

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
НИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ  
имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

*На правах рукописи*

**Чистяков Дмитрий Викторович**

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

Специальность 1.5.8. - *Математическая биология, биоинформатика*  
1.1.10 - *Биомеханика и биоинженерия*

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант:  
д.х.н. Сергеева Марина Глебовна

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ .....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	18
1.1 Оксипирины - производные полиненасыщенных жирных кислот .....	18
1.2 Омиксные и мультиомиксные подходы в изучении заболеваний человека .....	25
1.3 Исследования профилей оксипиринов .....	28
1.3.1 Профили оксипиринов крови и онкологические заболевания .....	31
1.3.2 Профили оксипиринов и неврологические заболевания .....	39
1.4 Современный взгляд на врожденный иммунитет и воспаление .....	41
1.4.1 Основные принципы врожденного иммунитета и воспалительных процессов .....	41
1.4.2. Позитивная и негативная регуляция воспаления на молекулярном уровне .....	42
1.4.3 Современное представление о воспалительном ответе .....	45
1.5 Клеточные модели изучения механизмов воспалительного ответа .....	49
1.5.1 Астроциты как объект изучения воспалительных ответов и адаптаций .....	50
1.5.2 Пол и астроциты .....	51
1.5.3 Дегградация мРНК в астроцитах (HUR, TTP) .....	53
1.5.4 Гипергликемия и астроциты .....	55
1.5.5 Гиалуриновая кислота и 4-MU .....	56
1.5.6 Адаптация к низким концентрациям эндотоксинов.....	58
1.5.7 Ядерные рецепторы PPAR и их синтетические лиганды .....	60
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	63
2.1 Реагенты .....	63
2.2 Методы исследования .....	65
2.2.1 Первичная культура клеток астроцитов.....	65
2.2.2 Генотипирование крыс .....	66
2.2.3 Первичные культуры клеток коры нейронов крысы .....	66
2.2.4 Вестерн-блот анализ.....	67
2.2.5 Иммунофлуоресцентный анализ .....	68
2.2.6 ПЦР с детекцией в реальном времени.....	68
2.2.7 Экстракция оксипиринов из клеточного супернатанта .....	70
2.2.8 ВЭЖХ-МС/МС анализ профиля оксипиринов .....	70
2.2.9 Оценка пролиферации и жизнеспособности клеток и синхронизация клеток ...	72
2.2.10 Культура клеток макрофагов .....	72
2.2.11 Определение скорости дегградации мРНК. ....	72
2.2.12 МТТ-анализ .....	73
2.2.13 Иммуноферментный анализ (ИФА).....	73
2.2.14 Анализ экспрессии генов и анализ SNP .....	73
2.2.15 Метод случайного леса для анализа транскрипционных профилей .....	74

2.2.16	Статистический анализ клеточных экспериментов .....	77
2.3	Эксперименты с участием людей.....	78
2.3.1	Рак молочной железы.....	78
2.3.2	Болезнь Вильсона-Коновалова .....	78
2.3.3	Болезнь Паркинсона .....	79
2.3.4	Сбор образцов слезной и внутриглазной жидкости при глаукоме .....	80
2.3.5	Статистический анализ метаболомных профилей человека.....	80
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	82
3.1	Изучение молекулярных механизмов клеточного ответа на активацию Толл-подобных рецепторов (TLR) и изменение профиля оксипинов .....	82
3.1.1	Комплексная характеристика воспалительного ответа на астроцитах .....	82
3.1.1.1	Изменение профиля оксипинов при стимуляции астроцитов LPS .....	86
3.1.1.2	Участие оксипинов в регуляции функций астроцитов .....	87
3.1.2	Влияние пола на TLR4-стимулированный клеточный ответ .....	95
3.1.2.1	Астроциты, выделенные из эмбрионов крыс самцов и самок, имеют сходную морфологию, но демонстрируют различия в реакции на LPS .....	95
3.1.2.2	Модуляция синтеза простагландинов астроцитов с помощью трилостана, конкурентного ингибитора 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы. ....	99
3.1.3	Регуляция способности астроцитов отвечать на провоспалительные стимулы через модуляцию скорости деградации мРНК .....	102
3.1.3.1	мРНК TTP, но не мРНК HuR, повышается при провоспалительной стимуляции .....	103
3.1.3.2	Фосфорилирование p38 регулирует экспрессию мРНК TTP и HuR .....	104
3.1.3.3	Экспрессия мРНК TTP и HuR посттранскрипционно регулируется в ответ на действие LPS .....	106
3.1.3.4	Регуляция HuR на уровне белка.....	107
3.1.3.5	Регуляция TTP на уровне белка .....	109
3.1.3.6	Розиглитазон препятствует дестабилизации мРНК IL-10 и COX-2 при TLR4-стимулированном клеточном ответе .....	110
3.2	Анализ изменения ответов при активации системы Толл-подобных рецепторов при адаптации астроцитов к различным факторам внешней среды.....	112
3.2.1	Изучение клеточного ответа при активации системы Толл-подобных рецепторов при различных условиях адаптации к глюкозе.....	113
3.2.1.1	Сравнение клеток, в течении 48 часов адаптированных к действию нормальной (5 мМ) и повышенной (22,5 мМ) концентрации глюкозы.....	113
3.2.1.2	Способность астроцитов, адаптированных к разным концентрациям глюкозы, синтезировать оксипины .....	121
3.2.1.3	Влияние концентрации сыворотки во внеклеточной среде на профиль оксипинов .....	124
3.2.2	Взаимосвязь системы метаболизма гиалуроновой кислоты и сигнального пути TLR4 на астроцитах .....	129
3.2.2.1	Изменение экспрессии TNF $\alpha$ под действием HMW и LMW ГК .....	130
3.2.2.2	Изменение экспрессии IL-10 при воздействии HMW и LMW ГК .....	133

3.2.2.3 Модуляция синтеза оксипинов с помощью HMW и LMW ГК.....	134
3.2.2.5 LPS-индуцированное высвобождение цитокинов и оксипинов модулируется ингибитором синтеза гиалуроновой кислоты, 4-метилумбеллифероном (4-MU) .....	138
3.2.2.6. LPS индуцирует экспрессию ферментов ГК-синтаз и высвобождение ГК, что ингибируется при действии 4-MU .....	141
3.2.2.7 4-MU модулирует TLR-опосредованную активность JNK, но не p38, ERK MAPK и NF- $\kappa$ B.....	143
3.2.3 Сравнение адаптации клеток к длительному воздействию IL-4, IL-10 и LPS..	147
3.2.3.1 Сравнение адаптации клеток к длительному воздействию противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10 и LPS .....	147
3.2.3.2 Профили оксипинов в астроцитах с различными состояниями адаптации .....	151
3.2.3.3 Эндотоксиновая толерантность на астроцитах .....	155
3.2.4 Изменение профиля оксипинов выбрасываемых астроцитами снижает нейротоксичность.....	162
3.2.4.1 Ингибитор 12-LOX подавляет нейротоксичность липидной фракции LPS-стимулированных астроцитов .....	163
3.2.4.2 Различия в нейротоксичности липидных фракций отражаются в их профилях оксипинов .....	165
3.2.5 Противовоспалительные свойства лигандов ядерных рецепторов PPAR .....	171
3.2.5.1 Агонист PPAR $\gamma$ розиглитазон как модулятор сигнальных путей TLR4 и TLR3 в первичных нейронах и астроцитах крыс.....	172
3.2.5.2 Сравнение лигандов PPAR $\alpha$ : агонист фенофибрат (Fen), антагонист GW6471 (GW6) .....	176
3.2.5.3 Сравнение лигандов PPAR $\beta$ : агонист GW501516 (GW5), антагонист GSK0660 (GSK) .....	178
3.2.5.4 Сравнение лигандов PPAR $\gamma$ : агонист розиглитазон (RG) и антагонист GW9662 (GW9).....	180
3.2.5.5 Лиганды PPAR как модуляторы экспрессии COX-2.....	181
3.2.5.6 Лиганды PPAR как модуляторы p38, JNK, ERK1/2 митоген-активируемых протеин киназ (MAPK) .....	182
3.2.5.7. Влияние лигандов PPAR на цитокины-маркеры воспаления .....	184
3.3 Профили оксипинов как характеристическая подпись при заболеваниях человека .....	188
3.3.1 Профили оксипинов в плазме пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова .....	188
3.3.2 Профили оксипинов во внутриглазной жидкости пациентов с первичной открытоугольной глаукомой .....	199
3.3.3 Профили оксипинов в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона ....	214
3.3.4. Профили оксипинов в плазме крови при раке молочной железы.....	226
3.3.5. Исследование роли метаболизма ПНЖК при раке молочной железы с использованием рангового алгоритма случайного леса .....	238
3.3.5.1. Ранговый классификатор RF образцов опухолевой и нормальной ткани.....	239

<b>3.3.5.2. Ранговая модель классификации рака молочной железы для идентификации наиболее важных генов ПНЖК.....</b>	<b>243</b>
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	249
ВЫВОДЫ .....	250
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	251
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	291
ПРИЛОЖЕНИЕ Б .....	292
ПРИЛОЖЕНИЕ В .....	294
ПРИЛОЖЕНИЕ Г .....	296
ПРИЛОЖЕНИЕ Д .....	301

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

### Обозначения оксипинов

ПНЖК - полиненасыщенные жирные кислоты  
AA - арахидоновая кислота  
DHA - докозагексаеновая кислота  
EPA - эйкозапентаеновая кислота  
LA - линолевая кислота  
DGLA - дигомо- $\gamma$ -линоленовая кислота  
ALA -  $\alpha$ -линоленовая кислота  
HETE - гидроксикоэкозатетраеновые кислоты  
HODE - гидроксикодекадиеновые кислоты  
HDoHE - гидроксидокозагексаеновые кислоты  
DiHETrE - дигидроксикоэкозатриеновые кислоты  
DiHETE - дигидроксикоэкозатетраеновые кислоты  
HEPE - гидроксикоэкозапентаеновые кислоты  
EpOME - эпоксиоктадекамоноеновые кислоты  
LX - липоксины  
PG - простагландины  
TX - тромбоксаны  
IsoPs - изопростаны  
NPs - нейропростаны  
AEA - анандамид

### Другие сокращения

CO - стандартное отклонение  
PAMP - молекулярные паттерны ассоциированные с патогенами  
DAMP - молекулярные паттерны ассоциированные с повреждением  
IL-1 $\beta$  - интерлейкин-1 бета  
TNF $\alpha$  - фактор некроза опухоли альфа  
iNOS - индуцибельная синтаза оксида азота  
C3 - компонент 3 системы комплемента  
IL-1R - рецептор интерлейкина-1  
TNFR - рецептор фактора некроза опухоли  
TLR - толл-подобные рецепторы  
NLR - нуклеотид-связывающие олигомеризационные домен-подобные рецепторы  
RLRs - RIG-I-подобные рецепторы

MyD88 - белок 88 первичного ответа миелоидной дифференцировки  
TRAM - триф-связанная адапторная молекула  
TRIF - TIR-домен-содержащий адаптер-индуктор интерферона- $\beta$   
MAPK - митоген-активируемая протеинкиназа  
IKK - I $\kappa$ B киназа  
RIP-1 - рецепторный взаимодействующий белок 1  
TBK1 - TANK-связывающая киназа 1  
AP-1 - activator protein 1  
NF- $\kappa$ B - транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B  
IRF - интерферон-регулирующие факторы  
PPAR - рецепторы активации пролиферации пероксисом  
IL- интерлейкины  
CYP - монооксигеназа цитохрома P450  
LOX - липоксигеназа  
PLA2 - фосфолипаза A2  
АФК - активные формы кислорода  
COX - циклооксигеназа  
NAPE-PLD - NAPE-специфическая фосфолипаза D  
ABDH4 -  $\alpha/\beta$ -гидролазный домен 4  
RTPN22 - протеин тирозинфосфатаза не-рецепторного типа 22  
INPP5D - инозитол полифосфат-5-фосфатаза D  
ФААН - гидролаза амида жирной кислоты  
EH - эпоксидгидролаза  
AKR - альдо-кето-редуктаза  
CBR - карбонилредуктаза

## ВВЕДЕНИЕ

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

Формирование представлений, 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 связанные с хроническим воспалением заболевания, 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), расширило представления о воспалении, позволило изучать патологические процессы на клеточном и молекулярном уровнях. TLR обнаружены практически на всех клетках организма человека, их активация приводит к синтезу цитокинов, оксилипинов и других молекулярных характеристик ответов на провоспалительные стимулы. Развитие омиксных подходов анализа позволило изучать эти молекулярные характеристики в единой системе, соотносить данные белковых маркеров воспаления и оксилипинов.

Оксилипины – это обширное семейство биологически активных веществ, которые образуются при оксигенировании полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Общеизвестна группа оксилипинов – эйкозаноиды (простагландины, лейкотриены и др.), происходящая из арахидоновой кислоты (AA, C20:4 $\omega$ -6). В последние годы появились многочисленные работы о метаболизме и биологической активности оксилипинов, происходящих из докозагексаеновой (DHA, C22:6 $\omega$ -3), эйкозапентаеновой (EPA, C20:5 $\omega$ -3), линолевой (LA, C18:2 $\omega$ -6) и других ПНЖК. Выделяют несколько полиферментных каскадов образования оксилипинов, которые называют по ключевым ферментам: циклооксигеназный (COX-), липоксигеназный (LOX-), эпоксигеназный (CYP-) пути метаболизма оксилипинов. 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 оксипинонов многочисленны: апоптоз, восстановление тканей, свертывание крови, пролиферация клеток, проницаемость кровеносных сосудов, боль, воспаление, иммунные действия, регуляция артериального давления и др. Значительный интерес к ПНЖК и оксипинонам вызван тем, что они входят в систему врожденного иммунитета и при активации этой системы высвобождаются наряду с различными цитокинами. Более того, подобно цитокинам, оксипиноны бывают как провоспалительными (например, простагландин E<sub>2</sub>, стимулирующий развитие воспаления), так и противовоспалительными веществами и медиаторами разрешения воспаления (например, ДНА-производные 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 оксипинонов, т.е. получать омиксные данные - профили оксипинонов. Это расширило представление о биологической роли этих соединений при заболеваниях, стимулировало поиск среди оксипинонов 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 оксипинонов.

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. Этим объясняется интерес к исследованию сигнальной системы TLR на клеточном уровне и созданию различных

моделей клеточных адаптаций, имитирующих возможные состояния организма при неинфекционных хронических заболеваниях. В этой связи 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 разнообразные гомеостатические функции в центральной нервной системе, но также активно участвуют в нейровоспалительных процессах. Астроциты вносят значительный вклад в развитие неврологических заболеваний, включая нейродегенеративные и демиелинизирующие патологии, эпилепсию, травматические повреждения, ишемические нарушения и заболевания с инфекционной компонентой. 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 состава внеклеточного матрикса может значительным образом менять клеточный ответ астроцитов.

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 оксипиринов 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 в себя 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, 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, первичная открытоугольная глаукома. Проведено сопоставление получаемых профилей и стадии 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 позволят прогнозировать потребности трехмерных клеточных культур в глюкозе и других веществах в конкретных условиях регенеративной медицины, что открывает новые возможности по созданию жизнеспособных и эффективных тканевых конструкций в биоинженерии.

### **Методология диссертационного исследования**

Работа выполнена с использованием современного оборудования и методов исследования - клеточных, молекулярно-биологических, биохимических и инструментальных, включая в себя культивирование первичных глиальных клеток крыс, ОТ-ПЦР в реальном времени, Вестерн-блот анализ и высокоэффективную жидкостную хроматографию, совмещенную с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

### **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 GTP; 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 оксипинол в крови можно модулировать с помощью низкомолекулярных ингибиторов, снижая концентрацию провоспалительных метаболитов и повышая количество соединений, ускоряющих завершение воспалительного ответа.
6. Профиль оксипинол 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 оксипинол в ткани патологии не соотносится с изменением профиля оксипинол в крови. Анализ транскрипционных профилей ткани патологии выявил ключевые гены метаболизма оксипинол, позволяющие характеризовать молекулярные подтипы заболевания (на примере рака молочной железы).

### **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, интерпретации полученных данных. Работы по характеристике профиля оксипинол 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, в обработке экспериментальных данных, в написании публикаций и в представлении полученных данных на российских и международных конференциях. В работу вошли результаты

кандидатской диссертации к. фарм. н. Горяинова С.В. и дипломной работы Гурyleвой М.В., выполненной под руководством автора.

### Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 22 статьи в международных рецензируемых научных журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science (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 оксилипинов 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. Modula-

- tion of the Primary Astrocyte-Enriched Cultures' Oxylin 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 Oxylin 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 Nadezhda V., Sergeeva Marina G. Oxylin 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. Oxylin 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 Nadezhda 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 Geislinger, Bernhard Brüne, Marina Sergeeva, Dmitry Namgaladze. Inhibitors of Oxidative Phosphorylation Modulate Astrocyte Inflammatory Responses through AMPK-Dependent PtgS2 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 $\alpha$ , 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).

### **Степень достоверности и апробация материалов диссертации**

Достоверность полученных в работе результатов подтверждается большим объемом экспериментального и клинического материала, который был получен с использованием современных методов инструментального анализа, соответствующих поставленным задачам. Положения и выводы, сформулированные в представленной работе, подтверждены соответствующей статистической обработкой и анализом современной научной литературы в данной области.

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» (Пущино, 2017, 2019).

