (0,88/0,7).
 13. Alina Astakhova, **Dmitry Chistyakov**, Dominique Thomas, Gerd Geisslinger, Bernhard Brüne, Marina Sergeeva, Dmitry Namgaladze. Inhibitors of Oxidative Phosphorylation Modulate Astrocyte Inflammatory Responses through AMPK-Dependent Ptg2 mRNA Stabilization. // *Cells* - 2019, V. 8, № 10, P. 1185; doi:10.3390/cells8101185, JIF (для WoS) = **5,1**, (0,69/0,4).
 14. **Chistyakov DV**, Azbukina NV, Astakhova AA, Polozhintsev AI, Sergeeva MG, Reiser G. Toll-like receptors control p38 and JNK MAPK signaling pathways in rat astrocytes differently, when cultured in normal or high glucose concentrations // *Neurochemistry International* - 2019, V. 131, P. 104513; doi:10.1016/j.neuint.2019.104513, JIF (для WoS) = **4,4**, (0,5/0,4).
 15. **Chistyakov Dmitry V.**, Grabeklis Sevil, Goriainov Sergei V., Chistyakov Viktor V., Sergeeva Marina G., Reiser Georg. Astrocytes synthesize primary

- and cyclopentenone prostaglandins that are negative regulators of their proliferation // *Biochemical and Biophysical Research Communications* - 2018, № 2, P. 204-210; doi:10.1016/j.bbrc.2018.04.040, JIF (для WoS) = **2,5**, (0,44/0,35).
16. Astakhova A.A., **Chistyakov D.V.**, Sergeeva M.G., Reiser G. Regulation of the ARE-binding proteins, TTP (tristetraprolin) and HuR (human antigen R), in inflammatory response in astrocytes // *Neurochemistry International* - 2018, том 118, P. 82-90; doi:10.1016/j.neuint.2018.04.014, JIF (для WoS) = **4,4**, (0,56/0,34).
 17. **Chistyakov Dmitry V.**, Astakhova Alina A., Sergeeva Marina G. Resolution of inflammation and mood disorders // *Experimental and Molecular Pathology* - 2018, V. 105, P. 190-201; doi:10.1016/j.yexmp.2018.08.002, JIF (для WoS) = **2,8**, (0,75/0,6).
 18. **Chistyakov Dmitry V.**, Azbukina Nadezda V., Lopachev Alexandr V., Kulichenkova Ksenia N., Astakhova Alina A., Sergeeva Marina G // Rosiglitazone as a Modulator of TLR4 and TLR3 Signaling Pathways in Rat Primary Neurons and Astrocytes. *International Journal of Molecular Sciences* - 2018, V. 19, № 1, P.113; doi:10.3390/ijms19010113, JIF (для WoS) = **4,9**, (0,69/0,55).
 19. **Chistyakov D.V.**, Azbukina N.V., Astakhova A.A., Goriainov S.V., Chistyakov V.V., Sergeeva M.G. Sex-Mediated Differences in LPS Induced Alterations of TNF α , IL-10 Expression, and Prostaglandin Synthesis in Primary Astrocytes // *International Journal of Molecular Sciences* - 2018, V. 19, № 9, P.2793; doi:10.3390/ijms19092793, JIF (для WoS) = **4,9**, (0,88/0,7).
 20. Е.В. Панкевич, А.А. Астахова, **Д.В. Чистяков**, М.Г. Сергеева. Противовоспалительный эффект росиглитазона реализуется через модуляцию стабильности мРНК интерлейкина 10 и циклооксигеназы 2 в астроцитах // *Биохимия* - 2017. №11, Т.82. стр. 1624-1634; doi:10.1134/S0006297917110050, SJR (для Scopus) = **0,14**, (0,56/0,34).
 21. Буянова С. М., **Чистяков Д.В.**, Астахова А.А., Сергеева М.Г. Влияние дегидроэпиандростерона на воспалительный ответ астроглиальных клеток // *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии* - 2017. - №5, Т.34. стр. 22-29; doi: 10.7868/S0233475517050036, SJR (для Scopus) = **0,14**, (0,44/0,26).
 22. Guryleva, M. V., Penzar, D.D., **Chistyakov, D.V.**, Mironov, A.A., Favorov, A. V., Sergeeva, M.G. (2022) Investigation of the Role of PUFA Metabolism in Breast Cancer Using a Rank-Based Random Forest Algorithm // *Cancers* - 2017 V.14, №19, P.4663, doi: 10.3390/cancers14194663, JIF (для WoS) = **4,5**, (0,94/0,26).