Работа была поддержана:

грант РФФИ (18-34-20100 мол\_a\_вед) “Роль сигнальных липидов в регуляции взаимодействий микроглии, астроцитов и нейронов при активации толл-подобных рецепторов” (2018-2019, руководитель Д.В. Чистяков);

грант РНФ (20-74-00068) “Изменение молекулярных механизмов системы врожденного иммунитета астроцитов в условиях метаболической адаптации” (2020-2022, руководитель Д.В. Чистяков);

грант Президента (МК-2123.2019.4) “Реполяризация глиальных клеток в сторону противовоспалительного фенотипа условиях *in vitro* модели нейровоспаления” (2019-2020, руководитель Д.В. Чистяков);

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.

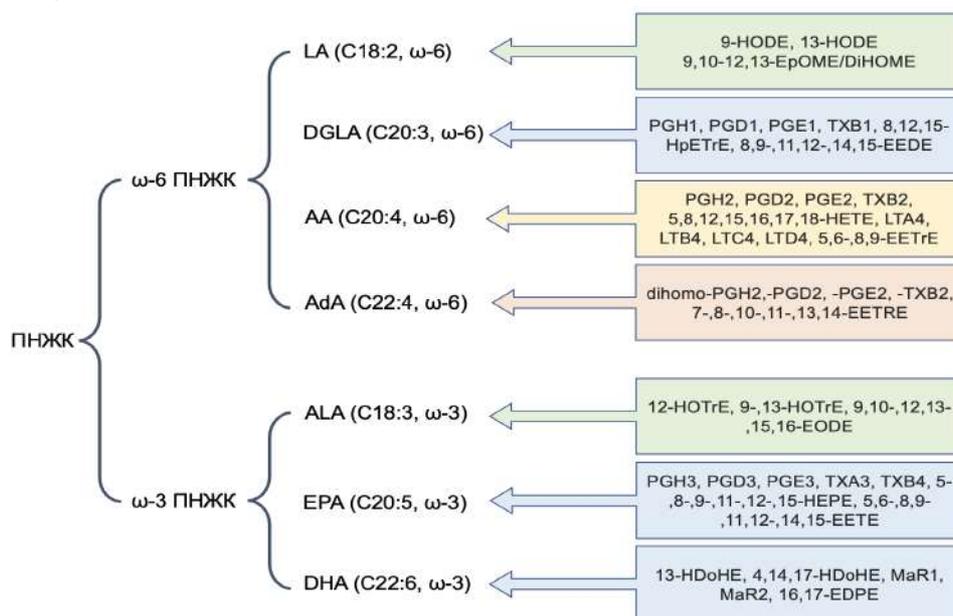
## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Оксипирины - производные полиненасыщенных жирных кислот**

Оксипирины представляют собой суперсемейство биоактивных липидных медиаторов, получаемых в результате метаболизма

полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) через сложную цепь биохимических реакций [1,2]. Оксипирины играют фундаментальную роль в разнообразных гомеостатических и воспалительных процессах, поэтому их синтез находится под пристальным вниманием. Выделяют пять основных путей синтеза оксипиринов, три из которых обозначают в соответствии с ключевыми ферментами соответствующих путей: циклооксигеназный (COX), липоксигеназный (LOX) и цитохром P450 монооксигеназные (CYP450) пути [2–4]. Также выделяют анандамидный (AEA) путь образования оксипиринов и неферментативные превращения ПНЖК [5].

Оксипирины могут образовываться из различных ПНЖК, которые разделяют по положению двойной связи на  $\omega$ -6 и  $\omega$ -3 (детали номенклатур ПНЖК и оксипиринов смотри в монографии [5]). Наиболее распространенными у человека являются  $\omega$ -6 кислоты: арахидоновая (AA, 20:4), линолевая (LA, 18:2), дигомо- $\gamma$ -линоленовая (DGLA, 20:3) и аденовая (AdA, 22:4) кислоты, а также  $\omega$ -3 кислоты:  $\alpha$ -линоленовая (ALA) (18:3), эйкозапентаеновая (EPA, 20:5) и докозагексаеновая (DHA, 22:6) кислоты [3]. На рис. 1.1 приведены ПНЖК и основные метаболиты соответствующих кислот.



**Рис. 1.1.** Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), участвующие в метаболизме оксипиринов млекопитающих.

### Циклооксигеназный путь метаболизма ПНЖК (COX-путь)

Ферменты семейства циклооксигеназ способны взаимодействовать с различными ПНЖК, в рамках полиферментных каскадов участвуя в

образовании широкого спектра соединений [3]. На Рис. 1.2 приведены примеры ряда СОХ-производных ПНЖК, ферментов их биосинтеза и специфических рецепторов. Выделяют 9 основных рецепторов, способных связываться с производными жирных кислот, образующихся по СОХ-пути, обозначаемых по основным лигандам — рецептор  $PGD_2$  (DP1, DP2), рецептор  $PGE_2$  (EP1-EP4), рецептор PGF (FP), рецептор тромбоксанов (TP) и рецептор простагланцинов (IP) соответственно [5,6].

Наиболее известными представителями оксипиринов считаются эйкозаноиды — производные арахидоновой кислоты, в частности, простагландины, для которых показаны как про-, так и противовоспалительные эффекты [6]. Основные простагландины (PG),  $PGD_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$  и  $PGE_2$ , синтезируются из арахидоновой кислоты под последовательным действием циклооксигеназы и специфических синтаз PG. Эти простагландины легко подвергаются дегидратации *in vivo* и *in vitro*, образуя суPG серий J2 и A2 [7–9]. Первичные простагландины действуют через рецепторы, связанные с белками G, тогда как суPG активно транспортируются в клетки и взаимодействуют с многочисленными клеточными мишенями, включая сигнальные молекулы и специфические факторы транскрипции ядерных рецепторов [5,7,8]. В то время как первичные простагландины, особенно  $PGE_2$ , в основном представляют собой провоспалительные вещества, вызывающие воспалительные реакции, суPG оказывают противовоспалительное действие и играют важную роль в разрешении воспаления [7–9].

Примечательно, что свойства простагланцинов меняются в зависимости от кислоты-предшественника. Например, производные EPA (эйкозапентаеновой кислоты), простагландины серии 3 также способны связываться с EP-рецепторами, при этом обладая анти-воспалительными свойствами, в отличие от простагланцинов серии 2, производных AA (арахидоновой кислоты) [10].

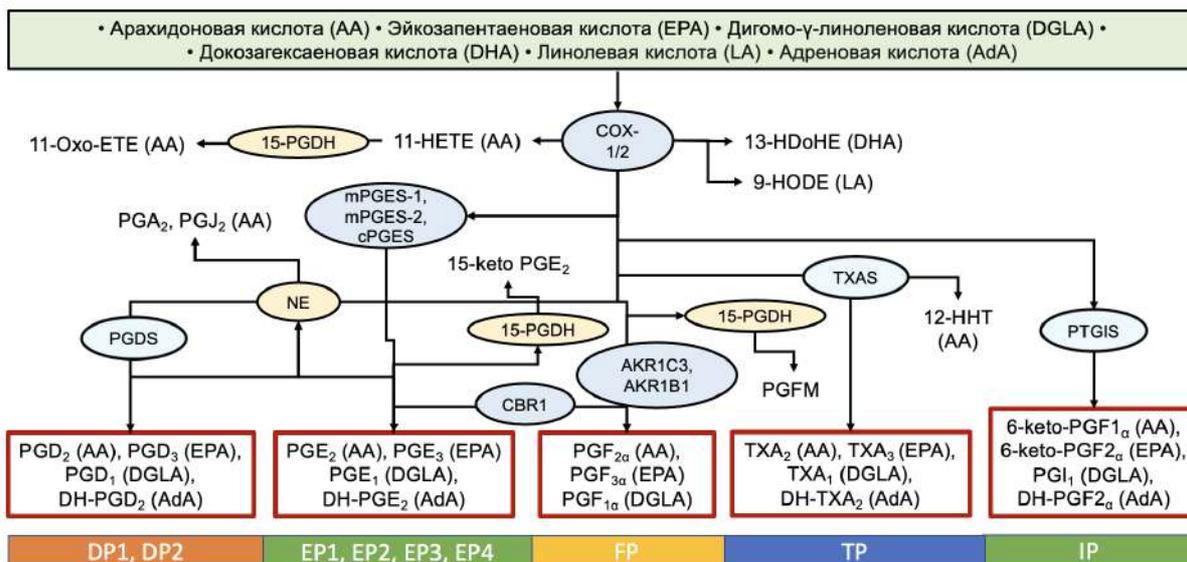


Рис. 1.2. Общая схема биосинтеза оксипрогланов по COX-пути.

### Липоксигеназный путь метаболизма ПНЖК (LOX-путь)

Ферменты семейства липоксигеназ (LOX) конвертируют различные ПНЖК в широкий спектр соединений, включая такие группы соединений как лейкотриены, резольвины (Rv), липоксины (LX), маресины (MaR), гепоксилины (HX), а также гидроксикозагексаеновые (HDoHE), гидроксикозатетраеновые (HOTrE), гидроксикокозагексаеновые (HDoHE), гидроксикокозатриеновые (HOTrE), гидроксикокозатетраеновые (HOTrE) и гидроксикокозапентаеновые (HOPe) кислоты [3]. На Рис. 1.3 приведены примеры ряда LOX-производных ПНЖК, ферментов их биосинтеза и специфических рецепторов. У человека выделяют 6 липоксигеназ: 15-LOX-1 (иногда обозначаемая в литературе 12/15-LOX), 15-LOX-2, 12-LOX (иногда обозначаемая в литературе p12-LOX), 12R-LOX, eLOX3 и 5-LOX, кодируемых генами ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3 и ALOX5 соответственно [11]. Как и в случае метаболитов, образующихся по COX-пути, оксипрогланов, образующиеся под действием LOX, опосредуют свое действие связываясь с рецепторами, сопряженными с G-белком; в то же время на данный момент только для ряда оксипрогланов установлены точные мишени связывания (Рис. 1.3).

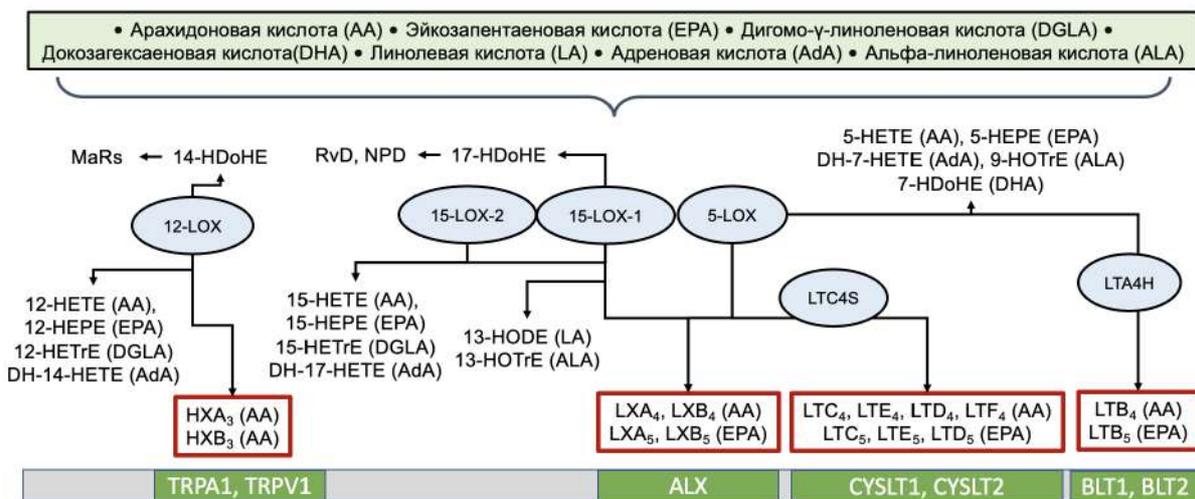


Рис. 1.3. Общая схема биосинтеза оксилипинов по LOX-пути.

Метаболиты, синтезируемые липоксигеназами, могут образовываться с участием различных ферментов, например, 14-HDoHE, метаболит DHA, может быть произведен ферментом 15-LOX в нейтрофилах [12] или 12-LOX в тромбоцитах [13]. По своим свойствам липоксигеназные производные ПНЖК могут оказывать разнонаправленное действие, например, 4-HDoHE, 11-HdoHE и 17-HDoHE считаются важными "веществами разрешения" воспаления [14,15], в то время как 5-НЕТЕ и 8-HDoHE обладают провоспалительными свойствами [16,17].

### *Моноксигеназная ветвь метаболизма ПНЖК (CYP-путь)*

Окисление арахидоновой кислоты ферментной системой цитохромов P450 описано относительно давно (см., например [5]). Относительно недавно стали анализировать и производные других ПНЖК, хотя ясного понимания того, какие именно ферменты участвуют в метаболизме и насколько они специфичны, пока нет [2,3,6]. Ферменты семейства CYP активно участвуют в биосинтезе оксилипинов, взаимодействуя со всеми основными ПНЖК и производя различные метаболиты (AA-epETrE/HETE, LA-epOME, ALA-epODE, DGLA-epEDE, AdA-DH-epETrE, EPA-epETE/HEPE, DHA-epDPE/HdoHE) [3]. На Рис. 1.4 приведены примеры ряда CYP-производных ПНЖК и ферментов их биосинтеза. Для большинства метаболитов в дальнейшем под действием эпоксид гидролаз (sEH) происходит конвертация оксилипинов в более стабильные соединения (AA-DiHETrE, LA-DiHOME, ALA-DiHODE, DGLA-DiHEDE, AdA-DH-DiHETrE, EPA-DiHETE и DHA-DiHDPE соответственно) [3]. Для ПНЖК на примере AA показано участие как минимум 8 ферментов

семейства CYP в биосинтезе DiHETrE-производных [18]. Отдельно выделяют 2 основные группы ферментов биосинтеза оксипинов: CYP2J и CYP2C, обладающих эпоксигеназной активностью, и CYP4 с  $\omega$ -гидролазной активностью, и по видимому вносящих основной вклад в производство CYP-опосредованных производных ПНЖК [18]. На физиологическом уровне производные AA оказывают сосудорасширяющие эффекты [19], уменьшают апоптоз клеток в миоцитах сердца крысы после гипоксии и реоксигенации [20], при этом, например, производные LA HODE, агонисты PPAR $\gamma$  [21], или дигидроксиоктадекамоноеновые (DiHOME) кислоты, которые являются цитотоксичными, проявляют как про-, так и противовоспалительные свойства [3]. В настоящее время существует несколько предположений, объясняющих действия -ETrE производных на клеточном уровне. С одной стороны, эти метаболиты ПНЖК способны связываться с ядерными рецепторами PPAR, в первую очередь PPAR $\gamma$ , и регулировать его активность [21]. С другой стороны, в литературе предполагается наличие специфического рецептора, сопряженного с G-белком, распознающего -ETrE производные [21], однако на текущий момент функциональный скрининг потенциальных мишеней 14,15/11,12-HETrE не выявил соответствующих рецепторов с высокой аффинностью [22].



Рис. 1.4. Общая схема биосинтеза оксипинов по CYP-пути.

### **Биосинтез анандамида**

Биосинтез АЕА происходит из мембранных фосфолипидов по различным ферментативным путям. Наиболее изученным из них является путь с вовлечением N-ацилтрансфераз и N-ацил-фосфатидилэтаноламина

(NARE)-специфической фосфолипазы D [23,24]. Гидролаза амидов жирных кислот (ФААН) является одним из основных ферментов, ответственных за расщепление АЕА до АА. При этом АЕА способен взаимодействовать с такими ферментами, как 5-/12-/15-LOX, трансформируясь до гидроксэйкозатетраеноил-этаноламидов, СОХ-2, трансформируясь до простагландин-этаноламидов и по СYP-пути, превращаясь в эпоксиэйкозатриеноил-этаноламиды [23]. Анандамид способен связываться как со специфическими рецепторами, сопряженными с G-белком (каннабиноидные рецепторы 1 и 2), так и с другими мишенями, такими как транскрипционные факторы PPAR [25], оказывая разнообразные эффекты как на уровне клеток, так и на уровне организма.

### ***Неферментативный путь синтеза оксипинов***

Оксипины способны образовываться из различных ПНЖК неферментативно в результате свободнорадикального перекисного окисления [26]. Одним из наиболее изученных классов оксипинов, образующихся в условиях стресса являются изопростаны, производные арахидоновой, эйкозапентаеновой, докозагексаеновой и адреновой кислот, обозначаемые F2-IsoPs, F3-изопростанов (F3-IsoPs), F4-нейропростанов (F4-NeuroPs), F2-дихомо-изопростанов (F2-дихомо-IsoPs) соответственно. Ряд производных LA, таких как 9-HODE и 13-HODE, также могут синтезироваться неферментативно [27]. Продукты неферментативного окисления ПНЖК часто рассматриваются как маркеры окислительного стресса при нейродегенеративных, сердечнососудистых и других заболеваниях [26,28].

Подводя итоги, можно сделать следующие заключения: 1) ПНЖК и образующиеся из них оксипины являются важным классом сигнальных молекул, вовлеченных в большое количество заболеваний, связанных с нарушениями системы врожденного иммунитета и развитием хронических воспалительных процессов; 2) при активации клеток образуются одновременно множество разнообразных оксипинов, часто противоположных по действию; 3) оксипины действуют через специфические рецепторы, т.е. одновременно происходит активация разных сигнальных путей. Эти свойства оксипинов предъявляют особые требования для подходов к их изучению, в первую очередь, получение и анализ данных с использованием мультиомиксных методов.

## 1.2 Омиксные и мультиомиксные подходы в изучении заболеваний человека

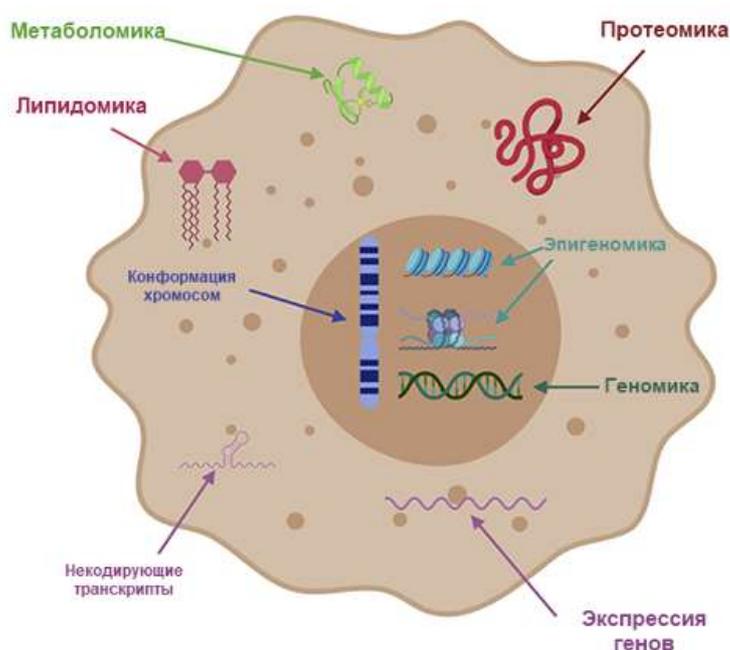
К настоящему моменту добавление окончания "омика" к какому-либо термину из биологии подразумевает максимально возможную всестороннюю оценку набора свойств/молекул определенного химического или функционального класса [29].

Развитие "омик" в значительной степени обусловлено технологическими достижениями, которые обеспечили возможность высокопроизводительного анализа биологических молекул, благодаря появлению методов секвенирования для анализа нуклеиновых кислот [30] и развитию методов масс-спектрометрии для анализа белков и малых молекул [31].

Данный термин в настоящее время используется максимально широко, и "омиксные" подходы применяют к самым разным областям науки, например, эйкозаномика — направленный липидомный анализ эйкозаноидов в биологических системах [32], гликомика — совокупный анализ гликанов [33], и т.д. Тем не менее, основными направлениями исследований, где данный термин стал применяться впервые, стали: 1) геномика, активно используемая при изучении заболеваний человека, в первую очередь направленная на выявление генетических вариантов, связанных с заболеванием, ответом на лечение или будущим прогнозом пациента (такие инструментальные методы как NGS для секвенирования всего генома [34], экзомное секвенирование [35], и т.д.); 2) эпигеномика, которая исследует обратимые модификации ДНК или ДНК-ассоциированных белков, таких как метилирование ДНК или ацетилирование гистонов (при помощи NGS [36]); 3) микробиомика, изучающая совокупность микроорганизмов в организме или биологической системе (с использованием NGS [37]); 4) транскриптомика, изучающая изменения уровня РНК как качественно (какие транскрипты присутствуют, выявление новых сайтов сплайсинга, сайтов редактирования РНК), так и количественно (сколько экспрессируется каждого транскрипта) (с использованием технологии микрочипов и RNA-Seq [38]); 5) протеомика, используемая для качественной и количественной характеристики белков и их модификаций в биологических жидкостях (с использованием современных методов масс-спектрометрии [39]); 6) метаболомика — анализ совокупности малых молекул в биологической жидкости/объекте, включая аминокислоты, сахара, жирные кислоты и т.д. (используя ВЭЖХ-МС, ГХ-

МС и ЯМР-профилирование [31]). Измерение профилей оксипинов можно рассматривать как часть метаболомики [40].

За последнее десятилетие применение омиксных технологий (геномных, протеомных, метаболомных) значительно расширилось, что привело к разработке подходов, включающих интеграцию различных данных для выявления закономерностей (мультиомиксные подходы) см. например [41,42]. Мультиомиксные технологии позволяют двигаться от простых моделей к реализации более сложных, учитывающих целостную картину патологии, микроокружение пораженного органа и т.д., ведь ответ организма на стимул/патологию как на клеточном, так и на уровне организма включает в себя совокупность изменений генома, транскрипции, экспрессии и модификации белков, изменений в метаболомном окружении и т.д. (Рис. 1.5.)



**Рис. 1.5.** Уровни взаимодействий, обнаруживаемые в клетках. Адаптировано из [43].

Исследования с помощью высокопроизводительных методов создают необходимость разработки новых методов анализа данных и интерпретации результатов, полученных разными омиками. Особенно это актуально, если вопросы исследований касаются выяснения этиологии системных заболеваний человека, поиска диагностических маркеров и создания лекарственных средств.

Действительно, методы РНК следующего поколения и секвенирование ДНК обеспечивают исследователям доступ к исключительно точной информации о полных геномах,

последовательностях генов, уровне их экспрессии, а также некодирующей части генома [41]. Если геном указывает на генетическую предрасположенность организма, то транскриптом отражает текущий статус клетки (ткани, организма) по уровню экспрессии генов. Вот почему в течение более десяти лет реализуются международные проекты по характеристике транскриптомов при различных заболеваниях. В настоящее время происходит быстрое накопление данных об экспрессии генов с помощью различных технологий, таких как микрочипы, РНК-секвенирование (RNA-seq) и одноклеточное RNA-seq (single-cell RNA-seq), а также многочисленные точечные (по отдельным генам) экспериментальные исследования. Все эти результаты размещаются в базах данных открытого доступа (таких как GEO, ClinVar, ArrayExpress и др.), к ним разрабатываются специальные методы анализа данных. Например, для анализа транскриптома в нашей лаборатории был использован метод определения коэкспрессирующихся генов (WGCNA), который позволил обнаружить новый подтип в классификации глиом, а также выделить сигнальные пути, связанные с неблагоприятным прогнозом [44]. Были также разработаны методы поиска новых мишеней для лекарственных средств и новых сигнальных путей [45].

На необходимость разработки подходов, связанных с мета-анализами транскриптомных данных, направленных на структурирование данных, отбор характерных признаков (сигнатурных генов) и создание смысловой биологической интерпретации этих результатов, указывается в различных обзорах, предлагаются различные вычислительные алгоритмы для их анализа (см., например, обзор [46]). Именно анализ транскриптома лежит в основе характеристики текущего статуса системы, однако его прогнозы усиливаются при сочетании с данными уровня протеома и метаболома. Например, недавно было показано успешное сочетание методов анализа различных баз данных (транскриптом, интерактом, протеом и др) для исследования такого многофакторного заболевания с воспалительной компонентой, как болезнь Альцгеймера [47].

Для биологической интерпретации данных необходимо соотносить полученную информацию с интересующими фенотипами заболеваний и уметь эффективно выделять перспективные направления анализа. Интеграция транскриптомных данных вместе с другими данными, такими как данные метаболомного анализа и клиническая информация, уже используется, в первую очередь в исследованиях по обнаружению

биомаркеров [48]. Использование подходов с методами машинного обучения, успешно применено к изучению биологии болезни Альцгеймера [47], что расширяет возможности не только по обнаружению биомаркеров заболевания, но и пониманию механизмов возникновения и развития болезни.

Отметим успешное применение мультиомиксного подхода для комплексного изучения метаболического перепрограммирования в злокачественных клетках. Комбинирование данных транскриптомов совместно с оценкой изменения уровня метаболитов при исследовании рака молочной железы (РМЖ) позволило выделить ряд конкретных метаболитов, которые коррелировали с экспрессией метаболических генов [49]. Также для РМЖ показаны положительные корреляции между экспрессией генов, участвующих в гликолизе, и концентрацией лактата, а также между экспрессией генов синтеза нуклеотидов и концентрацией нуклеотидов, что подтвердило данные о повышенной активности гликолиза и биосинтеза нуклеотидов в РМЖ, полученные другими методами [50]. При изучении связи ожирения и РМЖ метаболомные данные плазмы крови были сопоставлены с данными РНК-секвенирования (RNA-seq), что позволило выявить метаболиты, обогащающие такие метаболические пути, как производство АТФ, пролиферация, метастазирование и другие. Такая комбинация транскриптомики и метаболомики позволила составить карту взаимодействий значимо измененных метаболитов и дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) [51].

Таким образом, мультиомиксные подходы широко используются для изучения различных многофакторных (системных) заболеваний. Следует отметить, что комплексные мультиомиксные исследования, направленные на изучение роли оксипинов в патогенезе различных заболеваний, немногочисленны. Определены профили оксипинов в тромбоцитах [52], Т-клетках [53], моноцитах [54], эндотелии сосудов [55]. Все эти оксипины могут вносить вклад в профиль оксипинов плазмы крови, создавая интегральное воздействие на весь организм.

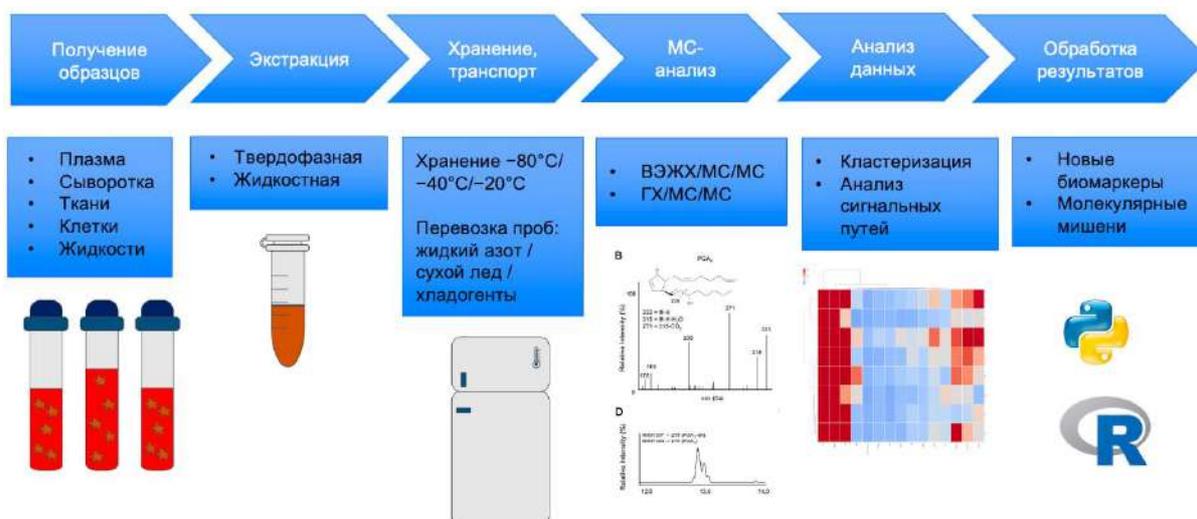
### **1.3 Исследования профилей оксипинов**

Изучение оксипинов долгое время было затруднено, в первую очередь из-за технической сложности обнаружения этих липидных соединений, концентрация которых в биологических жидкостях составляет всего 1-100 пмоль/литр [56]. Традиционные методы анализа, такие как

иммуноферментный анализ (ИФА), позволяют исследовать лишь несколько соединений за один раз. Прогресс в развитии методов масс-спектрометрии, особенно жидкостной хроматографии, сопряженной с tandemным масс-спектрометрическим анализом (ВЭЖХ-МС/МС), сделал возможным одновременное количественное измерение множества оксипинонов в образце [3,57,58]. Это стимулировало на новом уровне исследования биологической роли оксипинонов при заболеваниях и поиск биомаркеров для диагностики хронических неинфекционных заболеваний среди этой группы соединений.

На сегодняшний день обнаружено более 200 молекул из группы оксипинонов, проявляющих физиологическую активность [3]. Отметим, что это значительная часть общего содержания липидов в крови, где всего идентифицировано немногим более 600 липидов [59,60]. Были выявлены изменения в липидном профиле, характерные для различных заболеваний [60], и определены стандартные условия для измерения липидного профиля с целью его использования в клинической практике [61].

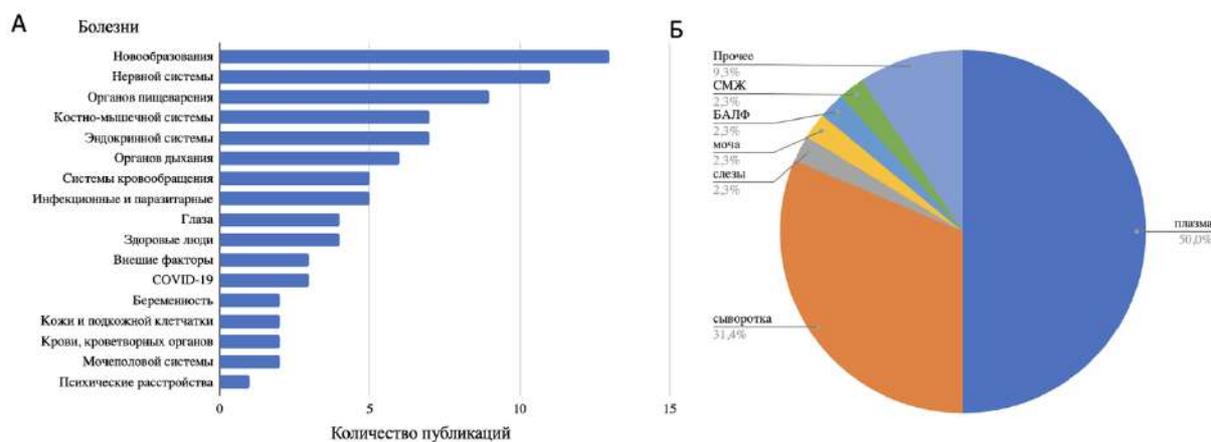
Без согласованных процедур и унифицированной исследовательской платформы невозможно создание надежных баз данных, связанных с “омиксными” технологиями. Рисунок 1.6 иллюстрирует платформу, используемую при “омиксном” подходе к изучению профиля оксипинонов. Каждый этап этого процесса (включая аспекты получения, сохранения и транспортировки образцов, их экстракцию (жидкостную/твердофазную), масс-спектрометрию и последующий анализ данных) имеет свои уникальные особенности и напрямую влияет на окончательный результат. В настоящее время общепринятым считается использование антиоксидантов для сохранения проб перед анализом, причем часто используемым консервирующим агентом является ВНТ (бутилгидрокситолуол). Немаловажную роль играют транспортировка и хранение проб, выбор исследуемой матрицы (кровь/плазма), момент взятия крови у пациентов и прочие особенности, подробно описанные в ряде методических статей на эту тему [56,62,63].



**Рис. 1.6.** Основные этапы проведения исследования профиля оксипинов в биологических объектах (рисунок приведен из работы [40]).

Проведенный нами систематический поиск исследований за последние 5 лет (2018-2023 года) выявил 137 уникальных публикаций, по ключевым словам: “eicosanoids disease biomarker”, “oxylipins disease biomarker”, “oxylipins disease profile” и “eicosanoids disease profile” в базе PubMed. Из них 77 публикаций подходили под описание изучения профиля оксипинов в биологических жидкостях человека при различных заболеваниях. Подробная информация об исследованиях приведена в электронной таблице [www.lipidomics.ru/Search\\_oxylipins.csv](http://www.lipidomics.ru/Search_oxylipins.csv).

Суммарная информация проведенного анализа отображена на Рис. 1.7. Все нозологии были классифицированы на основании МКБ-10. Несмотря на то, что оксипины идентифицируются в различных биологических объектах, включая слезную жидкость, мочу, фекалии, спинномозговую жидкость (СМЖ), Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛФ), более чем в 75% исследований профили оксипинов анализируются в образцах крови — сыворотке и плазме (Рис. 1.7Б). Наиболее часто профиль оксипинов анализировали при изучении различных онкологических заболеваний (колоректальный рак, рак молочной железы и др.) и нарушений нервной системы (болезнь Паркинсона (БП), болезнь Альцгеймера) **Рис. 1.7А**, электронный ресурс [www.lipidomics.ru/Search\\_oxylipins.csv](http://www.lipidomics.ru/Search_oxylipins.csv). Рассмотрим онкологические заболевания и нарушения нервной системы более подробно с фокусом на результаты мультиомиксного изучения оксипинов.



**Рис. 1.7.** Результаты систематического поиска публикаций с анализом профиля оксипинов за период 2018-2023 гг.

### 1.3.1 Профили оксипинов крови и онкологические заболевания

В настоящее время нарушения обмена веществ и воспалительные процессы, как острые, так и хронические, рассматриваются как сопутствующие факторы при онкологических заболеваниях [64]. Известно, что полиненасыщенные жирные кислоты и их производные играют важную роль в различных онкологических патологиях [24,64–66]. ПНЖК также являются молекулами-предшественниками, которые необходимы для синтеза оксипинов — метаболитов, активно участвующих в воспалительных процессах и отвечающих за физиологический ответ организма на патологические состояния на клеточном и организменном уровнях [5,24]. Хроническое воспаление, важной особенностью которого является нарушение биосинтеза оксипинов, может способствовать злокачественной трансформации клеток (см. обзор [65]).

Множество экспериментов, проводимых на клетках, животных моделях и в рамках клинических исследований, направлено на изучение влияния отдельных групп оксипинов, прежде всего производных АА, простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов, на онкологические заболевания [65,67–69]. Большинство исследований концентрируются на анализе метаболических изменений, связанных с трансформацией полиненасыщенных жирных кислот в опухолевых клетках или их ближайшем микроокружении, и на поиске новых мишеней для создания лекарственных препаратов. Так, давно изучается роль метаболитов, образующихся через LOX-путь биосинтеза оксипинов, в регуляции опухолевых процессов (см. обзор Catalano и Procopio [70]), а также хорошо исследован COX-путь биосинтеза арахидоновой кислоты с образованием простагландинов и потенциал применения ингибиторов COX или

рецепторов простагландинов для терапии различных типов рака (см. недавний обзор Wang et al. [71]). Терапевтические аспекты направленного изменения профиля производных ПНЖК, образующихся в результате активности цитохрома P450 (CYP), также рассматриваются (см., например, обзор Luo и Liu [72]), включая потенциальное использование ингибиторов растворимой эпоксидгидролазы (sEH) [73] и ферментов семейства CYP [74] при различных опухолевых заболеваниях. Эндоканнабиноидная система также привлекает внимание как потенциальная цель для терапии раковых заболеваний, роль как эндогенных, так и экзогенных каннабиноидов разобрана в обзоре Laezza et al. [75]. Таким образом, уже установлено, что все ветви метаболизма ПНЖК участвуют в процессах, происходящих при раковой трансформации клеток или развитии заболевания, однако изучения метаболизма оксипиринов как системы взаимодействующих процессов не проводилось.

Результаты исследований отдельных путей метаболизма ПНЖК позволили ряду исследователей выдвинуть предположения о потенциальной возможности использования количественного определения оксипиринов в крови для оценки состояния организма. Исследования профилей оксипиринов в крови проводились на пациентах с разными видами онкологических заболеваний, в том числе с раком молочной железы (РМЖ) [76], немелкоклеточным раком легкого [77], колоректальным раком [78–80], раком легкого [81], гепатоцеллюлярной карциномой [82,83], раком предстательной железы [84], канцероматозом брюшины [85], раком яичника [86] (Таблица 1.1). В зависимости от цели исследования анализировали разные наборы метаболитов, от 2 до 38 (Таблица 1.1).

**Таблица 1.1.** Изменения профилей ПНЖК и оксипиринов в крови пациентов с различными типами рака (адаптировано из работы [40]).

Заболевание	Количество метаболитов	Больные/Здоровые (чел.)	Плазма/сыворотка	Изменения	Ссылка
Рак молочной железы	21	20/20	плазма	↑ (13-HODE, 9-HODE, 13-HOTrE, 9-HOTrE и 12-HHT)	[76]
Немелкоклеточный рак легкого	8	55/165	сыворотка	↑ (AA, LA, 5-HETE, 11-HETE, 12-HETE, и 15-HETE)	[81]
	6	69/76	плазма	↓ (13-HODE и AA)	[77]

Коло-ректальный рак	113	55/52 и 34*	сыворотка	↓ (9-HODE, 13-HODE, 12,13-diHOME, PGD <sub>2</sub> , 15-HETE, 11-HETE, 15-KEDE, 5,15-DiHETE, 8-HETE и 13,14-dihydro-15-keto-PGD <sub>2</sub> )	[78]
	2	8/14	сыворотка	↑ (12-HETE и TXB <sub>2</sub> )	[79]
	38	25/10	сыворотка	↑ (2,3-dinor-8-iso-PGF <sub>2α</sub> ); ↓ (13-HODE, 19-HETE, 9-HODE, 12-keto-LTB <sub>4</sub> )	[80]
Гепатоцеллюлярная карцинома	8	30/30 и 27***	сыворотка	↑ (AA, DGLA, 13-HODE + 9-HODE, 15-HETE, 12-HETE) ***	[82]
	22	51/39	сыворотка	↑ (PGF <sub>2α</sub> , TXB <sub>2</sub> , PGEM, 6-keto-PGF <sub>1α</sub> , LTE <sub>4</sub> , 5-HETE, 15-HETE, 12-HETE, 9-HETE, 8-HETE, 14,15-EET, 14,15-DHET, 5,6-EET, 5,6-DHET, 9,10-EpOME, 13-HODE, 9-HODE)	[83]
Рак предстательной железы	6	РПЖ 20/12 и 222****	сыворотка	у пациентов с поздними стадиями: ↑ (5-HETE, 8-HETE, 11-HETE и 15-HETE)	[84]
Перитонеальный канцероматоз	4	6/17	плазма	LTB <sub>4</sub> детектирован только у пациентов с раком	[85]
Рак яичника	31	157/156	сыворотка	повышенный риск развития РЯ при ↑ (8-HETE, 12,13-DHOME, 13-HODE, 9-HODE и 9,12,13-THOME)	[86]

Примечание. У больных по сравнению с контролем: ↑ – концентрации повышены; ↓ – концентрации понижены. \* пациенты с энтеритом, \*\* пациенты с циррозом печени, вызванным вирусом гепатита С; \*\*\* – у пациентов с ГЦК по сравнению с пациентами с циррозом печени, вызванным вирусом гепатита С; \*\*\*\* валидационная выборка: 222 пациента с различными уровнями ПСА.

В исследовании при анализе профиля из 21 липидного медиатора у пациентов с РМЖ выявили увеличение концентрации 5 соединений: 12-ННТ (производное АА по СОХ-пути), метаболитов, синтезируемых по LOX-пути – 9-HODE, 13-HODE (производные LA) и 13-HOTrE, 9-HOTrE (производные ALA) [76].

В исследовании Nada и соавторов [86] проводился анализ профилей оксипиринов в рамках обширного исследовательского проекта, направленного на поиск маркеров рака легких, простаты, яичников и колоректального рака, который был проведен в период с 1993 по 2003 год. В исследовании принимали участие более 78 000 женщин в возрасте от 55 до 74 лет, регулярно проходивших медицинские осмотры, во время которых брались образцы крови. Из этой группы было отобрано 157 пациенток с диагнозом рака яичников. Была проведена оценка концентрации 31 оксипирина в сыворотке крови. Результаты показали, что профиль оксипиринов не различался при сравнении пациенток с уже подтвержденным диагнозом и здоровых людей. Однако сравнение образцов крови этих групп, собранных до развития заболевания, показало, что у людей, которые впоследствии заболели раком яичников, наблюдались повышенные концентрации трех соединений, образующихся по LOX-пути: производных линолевой кислоты 13-HODE, 9-HODE и 9,12,13-TriHOME, и производного АА (8-HEETE), а также образующегося по CYP-пути производного LA (12,13-DiHOME). Таким образом, определение профиля оксипиринов может иметь прогностическое значение при раке яичника. Тем не менее, до сих пор неясно, связаны ли изменения профиля оксипиринов с ранними стадиями заболевания или они являются признаком предрасположенности организма к развитию рака.

Для колоректального рака в таблицу включены три работы: два исследования [78,80] опубликованы одними и теми же авторами с использованием аналогичных методов. В первом случае (работа [80]), в выборке из 25 пациентов с колоректальным раком и 10 здоровых контрольных образцов было обнаружено повышение уровня 2,3-dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> и снижение уровня метаболитов, образующихся по LOX-пути: 13-HODE, 19-HEETE, 9-HODE и 12-keto-LTB<sub>4</sub>. Во втором исследовании [78] с увеличенным числом пациентов (55 пациентов, 52 контрольных и 34 пациента с диагнозом энтерит) было отмечено снижение уровня 10 метаболитов. Большинство из них также образуются по LOX-пути

биосинтеза оксилипинов: 9-HODE, 13-HODE, 15-KEDE, 15-НЕТЕ, 8-НЕТЕ, 5,15-diНЕТЕ. Также наблюдалось снижение 12,13-DiНОМЕ (CYP-путь) и трех метаболитов, синтезируемых по СОХ-пути (11-НЕТЕ, PGD<sub>2</sub>, 13,14-dihydro-15-keto-PGD<sub>2</sub>). В работе Guo и соавторов [79] на сравнительно небольшой выборке, состоящей из 8 пациентов и 14 здоровых доноров, было отмечено повышение концентрации производных АА (12-НЕТЕ и TXB<sub>2</sub>) у пациентов с колоректальным раком.

Профиль оксилипинов в крови при гепатоцеллюлярной карциноме анализировался в двух работах [82,83]. В работе Fitian и соавторов [82] было отмечено, что при метаболомных исследованиях гепатоцеллюлярной карциномы важно проводить сравнение не только со здоровыми контролями, но и с соответствующими больными, поскольку более 90% заболеваний диагностируются у пациентов с циррозом печени. Сравнение метаболических профилей, включая пациентов с циррозом, может иметь большее клиническое значение, чем сравнение пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой и здоровых контролей. В данной работе была отмечена повышенная концентрация таких ПНЖК, как АА и DGLA, а также окисленных метаболитов, синтезирующихся по LOX-пути: 13-HODE + 9-HODE, 15-НЕТЕ, 12-НЕТЕ, по сравнению с пациентами с циррозом печени [82]. В работе Gong и соавторов [83] были детектированы 22 оксилипина, из которых концентрация 17 соединений была повышена в сыворотке больных: СОХ-метаболиты PGF<sub>2α</sub>, TXB<sub>2</sub>, PGEM, 6-keto-PGF<sub>1α</sub>; LOX-метаболиты LTE<sub>4</sub>, 5-НЕТЕ, 15-НЕТЕ, 12-НЕТЕ, 9-НЕТЕ, 8-НЕТЕ, 13-HODE, 9-HODE и CYP-метаболиты: 14,15-EET, 14,15-DHET, 5,6-EET, 5,6-DHET, 9,10-EpOME.

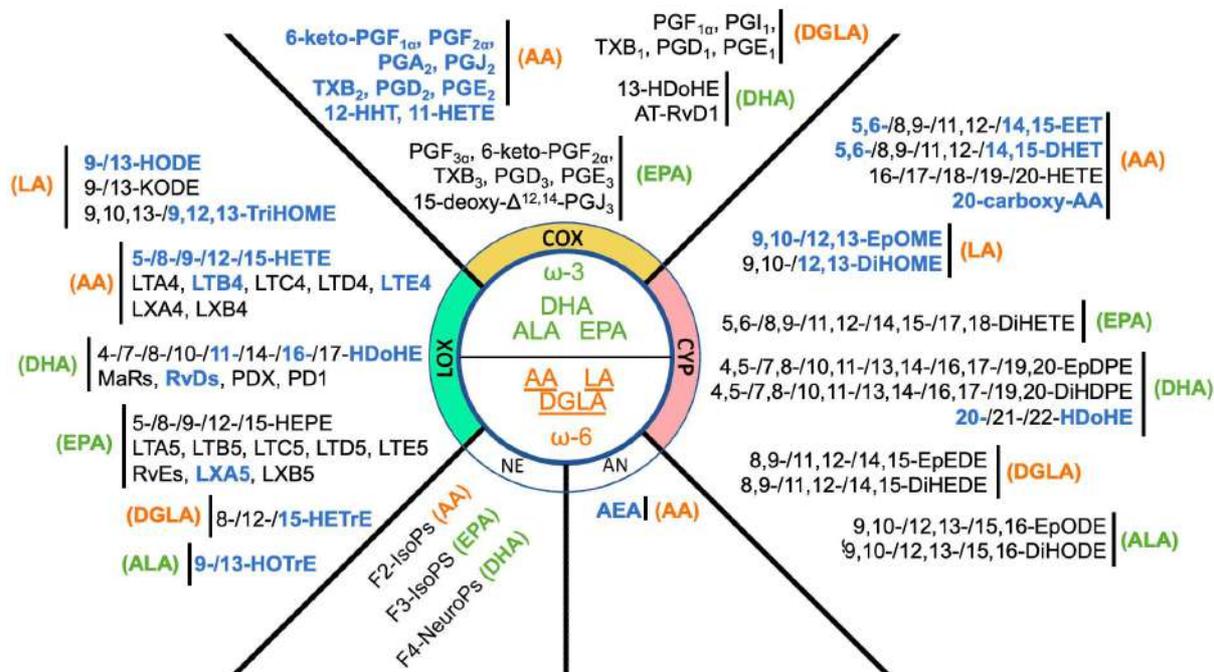
При немелкоклеточном раке легких [81] и раке предстательной железы [84] наблюдали увеличение производных АА – 11-НЕТЕ, 5-НЕТЕ и 15-НЕТЕ. В то же время в работе Zhen et al. [77] у пациентов с немелкоклеточным раком легкого анализировалась концентрация 6 липидных соединений, и было обнаружено снижение концентрации 13-HODE и АА. Данное различие может быть связано с особенностями подбора групп пациентов для исследований: в работе Liu et al. [81] в исследование были включены 55 пациентов, из которых у 34 была III–IV стадия рака, тогда как в работе Zhen et al. [77] из 69 пациентов у 42 была I-я стадия.

Интересно отметить, что изменение количества свободных ПНЖК в крови не коррелирует с изменением образующихся из них метаболитов. Например, обнаруживаемое количество свободной АА в крови

уменьшается при раке предстательной железы [84], но увеличивается при раке легкого [81]. В случае рака легкого также наблюдалось снижение концентрации LA (линолевой кислоты) [81]. Эти данные поддерживают ранее высказанное предположение о том, что процессы высвобождения ПНЖК из фосфолипидов, их переноса в кровь и внутриклеточного метаболизма ПНЖК в оксипирины регулируются по-разному и не связаны напрямую друг с другом [87].

Приведенные примеры показывают, что метаболизм оксипиринов изменяется по многим путям, и образуются активные соединения, являющиеся производными различных ПНЖК. Различия между работами объясняются различиями в наборе определяемых соединений, а также выборками, т.е. группами пациентов с разными стадиями заболевания. Для изучения сложных комплексных заболеваний необходимы большие выборки исследуемых пациентов и здоровых доноров (контроли). Тем не менее, профили оксипиринов уже рассматриваются в качестве диагностических маркеров. Для оценки эффективности предложенных диагностических маркеров часто используется показатель площади под характеристической ROC-кривой ошибок, обозначаемый как ROC-AUC. Чем больше площадь под ROC-кривой в диапазоне от 0 до 1, тем точнее предлагаемый тест отличает пациентов с наличием заболевания от пациентов без него. Этот показатель был вычислен в ряде работ, в которых предлагалось использовать профили оксипиринов в качестве маркеров для диагностики различных видов заболеваний [77,78,82,83]. В ходе анализа плазмы пациентов с немелкоклеточным раком легких отмечалось снижение уровня 13-HODE и AA по сравнению со здоровыми контролями, и эти липидные медиаторы были предложены в качестве диагностической панели; значение ROC-AUC для метода опорных векторов составило 0,900, а среднее значение точности предсказания составило 0,852 [77]. Для разделения пациентов с колоректальным раком и контрольной группы была предложена панель включающая 6 метаболитов – 13,14-dihydro-15-keto-PGD<sub>2</sub>, 15-KEDE, 11-HETE, 15-HETE, 8-HETE и 5,15-diHETE; значение ROC-AUC для этих оксипиринов составило 0,9 [78]. Для диагностики гепатоцеллюлярного рака была предложена диагностическая панель из 4 эйкозаноидов (PGF<sub>2α</sub>, TXB<sub>2</sub>, 5-HETE и 15-HETE) со значением ROC-AUC, равным 0,843 при разделении больных пациентов и контрольной группы [83]. Интересно, что при разделении пациентов с использованием альфа-фетопротеина, традиционного маркера для диагностики данного

заболевания, показатель ROC-AUC составляет 0,832. Это значение схоже с результатом панели оксипинов. Однако, при разделении пациентов с гепатоцеллюлярным раком и пациентов с циррозом печени, который вызван вирусом гепатита В, показатель ROC-AUC маркера альфа-фетопротеин равен 0,657. В то время как для панели оксипинов этот показатель равен 0,784. Это говорит о том, что использование панели оксипинов позволяет более точно определить заболевание по сравнению с традиционным маркером [83]. В работе Fitian et al. [82], при анализе сыворотки больных гепатоцеллюлярной карциномой, было обнаружено, что 15-НЕТЕ может рассматриваться как потенциально важный метаболический признак этого заболевания с чувствительностью 83.3% и специфичностью 59.3% (ROC-AUC составил 0,705). В исследованиях профилей оксипинов при раке легкого было показано, что АА, LA и 15-НЕТЕ обладают наилучшими показателями чувствительности и специфичности (>0,70), ROC-AUC (0,76–0,82) при разделении больных и здоровых людей [78]. В целом, в настоящее время ведутся перспективные исследования использования оксипинов в качестве диагностических маркёров при различных видах онкологических заболеваний.



**Рис. 1.8.** Оксипины, изменяющиеся в крови пациентов с онкологическими заболеваниями. Синим цветом выделены соединения, изменяющиеся на основании работ [76–86]. Рисунок приведен из работы [40].

На рис. 1.8 на общей схеме оксипинонов, производных  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 ПНЖК синим цветом выделены соединения, изменяющиеся в крови пациентов с онкологическими заболеваниями по сравнению со здоровыми донорами. Среди оксипинонов, которые синтезируются по СОХ-пути, в крови человека были обнаружены изменения только для метаболитов АА. Для метаболитов, образованных по пути СУР, были показаны изменения в метаболитах LA и AA (Рис. 1.8). Наиболее значительные изменения в оксипиноне крови наблюдаются в метаболитах LOX-пути, меняются метаболиты всех 6 приведенных кислот (Рис. 1.8). Важно отметить, что изменение концентрации метаболитов, которые образуются по LOX-пути, характерно для всех типов рака, представленных в таблице. В зависимости от типа рака, участие путей биосинтеза оксипинонов меняется, но заметно, что происходят одновременные преобразования ПНЖК по разным метаболическим путям. Пока остается неясным, какие процессы отражаются в составе смесей оксипинонов крови и как на них влияют вид заболевания, его стадия или применяемая терапия.

Показано, что оксипиноны могут синтезироваться непосредственно в опухолевых клетках [3,88], пораженном органе вокруг опухоли [88], клетках крови [52,53], эндотелии [55] и других частях организма [89]. Какой из этих источников вносит наибольший вклад в изменение оксипинонов крови? Являются ли таковыми непосредственно опухолевые клетки, окружение опухоли или же это уже общая системная реакция организма на болезнь? На текущий момент этот вопрос все еще остается без ответа.

Подводя итоги, можно сделать следующее заключение: 1) мультиомиксные подходы набирают всё большую популярность для изучения различных типов рака; 2) ведутся исследования по оценке возможности применения диагностических панелей на базе профилей оксипинонов в онкологии; 3) остаются открытыми вопросы интерпретации биологических свойств профилей оксипинонов, понимания характера передачи ими информации между различными типами клеток, пораженными и здоровыми тканями. В настоящее время сложно обсуждать биологические процессы, лежащие в основе наблюдаемых отличий, потому что исследования профилей оксипинонов находятся только в начале своего пути, и необходимы дальнейшие скрининговые исследования.

### 1.3.2 Профили оксипинов и неврологические заболевания

Нейровоспаление участвует в патогенезе ряда нейродегенеративных заболеваний (см. обзор [90]). Отдельные оксипиновы давно изучаются в контексте нейродегенеративных заболеваний [91,92]. Важно отметить, что показана корреляция между профилями оксипинов крови и изменениями функций мозга [93]. Однако из-за недостаточных знаний о характере взаимосвязей между отдельными видами оксипинов и отсутствия соответствующих методов определения, позволяющих уловить эти взаимосвязи, понимания их роли в нейродегенерации недостаточно.

Существует несколько публикаций, в которых профили оксипинов оценивались при нейродегенеративных заболеваниях (их краткое описание приведено в таблице 1.2). Например, в работе [94] при анализе профиля из 20 оксипинов в плазме пациентов с БАС выявили снижение 7 метаболитов, из них 4 производных производных LA (9-NODE, 13-NODE, 9,10-DiHOME, 12,13-DiHOME), 2 метаболита AA (5-NETE, 11-NETE) и 1 метаболита DHA (14-HDoHE). Кроме того, уровни 13-NODE и 9-NODE в плазме положительно коррелировали с продолжительностью заболевания, выраженной в днях от начала болезни [94]. В работе [57] сравнивали профиль оксипинов пожилых людей и пациентов с БА, и выявили ряд оксипинов, 14,15-/11,12-/5,6-/8,9-DiNETrE, которые могут участвовать в патогенезе заболевания.

В работе Liu и соавторов [95] сравнение профиля оксипинов 42 пациентов с БП и 54 здоровых контролей выявило увеличение двух соединений - AA и 13-NOTrE и снижение концентрации 11 соединений: DHA, lyso-PAF, 12-NETE, 5,6-DHET, 9-NpODE, 13-NpODE, 14,15-DHET, 11,12-DHET, 17,18-DiNETE, 9,10-DiHOME, 12-13-DiHOME. Метод опорных векторов был использован для поиска биомаркера БП. Чувствительность и специфичность AA как диагностического фактора БП в валидационном наборе составили 100% и 94,1%. Аналогично, чувствительность и специфичность 13-NpODE составили 100 % и 82,4 % для выявления БП [95].

Несмотря на небольшое количество подобных исследований, уже можно сделать вывод о том, что ряд нейродегенеративных заболеваний обладает своим характерным профилем оксипинов плазмы. Профиль оксипинов можно назвать уникальным "отпечатком пальца", отражающим динамические характеристики изменений, происходящих в данном организме.

Корреляции между оксипипинами крови и развитием патологических процессов в мозге указывают на возможную роль оксипипинов в регуляции на уровне поддержания гомеостаза и изменений функций организма при адаптации к возникающей патологии, которые сопровождаются хроническими воспалительными процессами. Хотя в настоящее время сложно обсуждать биологические процессы, лежащие в основе такой регуляторной роли системы оксипипинов, очевидно, что необходимы исследования профилей оксипипинов в различных скрининговых исследованиях системных заболеваниях, в том числе, нейродегенеративных.

**Таблица 1.2.** Оценка содержания оксипипинов в образцах крови пациентов с заболеваниями ЦНС (адаптировано из работы [96]).

Оксипипины*	Заболевание	Плазма/Сыворотка	Изменения (больные vs здоровые)	Больные/Здоровые (чел.)	Ссылка
-	Большое депрессивное расстройство	Плазма	Нет	n = 48/9	[97]
9-HODE, 13-HODE, 9,10-Di-HOME, 12,13-Di-HOME, 5-HETE, 14-HDoHE, 11-HETE	Боковой амиотрофический склероз	Плазма	Снижение	n = 78/9	[94]
14,15-DiHETrE, 11,12-DiHETrE, 5,6-DiHETrE, 8,9-DiHETrE	Болезнь Альцгеймера	Сыворотка	Снижение	n = 45/39	[57]
AA и LA	Болезнь Альцгеймера, легкое когнитивное расстройство	Сыворотка	Снижение	n = 30/30	[98]
Изопростаны-F <sub>2α</sub>	Болезнь Альцгеймера	Плазма	Снижение	n = 80/32	[99]
AA, 13-HOTrE, DHA, lyso-PAF, 12-HETE, 17,18-DiHETE, 9,10-Di-HOME, 12-13-Di-HOME,	Болезнь Паркинсона	Плазма	Повышение: AA и 13-HOTrE Снижение: DHA, lyso-PAF, 12-HETE, 17,18-DiHETE, 9,10-DiHOME, 12-13-DiHOME	n = 42/54	[95]
LTB <sub>3</sub> , Lyso-PC	Болезнь Паркинсона	Плазма	Снижение	n = 28/18	[100]

F2-IsoPs, F4-NP, and HETE	Болезнь Паркинсона	Плазма	Повышение при ранней стадии БП	n = 61/61	[101]
АЕА	Болезнь Паркинсона	Плазма	Снижение	n = 178/274	[102]

\* - показаны соединения, концентрация которых изменялась

## 1.4 Современный взгляд на врожденный иммунитет и воспаление

Оксилипиды являются важными участниками воспалительных ответов на уровне организма и клеток. Воспалительный ответ является неотъемлемой частью активации системы врожденного иммунитета. В реализацию ответа вовлечены разнообразные белковые и липидные медиаторы воспаления, участвующие в каскадах внутриклеточных превращений. Исследования последних двух десятилетий значительно расширили представления о молекулярных механизмах врожденного иммунитета и воспалительных процессах.

### 1.4.1 Основные принципы врожденного иммунитета и воспалительных процессов

Врожденный иммунитет — это первая линия защиты организма [103,104]. В узком смысле она представляет собой ряд механизмов и адаптаций, препятствующих вторжению патогенов различной природы (вирусов, бактерий, многоклеточных паразитов и т.д.). В широком смысле врожденный иммунитет служит для защиты хозяина от нарушения гомеостаза независимо от его причины. В рамках этого определения к механизмам врожденного иммунитета можно отнести физико-химические барьеры, препятствующие вторжению патогенов (эпителиальная поверхность кожи, слизистые поверхности легких и кишечника, кислая среда желудка и т.д.), а также широкий спектр поведенческих адаптаций, защиту хозяина микробиотой, клеточные и молекулярные защитные механизмы [105]. Врожденная иммунная защита выходит далеко за рамки функции одного набора клеток или органов и включает в себя многоуровневые сложные механизмы и адаптации.

Врожденный иммунитет может активироваться сигналами повреждения тканей, не сопровождающимися инвазией патогенов. Такое явление получило название “стерильного воспаления” [104,106]. Хотя термин “воспаление” изначально был введен для описания процессов на тканевом уровне, в настоящее время многое известно о процессах на клеточном уровне и сигнальных путях воспаления, которые действуют в рамках этого явления. Поэтому в настоящее время используются понятия “воспалительные сигнальные пути” и “сигнальные пути врожденного иммунитета” [107].

Управление воспалительными процессами является одной из важнейших задач фундаментальных исследований для медицины.

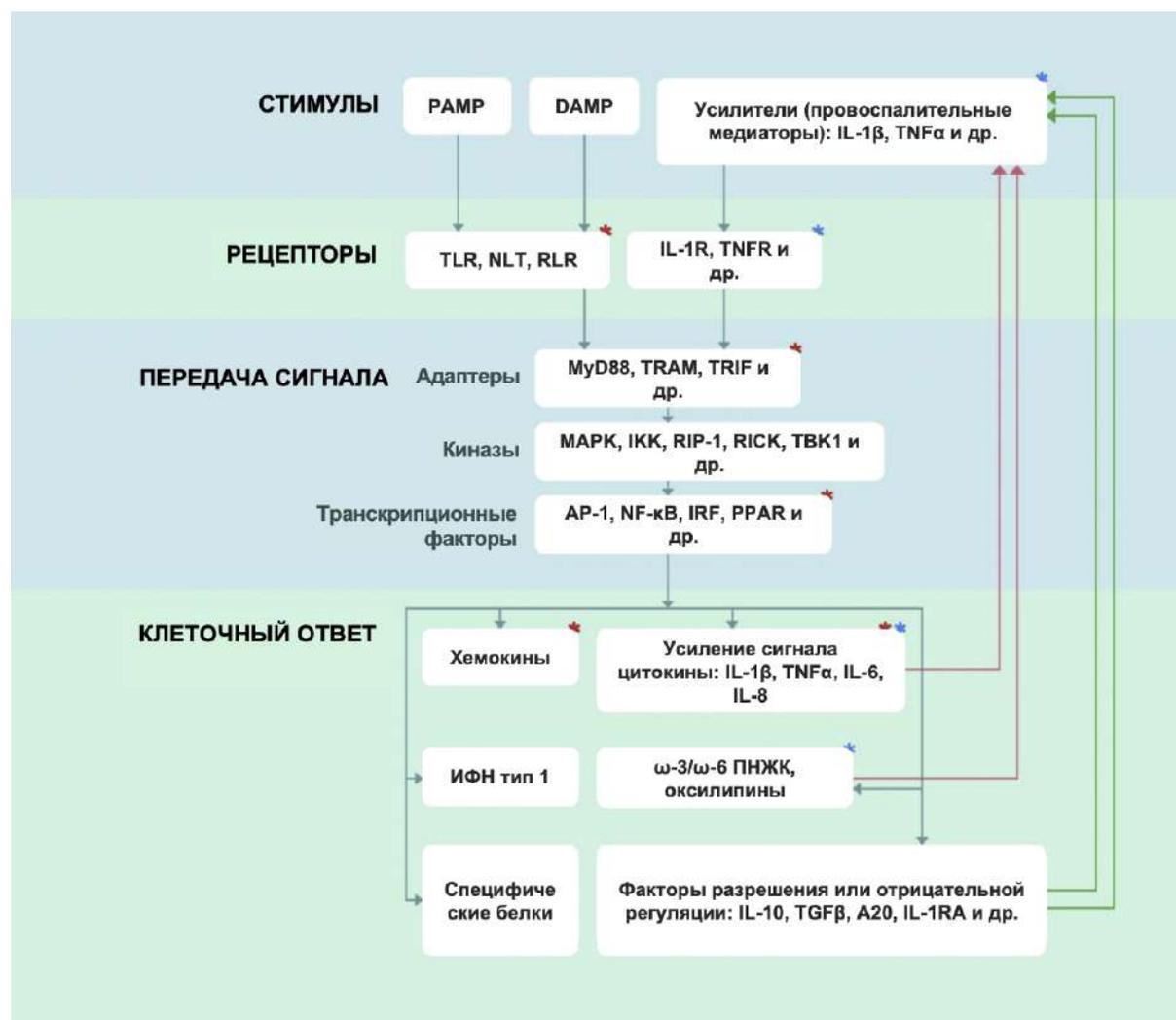
Воспаление представляет собой ключевой механизм врожденного иммунного ответа на появление сигналов опасности, которыми могут являться молекулярные паттерны, характерные для возбудителей инфекций или вещества, указывающие на повреждение ткани. Воспаление сопровождается не только инфекционными заболеваниями, а также индуцируется при инсультах, ожогах, нарушениях метаболизма, воздействия различных стрессов. В настоящее время стало понятно, что воспалительный ответ выполняет важные системные защитные функции, направленные на поддержание гомеостаза [108]. В фокусе исследований находятся патологии, связанные с так называемым хроническим воспалением. Хроническое воспаление — это иммунный ответ, который не возвращается к своему первоначальному состоянию в течение длительного периода времени и в силу неспецифичной цитотоксичности врожденного иммунитета наносит организму значительный урон [109]. Важно отметить, что молекулярные компоненты системы врожденного иммунитета, обеспечивающие ответ воспалительного типа, содержатся не только в иммунных клетках, но и в большинстве клеток различных органов и тканей, и изменения в функционировании этих систем проявляются в реакциях хронического воспаления [109].

Хроническое воспаление рассматривают как один из ключевых факторов патогенеза многих системных заболеваний, таких как диабет 2 типа, онкологические заболевания, инсульты, нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона) и др. [110–112]. Значительный прогресс за последние пять лет сделан в понимании молекулярных механизмов и ключевой роли сигнальных липидов в регуляции воспалительных процессов и сопряженных с ними иммунных реакций, включая повышенную реактивность сосудов и боль, а также миграции клеток крови, что во многом определяет статус и емкость всей системы врожденного иммунитета (см., например, обзор [113]).

#### **1.4.2. Позитивная и негативная регуляция воспаления на молекулярном уровне**

Общие сведения о регуляции воспаления на молекулярном уровне получены из исследований иммунных клеток. Клетки врожденного иммунитета, как циркулирующие лейкоциты, включая моноциты и нейтрофилы, так и обитающие в тканях, такие как макрофаги, фибробласты, тучные и дендритные клетки, распознают вторжение патогенов или повреждение клеток с помощью внутриклеточных рецепторов или экспрессируемых на поверхности рецепторов опознавания паттернов (PRR). Эти рецепторы способны распознавать патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), такие как нуклеиновые кислоты, липопротеины и углеводы, или повреждающие молекулярные паттерны (DAMP), высвобождаемые из поврежденных клеток [104].

Обобщенная схема сигнального каскада воспалительного ответа на клеточном уровне приведена на (Рис. 1.9). Как инфекции, так и сигналы, поступающие из поврежденных тканей (PAMP, DAMP), активируют PRR. Основными семействами PRR являются Толл-подобные рецепторы (TLR), NOD-подобные рецепторы (NLR), RIG-I-подобные рецепторы (RLR) и лектиновые рецепторы С-типа (CLR) [104,107,114]. TLR локализованы на плазматических и внутренних мембранах. RLR и NLR находятся в цитоплазме.



**Рис. 1.9** Внутриклеточные сигнальные пути рецепторов распознавания образов. Активация рецепторов (TLR, NLR и др.) вызывает ряд сигнальных путей, в состав которых входят белковые адаптеры (MyD88, TRAM и др.), киназы (MAPK, IKK и др.) и транскрипционные факторы (AP-1, NF- $\kappa$ B и др.). Факторы транскрипции связываются со специфическими участками ДНК и активизируют синтез молекул-медиаторов, которые могут оказывать как про-, так и противовоспалительное воздействие. К таким молекулам относятся различные цитокины, хемокины и липидные медиаторы воспаления (Рисунок адаптирован из обзора [115]).

Активация рецепторов приводит к передаче сигнала через изменение конформаций белков и через сигнальные комплексы, которые собираются вокруг адапторных белков (Рис. 1.9). Эти комплексы, в свою очередь, передают сигналы через активацию киназных каскадов. Многие киназы, участвующие в воспалении, хорошо известны, к ним относятся митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК), I $\kappa$ B-киназы (IKK) и некоторые другие. Мишенями некоторых киназ являются транскрипционные факторы (семейства белков NF- $\kappa$ B, AP-1, IRF). Активация транскрипционных факторов позволяет им связываться со специфическими последовательностями ДНК и изменять экспрессию множества генов.

Изменение экспрессии генов, в свою очередь, индуцирует или подавляет выработку белков, которые в конечном итоге опосредуют клеточный ответ (Рис. 1.9). Эти ответы сопровождаются выбросом медиаторов воспаления: хемокинов, цитокинов, сигнальных липидов (простагландинов, лейкотриенов) и т.д. [104,116,117]. Некоторые из экспрессируемых белков выполняют специализированные функции в измененных условиях. Другие опосредуют провоспалительный ответ, высвобождаются из клеток и связываются с соответствующими рецепторами, повышая уровень собственной продукции и формируя петли положительной обратной связи (Рис. 1.9).

Для правильной передачи сигнала и клеточного ответа системе необходимы механизмы, сдерживающие, блокирующие и завершающие сигнальные каскады. Ответ на воспалительный стимул регулируется на молекулярном уровне с помощью следующих механизмов: а) петель положительной обратной связи, которые усиливают ответ; б) отрицательных регуляторов, которые блокируют усиление в сигнальном пути; в) регуляторов, обеспечивающих разрешение воспалительного ответа; г) механизмов, опосредующих противоположные про- и противовоспалительные процессы на различных этапах ответа. Наиболее изученными отрицательными регуляторами в известных сигнальных путях, таких как TLR (Толл-подобные рецепторы), являются белки, а также различные виды регуляторных РНК (микроРНК), которые обеспечивают блокирование передачи сигнала на различных уровнях (см. обзор Akira et al. [118]). К негативным регуляторам относят белки, инактивирующие определенные молекулярные комплексы адаптеров внутри сигнальных каскадов, и фосфатазы, обеспечивающие инактивацию киназ. К настоящему времени идентифицировано более 80 генов, кодирующих такие

белки [119]. Кроме того, важными компонентами негативной регуляции воспалительных процессов являются механизмы контроля скорости распада мРНК и белков [120]. Эти регуляторные механизмы имеют огромное значение, поскольку сбои в своевременном блокировании воспалительных каскадов являются ключевой особенностью фатальных состояний — цитокинового шторма и сепсиса (см. обзор [121]).

В настоящее время, наиболее изученной на молекулярном уровне частью врожденного иммунитета является активация TLR. Семейство TLR млекопитающих подразделяется на две основные группы: (1) клеточные поверхностные TLR (TLR1, -2, -4, -5, -6 и -10), распознающие PAMP, которые в основном входят в состав стенок бактерий или экспрессируются на поверхности бактериальных клеток (например, липополисахарид, агонист TLR4); и (2) внутриклеточные TLR (TLR3, -7, -8 и -9), распознающие микробные нуклеиновые кислоты (например, двухцепочечные РНК, агонисты TLR3). В активацию TLR вовлечен комплекс внутриклеточных сигнальных каскадов, включающих в себя митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК), факторы транскрипции (NF-κB, AP-1, IRF-3 и т.д.), что в результате приводит к высвобождению различных сигнальных липидов, хемокинов и цитокинов [114,122].

Таким образом, активация на клеточном уровне системы врожденного иммунитета это комплекс взаимосвязанных реакций, частью которого является метаболизм оксипинов. Профили оксипинов следует изучать в комплексном взаимодействии с изменениями цитокинов, а также киназ и других регуляторных внутриклеточных маркеров.

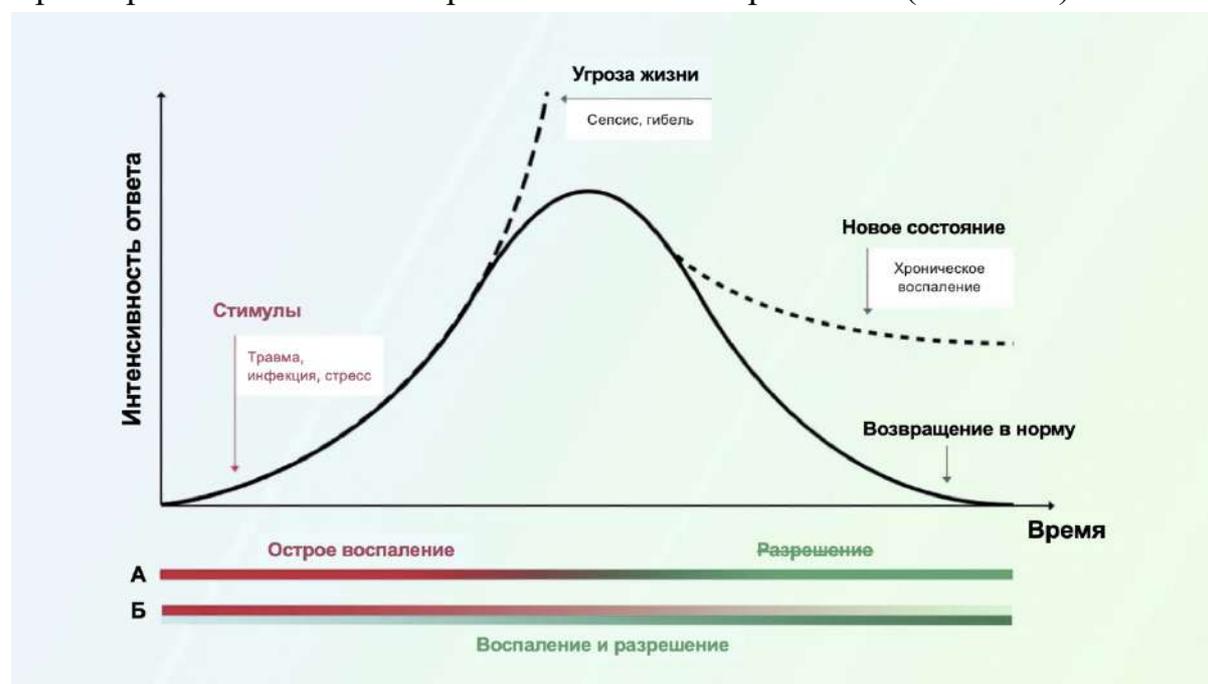
### **1.4.3 Современное представление о воспалительном ответе**

За последние годы в изучении воспаления был сделан значительный прорыв [119,122]. Прежде всего, было показано, что разрешение воспаления — это активный процесс, которым можно активно управлять. Более того, несбалансированные механизмы положительной и отрицательной обратной связи регуляторных путей врожденного иммунитета могут приводить к развитию хронического воспаления.

Традиционно процесс воспаления рассматривали как сложное патофизиологическое состояние, принимаемое в основном клетками врожденного иммунитета в ответ на инфекцию или повреждение тканей [123,124]. К настоящему времени уже сформировалось понимание

воспаления как саморегулирующегося процесса и концепция разрешения воспаления (“*resolution of inflammation*”) как активного процесса [108,123].

Общие соображения о развитии воспалительной реакции представлены на Рис. 1.10. Этот же подход в определенной степени может быть применен и к описанию влияния стресса на аффективные расстройства [115]. Видимо, это общая схема для ответа живой системы на внешний стимул. Первичный стимул инициирует развитие реакции (Рис. 1.10). Это может быть патоген или травма. Различные варианты стресса также можно рассматривать как триггер для ответной реакции (Рис. 1.10). На начальном этапе действия стимула существуют механизмы усиления ответа на него. Скорее всего, это связано с необходимостью адаптации к сигналу. Чрезмерный ответ может привести к гибели организма (Рис. 1.10).



**Рис. 1.10.** Общая схема ответа на стимул, включающая активацию врожденной иммунной системы (рисунок адаптирован из обзора [115]).

При любом раздражителе в организме сосуществуют два различных механизма, которые развиваются не последовательно, а, скорее всего, параллельно. Один из этих механизмов — защитная система, состоящая из различных процессов, которые служат для возвращения организма в исходное состояние — гомеостаз. Другой — комплекс механизмов, адаптирующих организм к изменившимся внешним/внутренним условиям, вызывая стойкие изменения в организме. При сбое системы ответных реакций происходит формирование нового гомеостатического состояния. При этом сосуществуют два различных механизма развития аномального

постоянного состояния. Один из них связан с чрезмерной активностью адаптационных процессов при сохранении системы разрешения. Другой — сбой в работе системы разрешения заставляет организм формировать новое постоянное состояние. В этом состоянии система остается достаточно стабильной (Рис. 1.10). Первоначально считалось, что снижение воспаления представляет собой разрешение, а разрешение — пассивный процесс (Рис. 1.10, линия А), но в настоящее время считается, что воспаление и разрешение сосуществуют (Рис. 1.10, линия Б), то есть это процессы, которые запускаются сразу после стимуляции и направлены на быстрое возвращение организма в исходное состояние [108,125].

Разрешающие факторы воспаления – это вещества, которые не препятствуют передаче сигнала в воспалительном каскаде, а запускают процесс снижения экспрессии провоспалительных молекул. Эти факторы также активируют каскады, вызывающие ремоделирование в местах, поврежденных в результате воспалительного процесса. К регуляторным веществам относят белки и липидные производные: резольвины, липоксины, циклопентеноновые простагландины (например, 15d-PGJ2), фактор роста TGF $\beta$ , IL-10 и прочие молекулы, например, аннексин А1 [119,125].

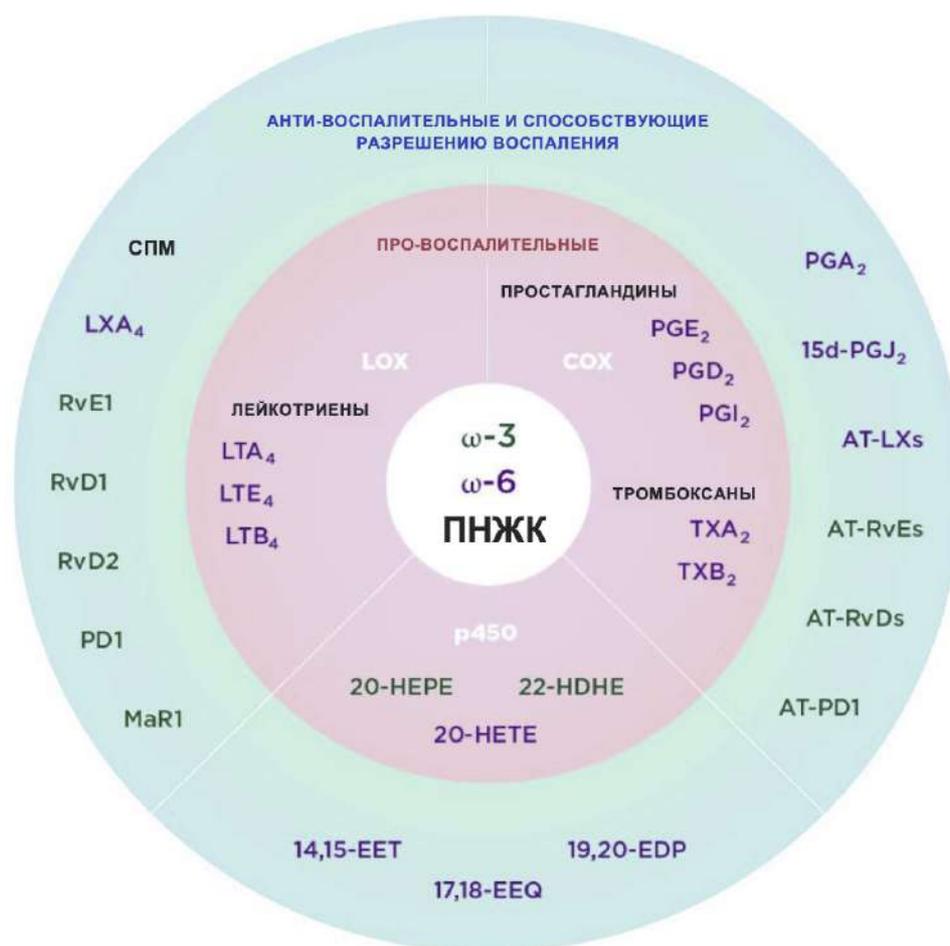
Следует отметить, что термины “провоспалительные” и “противовоспалительные”, используемые для описания отдельных объектов, не вполне корректно отражают роль отдельных молекул в воспалительном ответе, так как не учитывают тот факт, что любой компонент реакции может изменять свою функцию с течением времени. Действительно, было продемонстрировано, что исключение отдельных факторов воспаления из воспалительного ответа, таких как TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и COX-2, может усиливать воспаление и затруднять восстановление поврежденных структур [6,107,108,126]. Это говорит о том, что разрешение воспаления взаимосвязано с активацией провоспалительных процессов, и указывает на участие провоспалительных веществ в противовоспалительных этапах ответа. Таким образом, молекулярные медиаторы иммунного ответа способны выполнять провоспалительную и противовоспалительную функции в зависимости от молекулярного окружения и обладают двойной специфичностью [6,107,108,126].

### ***Оксипирины как активные участники воспалительных процессов***

Стимуляция TLR связана с одновременным высвобождением большого количества как сигнальных белков (цитокины, хемокины и т.п.), так и липидных метаболитов. Как медиаторы разрешения воспаления в

первую очередь рассматривают оксипирины, обозначая термином "специализированными медиаторами разрешения воспаления" (СПМ) [127,128]. Общая схема разделения оксипиринов по их свойствам представлена на Рис. 1.11.

Многие исследования *in vitro* и *in vivo* показали повышение уровня этих медиаторов в ответ на воспалительные стимулы и их способность изменять фазу разрешения воспаления [127,128]. Отметим, что ферменты, катализирующие продукцию оксипиринов, играют двойную роль. Например, СОХ-2 на ранних стадиях ответа продуцирует PGE<sub>2</sub> - типичный маркер воспаления, который трансформируется в PGA<sub>2</sub> - маркер из группы циклопентеновых простагландинов (Рис. 1.11). Аналогичная "двухэтапная" активность известна для путей сигнального метаболизма липидов с участием липоксигеназ (LOX) и эпоксигеназ цитохрома Р450 (p450) (Рис. 1.11).



**Рис. 1.11.** Общая схема липидных противовоспалительных и провоспалительных молекул. LOX, COX и P450 катализируют продукцию большого количества как провоспалительных липидных медиаторов (розовый сектор), так и липидных медиаторов разрешения воспаления (бирюзовый сектор). В качестве субстратов они используют ω-3 (зеленый цвет) и ω-6 (фиолетовый цвет) ПНЖК (рисунок адаптирован из обзора [115]).

Множественность функций оксипинонов, образующихся в процессе развития воспалительного ответа показывает важность анализа профиля (т.е. всей совокупности) окисленных производных ПНЖК для изучения воспалительного ответа. Важную роль играет развитие во времени ответа системы на действие провоспалительного стимула и адаптация этой системы к новым условиям, если стимул или какое-нибудь другое воздействие продолжается длительное время. Нераскрытая роль системы оксипинонов в воспалительном ответе поднимает вопрос о детальном экспериментальном изучении этой системы на клеточном уровне.

### **1.5 Клеточные модели изучения механизмов воспалительного ответа**

Изучение молекулярных механизмов воспаления позволило понять, что воспалительная реакция — это не специфическая функция клеток крови (макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты и т. д.), а фундаментальное свойство всех типов клеток. Хотя сегодня исследования по-прежнему сосредоточены в основном на иммунных клетках: нейтрофилах [129], макрофагах [130] и клетках сходного происхождения, таких как микроглия [131], “иммунокомпетентными” (способными реализовывать ответы системы врожденного иммунитета) признаются и другие типы клеток. Действительно, компоненты сигнальных путей врожденного иммунитета, такие как рецепторы (TLR4, NLR1, TNFR и др.) и различные молекулярные медиаторы (COX-2, PPAR $\gamma$ , цитокины: TNF, IL-6, IL-10 и др.), оказались функциональными в различных типах клеток: кератиноцитах,  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, кардиомиоцитах и миобластах [132–135]. Существуют стимулы, вызывающие изменения продукции цитокинов и липидов в этих клетках. Свойства этих клеток отвечать на провоспалительные стимулы существенно изменяются при различных заболеваниях и экспериментальных патологиях [133–135]. Эти изменения могут оказывать большое влияние на развитие врожденного иммунного ответа на уровне организма, что, в свою очередь, определяет значимость изучения молекулярных механизмов воспаления и его разрешения с использованием неиммунных клеток и учета молекул, которые эти клетки могут продуцировать при системных нарушениях.

### 1.5.1 Астроциты как объект изучения воспалительных ответов и адаптаций

Известно, что в ЦНС количество астроцитов сопоставимо с количеством нейронов [136]. Астроциты обеспечивают трофическую поддержку нейронов и выполняют значительное количество различных гомеостатических функций [137–140]. Они также являются важными участниками острых и хронических патологических состояний: инсульта, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, болезни Александра и т.д. [136,140].

Хотя традиционно считается, что клетки системы мононуклеарных фагоцитов (микроглия), вносят существенный вклад в развитие нейровоспаления, в настоящее время вклад астроцитов рассматривается как важный для проявления хронического воспаления, связанного с развитием неврологических заболеваний, включая нейродегенеративные и демиелинизирующие заболевания, эпилепсию, травмы, ишемию, инфекции и рак [137–139,141]. Понимание биологии астроцитов на клеточном и молекулярном уровнях является краеугольным камнем современных исследований [142].

В последнее время астроциты рассматривают как актуальную мишень для разработки новых терапевтических подходов лечения острых травм и хронических заболеваний ЦНС [137]. Нейровоспаление может проявляться на клеточном уровне, показано, что в ходе стимуляции астроциты претерпевают быстрые изменения в экспрессии генов, морфологии и функциях [137–139,143]. Функции астроцитов зависят от их контакта друг с другом [144] и другими типами клеток [145], наличия белков и состава внеклеточного матрикса [146,147] и даже концентрации глюкозы в среде [148,149].

Астроциты содержат все компоненты сигнального пути TLR и принимают активное участие в нейровоспалении [139,140]. Астроциты, как и микроглия, отвечают на воспалительные стимулы (LPS, IL-1 $\beta$ , TNF) продукцией про- и противовоспалительных цитокинов как *in vitro*, так и *in vivo* [136,141,142].

Представление о том, что клетки могут приобретать различные функциональные фенотипы в зависимости от микроокружения, в настоящее время подтверждается большим количеством данных. В случае миелоидных клеток два хорошо известных поляризованных фенотипа называются классически активированными макрофагами (M1 макрофаги) и

альтернативно активированными макрофагами (M2 макрофаги) [150]. Эти фенотипы индуцируются множеством факторов и характеризуются изменением экспрессии групп генов, объединенных схожими специализированными функциями [151]. Хотя явление поляризации может быть отнесено к определенному состоянию клеток [150,151], вопрос о том, как адаптация к окружающей среде (например, воздействие про- или противовоспалительных факторов в течение длительного времени) может изменять реакцию клеток на провоспалительные стимулы, остается открытым. Данные о связи оксипинонов с различными состояниями поляризации клеток и/или их адаптации ограничены. Было показано, что диеты с различными  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 ПНЖК могут изменять поляризацию макрофагов, модулировать воспалительный фенотип клеток [152,153]. В отличие от макрофагов и микроглии, астроциты происходят из эктодермы и имеют специфические ответы на воспалительные стимулы (как нами описано выше). В условиях воздействия, сходного с M1 и M2 поляризацией макрофагов, астроциты могут приобретать различные адаптационные состояния, которые изначально называли по аналогии A1 и A2 [143,154,155].

Противоположные роли LPS и IL-4/IL-10 в функциональной регуляции астроцитарных фенотипов были задокументированы для таких функций, как экспрессия белка GFAP [156], высвобождение нейротрофических факторов в астроцитах [157] и высвобождение глюкозы [158].

Хотя к настоящему моменту существует консенсус, что некорректно разделять астроциты на “хорошие и плохие”, нейротоксичные и нейропротективные или A1 и A2, и функциональное состояние астроцитов характеризуется множеством параметров [137], остается, вопрос о том, как адаптация к микроокружению (например, действие про- или противовоспалительных стимулов в течение длительного времени) может изменить ответы клеток на провоспалительные стимулы. Механизмы таких изменений и возможность их направленной регуляции оставались неизученными.

### **1.5.2 Пол и астроциты**

Астроциты являются наиболее активными стероидогенными клетками в мозге и чувствительны к действию различных стероидов [159]. Это поднимает вопрос о возможной зависимости процессов, происходящих с астроцитами, от пола организма, в котором они находятся. Действительно,

образование активных половых стероидов *in situ* в местах их действия из биологически неактивных предшественников в кровотоке играет важную роль в зависящих от половых стероидов тканях. Ткани, в которых происходит преобразование, обозначают как интракринные, а механизмы их действия могут быть обозначены как интракринологические (в отличие от эндокринологических) [160]. Астроциты относятся к такой интракринологической системе, поскольку эти клетки экспрессируют ферменты, участвующие в синтезе и метаболизме стероидов, и чувствительны к их действию [159,161,162]. Пол рассматривается в числе факторов, способствующих возникновению и прогрессированию заболеваний, связанных с иммунными реакциями (т.е. воспалением).

Многие неврологические и психиатрические расстройства обнаруживают четкую зависимость от пола, однако молекулярный механизм этого процесса недостаточно ясен. Хотя зависимые от пола различия в чувствительности человека к некоторым заболеваниям известны давно (см. работы [163–165]), в экспериментальных и клинических исследованиях пол испытуемых все еще редко принимается во внимание. Лишь недавно в контексте идей персонализированной медицины исследователи сосредоточились на выяснении молекулярных различий между ответами мужчин и женщин на внешние загрязнители окружающей среды, провоспалительные стимулы и лекарственные препараты [166,167].

Механизмы, лежащие в основе зависящих от пола реакций, имеют особое значение для мозга, поскольку патологии центральной и периферической нервной системы демонстрируют значительные различия в распространенности, симптоматике и/или исходе нейродегенеративных заболеваний у мужчин и женщин. Примерами являются болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, рассеянный склероз, травматические повреждения мозга, инсульт, аутизм, шизофрения, депрессия, тревожные расстройства, расстройства пищевого поведения и периферическая нейропатия [164,165,168]. Например, у женщин выше риск развития рассеянного склероза, в то время как у мужчин увеличиваются шансы заболеть болезнью Паркинсона, и они страдают в целом от более неблагоприятных исходов [169,170]. Это предъявляет дополнительные требования к разработке терапии, учета зависимости от пола пациентов. Отметим, что, например, установлены различия в чувствительности мужчин и женщин к фосфорорганическим ингибиторам холинэстеразы (препараты, используемые в ходе терапии болезни Альцгеймера), что

связывают с зависимостью функционирования холинергической системы от пола [167], т.е. эффективность лекарства зависит от пола пациента. Следовательно, для обеспечения эффективной и безопасной терапии особое внимание следует уделять зависящим от пола различиям в молекулярных механизмах внутриклеточных механизмах проведения сигналов.

При переходе от организменного уровня на клеточный сохраняется ситуация признания существования зависимости от пола, но слабой изученности механизмов. Влияние пола на базальный уровень PGE<sub>2</sub> и 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, а также в высвобождение простагландинов при стимуляции LPS были показаны для нейтрофилов человека [163]. Примечательно, что нейтрофилы мужского пола изначально имеют более высокий уровень обоих PG, и это различие сохраняется после стимуляции LPS [163]. Для микроглии есть указания на зависимость ответов на провоспалительные стимулы от пола [164,171,172]. Влияние пола на ответ астроцитов на липополисахарид (LPS) как агонист толл-подобных рецепторов типа 4 (TLR4) было продемонстрировано на уровне мРНК [172]. Хотя не вызывает сомнений, что PG вовлечены в воспалительные процессы, сопровождающие многие патологии мозга, и существует взаимосвязь стероидов и простагландинов [173], нет данных о влиянии пола на синтез простагландинов астроцитами во время клеточного ответа на воспалительные стимулы. Поэтому возникает вопрос, вносят ли астроциты, свой вклад в воспаление в зависимости от пола за счет высвобождения маркеров воспаления цитокинов и простагландинов.

Хотя активация астроцитов связана со всеми расстройствами ЦНС и поскольку многие из этих расстройств имеют половой диморфизм, на самом деле, в настоящий момент мало известно о том, зависит ли реакция астроцитов на стимулы от пола и может ли она регулироваться различными веществами.

### **1.5.3 Деградация мРНК в астроцитах (HUR, TTP)**

Воспаление на клеточном уровне представляет собой процесс, развивающийся во времени и регулируемый на уровне транскрипции и трансляции. В последнее время стало ясно, что регуляция на посттранскрипционном уровне также активно участвует в регуляции процесса воспаления.

Важным способом регуляции клеточного ответа является модуляция скорости деградации мРНК [120]. Такие исследования преимущественно

проводятся для иммунных клеток, которые отвечают за воспалительный процесс вне ЦНС. Недавно регуляция оборота мРНК была признана основным механизмом посттранскрипционного контроля экспрессии воспалительных генов. Наиболее широко признанный путь, участвующий в регуляции оборота мРНК, называется ARE-опосредованным путем [120]. ARE (AU богатый элемент), обозначает последовательность РНК, находящуюся в 3'-нетранслируемых областях мРНК, кодирующих широко известные медиаторы воспаления, такие как COX-2, TNF $\alpha$ , IL-10, MCP-1 [120,174]. Важно, что регуляция через ARE-опосредованный путь является активной и специфичной для генов, вовлеченных в воспалительные процессы [120,174]. Таким образом, эта посттранскрипционная регуляция может быть терапевтически значимой мишенью.

Среди белков, взаимодействующих с ARE и регулирующих оборот мРНК, особый интерес представляют повсеместно экспрессируемый белок Zfp36, обычно называемый тристетрапролин (ТТР), и Elav11 (чаще известный как HuR). ТТР был открыт как фактор, предотвращающий чрезмерный синтез TNF $\alpha$  путем дестабилизации его мРНК [175]. Позже было обнаружено, что количество ТТР увеличивается в ходе воспалительной реакции и выключает экспрессию провоспалительных генов, способствуя быстрому разрушению мРНК. Таким образом, ТТР является важным противовоспалительным и провоспалительным фактором (см. обзор [176]). С другой стороны, было показано, что накопление провоспалительных белков происходит на ранних стадиях воспалительного ответа, и это накопление в значительной степени поддерживается HuR [177–179]. Связываясь со своими мишенями, HuR защищает их от ТТР и направляет транскрипты к рибосомным комплексам, повышая скорость трансляции [177,180,181]. Хорошо показана регуляция ARE-связывающих белков через p38 MAPK в клетках иммунного происхождения [182,183]. Таким образом, ТТР и HuR обеспечивают негативную и позитивную посттранскрипционную регуляцию, которая имеет ключевое значение для правильного начала, развития и завершения воспалительного ответа.

Ряд доказательств указывают на то, что ARE-зависимый путь является функциональным в астроглии. Предыдущие результаты показали, что провоспалительная стимуляция изменяет стабильность ARE-содержащих мРНК, кодирующих PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  и PPAR $\gamma$ , и эта регуляция зависит от активности p38 [116,117]. Далее, экспрессия и активность HuR были обнаружены в первичных астроцитах, полученных из

мозга неонатальных крыс или мышей [184,185]. Несколько исследований также связали NuR с патологиями центральной нервной системы, такими как амиотрофический рассеянный склероз и глиомы (см. работы [186,187]). Некоторые данные показывают, что уровень мРНК TTP в астроцитах модулируется рапамицином [188]. Тем не менее, роль этих ARE-связывающих белков в ответах астроцитов на провоспалительные стимулы оставалась неясной.

#### 1.5.4 Гипергликемия и астроциты

Гипергликемия — это состояние повышенной концентрации глюкозы в жидкостях организма, оказывающее глубокое пагубное воздействие на весь организм, включая мозг. Было доказано, что высокие концентрации глюкозы вызывают нейротоксичность - серьезное осложнение длительного диабета [189]. У пациентов с диабетом наблюдаются симптомы нейровоспаления, когнитивные нарушения и проявления нейродегенеративных заболеваний [190–192]. Более того, давно известно, что гипергликемия вызывает и изменяет воспалительный ответ. Хотя уже давно было показано, что существует связь между воспалительными и метаболическими процессами в мозге [192], только недавно эти связи оказались в центре внимания исследований на уровне сигнальных путей и были предложены различные экспериментальные клеточные модели гипергликемии [148,193,194]. Как *in vivo*, так и *in vitro* модели гипергликемии или высокой глюкозы продемонстрировали ухудшение функций астроцитов на клеточном уровне, например, медленное начало, плохо обратимое снижение функциональной связи гЭП-джойсов и индукцию окислительного стресса [148,149,193].

Было показано, что изменения уровня глюкозы играют важную роль в развитии различных патологий, в том числе эпилепсии, при этом для терапии может быть эффективно применение кетогенной диеты, ограничивающей потребление углеводов (см. обзор [195]). Действительно, аномальный уровень глюкозы, либо слишком высокий, либо слишком низкий, может вызывать судороги [196]. Эпилепсия была связана с гликогеном в мозге и, следовательно, с уровнем глюкозы [197]. Повышение уровня кетоновых тел при кетозе также может быть достигнуто путем изменения уровня глюкозы в крови [195]. Наличие гликогена способствует поддержанию надлежащего баланса между возбуждающей и тормозящей нейротрансмиссией [197]. Таким образом, потребление, хранение глюкозы,

острая реакция на изменения или адаптация глюкозы при длительном применении играют важную роль в функционировании и патологии мозга. Стало очевидно, что эти процессы изменяют не только расход энергии, но и взаимоотношения между различными системами, в первую очередь метаболической и врожденной иммунной.

Помимо своей особой роли в нейровоспалении [137,139], астроциты вносят основной вклад в метаболизм глюкозы в мозге [198]. В мозге гликоген присутствует в основном в астроцитах [197,198]. Неудивительно, что эти клетки содержат три типа пероксисомных пролифератор-активируемых рецепторов (PPAR) с взаимосвязанными регуляторными процессами между ними [199]. Предполагается, что глюкоза является прямым модулятором изменений тех функций астроцитов, которые связаны с воспалительными процессами. Как *in vivo* модели гипергликемии, так и *in vitro* модели длительного культивирования клеток в среде с высоким содержанием глюкозы (HG) продемонстрировали нарушение функций астроцитов, таких как связь между клетками или индукция окислительного стресса [148,149,193]. Таким образом, была показана связь между гипергликемией и нарушениями в системе врожденного иммунитета, однако вопрос как синтез оксипиринов вовлечен в эти процессы, и как меняется синтез цитокинов в условиях гипергликемии в астроцитах остается не изученным.

### **1.5.5 Гиалуроновая кислота и 4-MU**

Гликозаминогликаны, в частности гиалуроновая кислота (ГК), широко распространены во внеклеточном матриксе (ВКМ) тканей позвоночных, выполняя различные биологические функции, включая регулирование клеточной адгезии, пролиферации клеток, диффузии питательных веществ, факторов роста и реакции на повреждение или воспаление тканей [200]. В настоящее время биология гиалуроновой кислоты привлекает особое внимание в связи с новыми взглядами на роль ВКМ во множестве заболеваний, таких как остеоартрит, фиброз, рак, наследственные заболевания и различные заболевания мозга [200].

ВКМ ЦНС составляет около 20% ткани, его состав отличается от состава внеклеточного матрикса периферических структур [201]. ГК и протеогликины представляют собой основные структурные компоненты матрикса ЦНС, где они образуют сложные сети и упорядочивают гетерогенные группы нейронов и клеток глии в высокоорганизованные функциональные единицы ЦНС [201,202]. Показано, что ГК регулирует

молекулярные процессы на тканевом уровне и играет важную роль в поддержке гомеостаза в нервной ткани и регуляции нейровоспаления [203–206].

ГК — это полимер, который состоит из повторяющихся дисахаридных цепей N-ацетил-глюкозамина и глюкуроновой кислоты. Полимеры отличаются по длине, поэтому выделяют низкомолекулярные (LMW ГК, ММ 10-500 кДа) и высокомолекулярные (HMW ГК, >500 кДа) формы [207]. Хорошо известно, что большинство свойств ГК зависят от размера. HMW ГК (> 1000 кДа) оказывает противовоспалительное действие, в то время как LMW ГК проявляет провоспалительные свойства [205,206].

Несмотря на важное физиологическое значение гиалуроновой кислоты, молекулярные механизмы её действия до сих пор плохо изучены. Исследования, связанные с ГК и активацией сигналов через TLR, затруднены в связи со способностью гиалуроновой кислоты связываться с несколькими рецепторами на поверхности клетки, ко-рецепторами и ассоциированными белками. Гиалуроновая кислота может связываться с рецептором, отвечающим за ГК-опосредованную подвижность (RHAMM), TLR2 и TLR4, с CD44, молекулой межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) и модулировать рецепторные комплексы, включающие TLR4-MD-2, CD14 и CD44 [200,208]. Общепринятым считается, что ГК оказывает свое воздействие путем блокирования индукции воспалительных сигналов через внеклеточные механизмы [200].

Сведения о роли ГК в функциях клеток ЦНС относительно скудны. Показано, что накопление ГК в демиелинизированных поражениях при рассеянном склерозе усиливает воспаление через активацию Толл-подобных рецепторов (TLR) 2 и 4 в иммунных клетках, а предотвращение этого накопления облегчает повреждение в аутоиммунной модели энцефаломиелита [206]. HMW ГК снижал выработку IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  и оксида азота в микроглиальных клетках, подвергшихся воздействию LPS [208]. Для астроцитов было описано, что LMW ГК стимулирует пролиферацию, что является основным этапом реактивации глиальных клеток [209], в то время как HMW ГК подавляет формирование глиальных рубцов [210].

Ингибирование ГК было предложено в качестве терапевтической стратегии при воспалении, аутоиммунных нарушениях и раке [211]. Одним из хорошо известных модуляторов синтеза ГК является 4-

метилумбеллиферон (4-MU), производное кумарина. 4-MU доступен в качестве безрецептурного спазмолитического препарата (торговое наименование - "Гимекромон"). Было показано, что 4-MU является специфическим ингибитором синтеза ГК на примере многочисленных клеточных линий, включая фибробласты из различных первичных тканей [212–214], кератиноциты [215], клетки меланомы и рака поджелудочной железы [216,217]. Более того, действие 4-MU было показано в некоторых экспериментах *in vivo*. Так, обработка 4-MU предотвращает повреждение легких в мышинных моделях повреждения легких, вызванного стафилококковым энтеротоксином [218] или LPS [219]. Также показано, что 4-MU оказывает защитное действие при неинфекционном воспалении, например, в модели почечной ишемии-реперфузии [220], мышинной модели атеросклероза [221], офтальмопатии Грейвса [214] или моделях гипертриглицеридемии и гипергликемии, индуцированных диетой с высоким содержанием жиров [222]. Сообщалось также, что 4-MU улучшает течение заболеваний в моделях аутоиммунных заболеваний на мышах, таких как модель артрита, вызванного коллагеном [212] и модели аутоиммунного воспаления в ЦНС [204].

Таким образом, ГК может представлять собой важный регулятор воспалительных процессов в центральной нервной ткани, тем не менее, ее влияние на воспалительный ответ, и возможность ее модулирования в астроцитах ранее не изучали.

### **1.5.6 Адаптация к низким концентрациям эндотоксинов**

В центре внимания недавних исследований находится модуляция врожденной иммунной системы при воздействии эндотоксина и последующие нарушения в реакциях врожденной иммунной системы, т.е. воспалительные реакции [124]. Это заставляет задуматься о феномене толерантности к эндотоксину. Известно, что сублетальные дозы грамотрицательных бактерий и связанных с ними эндотоксинов, в первую очередь LPS, защищают животных от смертельной инъекции эндотоксина [223]. На клеточном уровне это явление было описано как эффект толерантности, при котором воздействие низких концентраций эндотоксинов перепрограммирует клетки, в результате чего реакция на дальнейшие вызовы эндотоксина снижается. Хотя молекулярные механизмы, лежащие в основе толерантности к эндотоксинам, остаются почти не изученными [124,223], некоторые особенности описаны для

макрофагов [223]. В классических иммунных клетках повторяющиеся стимуляции LPS вызывают специфическое состояние, при котором клетки снижают ("толерантность") продукцию провоспалительных медиаторов IL-6, TNF $\alpha$ , iNOS, COX-2 и других, но стимулируют ("сенсibiliзируют") синтез противовоспалительных медиаторов IL-10 и других. Это состояние является защитным механизмом, направленным на предотвращение чрезмерного токсического повреждения от продукции цитокинов [124]. Ярким примером является циклооксигеназа 2 (COX-2), ключевой фермент биосинтеза эйкозаноидов. Продукты его ферментативной активности рассматривают и как провоспалительные медиаторы, так и как медиаторы разрешения воспаления [113,224]. Все эти данные указывают на важность характеристики синтеза простагландинов и других оксилипинов для понимания механизмов ответа астроцитов на воспалительные стимулы.

Феномен толерантности к эндотоксину в случае астроцитов практически не изучен. Данные о повторных стимуляциях различными концентрациями LPS указывают на то, что эти клетки могут изменять свою чувствительность при повторных стимуляциях [225,226]. В работах Beurel и др. «средние» концентрации LPS (100 нг/мл) добавляли к мышинным астроцитам на 24 ч, а затем стимулировали их низкой концентрацией LPS (10 нг/мл) в течение 24 ч [225,226]. Однако, выбранный авторами дизайн экспериментов отражает совершенно другую модель обработки, поскольку стимуляция клеток LPS (100 нг/мл, 24 ч) используется для создания провоспалительного фенотипа астроцитов [155], в то время как эффект толерантности к эндотоксину касается устойчивости обработанных низкой концентрацией клеток к дальнейшей атаке эндотоксином. Важным вопросом при характеристике воспалительных реакций в астроцитах является их взаимодействие с соседними клетками (микроглией, нейронами, соседними нативными астроцитами). При изучении эффектов LPS на клетки мозга основное внимание уделяется взаимодействию между астроцитами и микроглией или астроцитами и нейронами [140,155,227]. Изменение профилей оксилипинов в модели эндотоксиновой толерантности на астроцитах может дать ответ на изменение характера ответов при "остром" действии LPS на фоне хронического воспалительного состояния нервной системы.

### 1.5.7 Ядерные рецепторы PPAR и их синтетические лиганды

Привлекательна идея для модуляции профилей оксипинов использовать низкомолекулярные соединения, которые или уже являются лекарственными средствами, или тестируются в рамках клинических исследований. В этом плане интересна группа лигандов ядерных рецепторов PPAR.

Рецепторы активации пролиферации пероксисом (PPAR) — это лиганд-активируемые транскрипционные факторы, имеющие решающее значение для клеточного гомеостаза, они также могут служить маркером метаболических и воспалительных коннекторов. PPAR играют важную роль в различных метаболических процессах, включая выработку глюкозы [228].

Рецепторы PPAR представляют собой семейство транскрипционных факторов, лиганд-активируемых ядерных рецепторов. Выделяют три подтипа PPAR, каждый из которых кодируется отдельным геном (PPAR $\alpha$ , NR1C1; PPAR $\beta/\delta$ , NR1C2 и PPAR $\gamma$ , NR1C3), и способны экспрессироваться в различных типах клеток [229], включая клетки ЦНС – астроциты [139]. Участие PPAR в иммунных ответах в мозге ставит их в число перспективных мишеней для лечения различных патологий мозга, включающих нейровоспаление [199,229,230]. Было показано, что все три подтипа PPAR являются активными участниками процессов, опосредованных ответами астроцитов, и полученные данные позволяют предположить, что три типа транскрипционного фактора координированно регулируются в астроцитах, образуя функциональную триаду, в которой изменение одного компонента приводит к крупным групповым перестройкам [199]. В частности, PPAR $\gamma$  оказывает положительное, а PPAR $\alpha$  - отрицательное влияние на экспрессию и активность PPAR $\beta$  в первичных астроцитах [231].

Лиганды PPAR занимают особое положение среди веществ, способных регулировать баланс между разными оксипинами, и таким образом изменять воспалительные процессы в направлении разрешения воспаления. Для этого есть несколько причин. Связывание лиганда с PPAR способствует активации генов-мишеней, регулируя различные важные физиологические функции, такие как обмен липидов, воспаление и регенерация тканей [228,232]. Подтипы PPAR обладают высоким уровнем структурной гомологичности и имеют общий элемент ответа ДНК (PPRE) [229]. Некоторые гены, вовлеченные в метаболизм ПНЖК, включают PPRE

в своих промоторах [229]. Более того, ПНЖК и некоторые оксипирины являются эндогенными агонистами PPAR [233]. Таким образом, в активации PPAR под действием экзогенных лигандов могут участвовать многочисленные регуляторные пути с положительной и отрицательной обратной связью [233].

Понимание механизма действия этих веществ затрудняется тем фактом, что в зависимости от контекста рецепторы PPAR могут влиять на действие других транскрипционных факторов, например, NF- $\kappa$ B [229,234]. Важно отметить, что  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 ПНЖК и определенные оксипирины представляют собой естественные эндогенные агонисты рецепторов PPAR [233], в то время как некоторые синтетические агонисты PPAR являются известными лекарственными средствами [229]. PPAR $\alpha$  ориентирован на класс фибратов - гиполипидемических препаратов, а PPAR $\gamma$  - на класс тиазолидиндионов, инсулин-сенситизирующих препаратов. Использование синтетических лигандов рецепторов PPAR для регулирования воспалительных процессов требует понимания механизмов взаимодействия между эндогенными и синтетическими агонистами, которые пока недостаточно изучены.

Исследования нейропротекторной эффективности синтетических агонистов PPAR $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$  показывают, что они могут значительно снизить проявление острых и хронических патологий мозга, связанных с воспалением [235–238]. Являясь ключевым регулятором врожденной иммунной системы, связь между рецепторами PPAR и TLR была предложена в качестве потенциально терапевтической мишени в борьбе с заболеваниями [239]. Несмотря на то, что продемонстрировано взаимодействие всех трёх типов PPAR [199], обычно эффекты синтетических агонистов PPAR оцениваются отдельно (см. обзор [228]). Таким образом, актуальным является сравнение лигандов всех трех изоформ PPAR как модуляторов профиля оксипиринов и продукции цитокинов в единой клеточной модели.

\*\*\*

Таким образом, анализ литературы выявляет: 1) необходимость изучения системы оксипиринов на уровне профилей; 2) накопления данных скрининговых исследований различных заболеваний с воспалительной компонентой; 3) получения комплексных характеристик на уровне клеток ответов при активации TLR (как наиболее изученной на молекулярном уровне системе внутриклеточного ответа на активацию врожденного

иммунитета); 4) сопоставление изменений этих характеристик при различных адаптациях как клеточных моделях различных патологий; 5) определение возможностей управления системой синтеза оксипинов с помощью низкомолекулярных веществ, воздействующих на узловые точки регуляции метаболизма оксипинов и других клеточных ответов. Для оценки возможностей использования профилей оксипинов как потенциальных биомаркеров изучены различные заболевания человека (рак молочной железы, болезнь Паркинсона, болезнь Вильсона-Коновалова, первичная открытоугольная глаукома), профили оксипинов соотнесены с транскриптомными данными изменения генов метаболизма жирных кислот при различных заболеваниях. Для получения комплексных характеристик на уровне клеток нами выбраны астроциты, клетки неиммунного происхождения, являющиеся ключевыми участниками нейровоспаления, профиль оксипинов которых не был ранее изучен. Исходя из особенностей функционирования астроцитов и их возможной роли в различных патологиях мозга, выбраны модели клеточной адаптации к повышенной концентрации глюкозы (модель гипергликемии), воздействиям низких концентраций LPS (эндотоксиновая толерантность), действие цитокинов IL-4, IL-10 (терапевтическое воздействие противовоспалительных цитокинов) и полимеров гиалуроновой кислоты разной длины (моделирование изменений внеклеточного матрикса при воспалении). Экспериментальные исследования были направлены на характеристику профиля оксипинов и установлении возможностей их модуляции с помощью низкомолекулярных соединений.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Реагенты

Липополисахарид (LPS) штамм *Escherichia coli* 0111:B4 (кат.№ L2630), трилостан (кат.№ SML0141), 4-метилумбеллиферон (кат.№ M1381), анизомидин (кат.№ A5862), Bay 11-7085 (кат.№ B5556) от Sigma-Aldrich, США; Poly I:C (PIC) (кат.№ tlrl-pic, InvivoGen, США или кат.№ B5551, Apexbio, США); розиглитазон (кат.№ R2408, Sigma-Aldrich, США или кат.№ 71740 Cayman Chemical, Германия); актиномицин D (кат.№ A4262), антимицин A (кат.№ A8674), фенформин (кат.№ P7045) от Sigma-Aldrich, Германия; флагеллин (кат.№ FLA-BS), пептидогликан (кат.№ tlrl-pgnbs) и CLI-095 (кат.№ tlrl-cli95) были получены от Invivogen, США; SB203580 (кат.№ EI-286-0001), SP600125 (кат.№ EI-282-0001) были заказаны у Alexis Biochemicals, Германия; циклогексимид (кат.№ 239763) был приобретен у Calbiochem, Германия, ML355 (кат.№ 18537), zileuton (кат.№ 10006967), циглитазон (кат.№ 71730), PGD2 (кат.№ 12010), 15d-PGJ2 (кат.№ 18570), PGA2 (кат.№ 10210), PGE2 (кат.№ 14010), PGF2a (кат.№ 16010), метформин (кат.№ 13118), GW6471 (кат.№ 11697), GW9662 (кат.№ 70785), GSK0660 (кат.№ 15272), GW501516 (кат.№ 10004272), фенофибрат (кат.№ 10005368), ротенон (кат.№ 13995), олигомицин (кат.№ 11342) были получены от (Cayman Chemical, США); интерлейкин-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) (кат.№ 400-01A), фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (кат.№ 400-14), IL-10 (кат.№ 400-19) были получены от RnD Systems, Гамбург, Германия; A-769662 (кат.№ 3336) был получено от Tocris, США; высокомолекулярная гиалуроновая кислота (1,01-1,8 MDa, HMW) (гиалуронат натрия кат.№ HA15M-1) и низкомолекулярная гиалуроновая кислота (41-65 KDa, LMW) (гиалуронат натрия кат.№ HA40K-1) были получены от Lifescore biomedical, США.

Стандарты оксилипинов были следующими: 6- keto-PGF1 $\alpha$ -d4 (кат.№ 315210), TXB2-d4 (кат.№ 319030), PGF2 $\alpha$ -d4 (кат.№ 316010), PGE2-d4 (кат.№ 314010), PGD2-d4 (кат.№ 312010), LT C4-d5 (кат.№ 10006198), LTB4-d4 (кат.№ 320110), 5(S)-HETE-d8 (кат.№ 334230), 12(S)-HETE-d8 (кат.№ 334570), 15(S)-HETE-d8 (кат.№ 334720), олеилэтаноламид-d4 (кат.№ 9000552), EPA-d5 (кат.№ 10005056), DHA-d5 (кат.№ 10005057) и AA-d8 (кат.№ 390010) (Cayman Chemical, США). Картриджи Oasis® PRIME HLB (60 мг, 3 куб. см, кат.№ 186008056) были получены от компании Waters, Германия. Стрептомицин-пенициллин (кат.№ A063), трипсин (кат.№ P037), EDTA, фетальная бычья сыворотка (кат.№ BS-110/500) и культуральная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (кат.№ c425) были

получены от PanEco (Москва, Россия), Культуральная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1 г/л глюкозы кат.№ 21885-025) и Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (4,5 г/л глюкозы кат.№ 41966-029) были получены от Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США, субстрат для вестерн-блоттинга ECL (Thermo Fisher Scientific, кат. по 32209, Waltham, MA, USA). Список антител, использующийся в работе представлен в Таблице 2.1.

**Таблица 2.1.** Список антител, использовавшихся в работе.

Антиген	Производитель	Каталожный номер	Методика
COX-2	Cell Signaling Technology, США	D5H5, 12282	WB
phospho-p38	Cell Signaling Technology, США	4511	WB
p38	Cell Signaling Technology, США	9212	WB
p-JNK	Cell Signaling Technology, США	sc-12882	WB
JNK	Cell Signaling Technology, США	sc-571	WB
β-актин	Santa Cruz Biotechnology, США	sc-47778	WB
ламин В1	Abcam, Великобритания	ab16048	WB
ТТР	Cell Signaling Technology, США	71632	WB
HuR	Cell Signaling Technology, США	12582	WB
HuR (1:500)	Millipore, США		IF
GFAP (1:500)	Millipore, США		IF
изолектин В4	Millipore, США		IF
вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 488	Abcam, США	ab150077	IF
вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 488	Abcam, США, Jackson ImmunoResearch, Великобритания	ab150116, 111-545-003	IF
вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 594	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Великобритания	115-585-062	IF
IgG-HRP (анти-кролик)	SCBT и CST		WB
IgG-HRP (анти-мышинные)	SCBT и CST		WB
вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (анти-козьи)	SCBT и CST		WB
COX-1	Cell Signaling Technology, США	4841	WB
фосфо-p38	Cell Signaling Technology, США	9211	WB
SAPK/JNK	Cell Signaling Technology, США	9252	WB
фосфо-SAPK/JNK	Cell Signaling Technology, США	4668	WB
p44/42 (ERK1/2)	Cell Signaling Technology, США	9102	WB
фосфо-p44/42 (ERK1/2)	Cell Signaling Technology, США	9106	WB
NF-κB p65	Cell Signaling Technology, США	8242	WB
фосфо-NF-κB p65	Cell Signaling Technology, США	3033	WB
β-актин	Cell Signaling Technology, США	8H10D10	WB

β-тубулин	Cell Signaling Technology, США Millipore, США	86298 05-661	WB
GFAP	DAKO Agilent, США	M0761	WB
p-ERK1/2	Santa Cruz Biotechnology, США	sc-136521	WB
ERK1/2	Santa Cruz Biotechnology, США	sc-135900	WB
IgG-HRP	Cell Signaling Technology, США	7076	WB
GFAP	Merck, Германия	AB5804	IF
OX-42	Merck, Германия	CBL1512	IF

WB - иммунохимический анализ белков на мембране, IF - иммунофлуоресцентный анализ.

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Первичная культура клеток астроцитов.

Первичные культуры астроцитов были получены от новорожденных крысят линии Wistar, обоих полов если не указано обратное. Для получения астроцитов в экспериментах с отдельным выделением из самцов и самок проводили генотипирование с использованием материала от каждого из щенков (Материалы и методы, раздел 2.2.2). Состав процедуры: мозг после декапитации промывали в ледяном буферном растворе Puck's (в мМ: 137,0 NaCl, 5,4 KCl, 0,2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,17 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,0 глюкоза, 58,4 сахараза, pH 7,4) очищали его от сосудистых оболочек и измельчали посредством последовательного перетирания сквозь сита с размером ячеек 250 и 136 мкм, промывали в буфере Puck's осаждали посредством центрифугирования при 1000 об/мин, рассаживали в культуральные флаконы площадью 75 см<sup>2</sup> с плотностью  $6 \times 10^5$  клеток на мл и культивировали в среде DMEM, содержащей глюкозу (1 г/литр) или DMEM, содержащей глюкозу (4,5 г/литр), 10% бычьей сыворотки (FBS), стрептомицин (50 ед/мл) и пенициллин (50 мкг/мл), при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Heraeus BBD 6220, США) при 37°С и 5% CO<sub>2</sub>. Спустя 5 суток после выделения культуры отряхивали для удаления микроглии (орбитальный шейкер Biosan OS 20, 180 rpm в течение 90 мин) и меняли среду на свежую среду того же состава. Далее клетки культивировали в течение еще пяти суток со сменой среды каждые двое суток. После получения монослоя культуры клетки трипсинизировали и рассаживали на шестилуночные культуральные планшеты в количестве 750 тыс. клеток на лунку, эксперимент проводили спустя 2 дня. За 2 ч до начала экспериментов с инкубацией клеткам производили замену среды на свежую. В полученных культурах более 95% клеток были положительны на маркер астроцитов - глиальный фибриллярный кислый белок, и только <2% были положительны

на маркер, специфичный для микроглии. Исследования были одобрены властями земли Саксония-Анхальт, Германия, и проводились в соответствии с институциональным руководством по использованию животных или одобрены комиссией по биоэтике НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ с учетом минимизации количества используемых животных. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

### **2.2.2 Генотипирование крыс**

Выделение ДНК из хвостов для генотипирования проводили в соответствии с протоколом, описанным в литературе [55]. Вкратце, последние 2 мм хвостов помещали в 75 мкл щелочного буфера для лизиса (NaOH 25 мМ, Na<sub>2</sub>-ЭДТА 0,2 мМ) в пробирке для ПЦР. Затем образцы нагревали при 95 °С в течение 20 мин. После нагревания образцы охлаждали при 4 °С, и к каждому образцу добавляли 75 мкл буфера для нейтрализации (Tris-HCl 40 мМ). Концентрацию ДНК измеряли с помощью IMPLEN NanoPhotometr N60. Затем 5 мкл конечного препарата использовали для каждой реакции ПЦР. ПЦР-реакции проводили на приборе DTLite 4 (ДНК-технология, Москва, Россия) с использованием HS-PCR Mix (Evrogen, Москва, Россия). Последовательности ПЦР праймеров, использованных в настоящем исследовании, были следующими: смысловой 5'-CTGAAGCTTTTGGCTTTTGAG-3'; антисмысловой 5'-CCACTGCCAAATTCTTTTGG-3'. Определение пола проводилось с помощью 2% агарозного электрофореза продуктов ПЦР.

### **2.2.3 Первичные культуры клеток коры нейронов крысы**

Для получения культур полушария головного мозга выделяли из 18-дневных эмбрионов крыс Вистар, промывали в сбалансированном солевом растворе Хенкса без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (PanEco), очищали от кровеносных сосудов, препарировали в растворе трипсина ЭДТА (PanEco), затем инкубировали в растворе трипсина ЭДТА в течение 20 мин при 37 °С. После этого трипсин инактивировали 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) (PanEco) в растворе Хенкса. Препарат дважды промывали раствором Хенкса и суспендировали в минимальной основной среде (MEM) (PanEco) с 10% FBS и 100 U/mL пенициллина-стрептомицина (PanEco). Полученную суспензию центрифугировали в течение 2 мин при 400 g. Затем клетки

ресуспендировали в MEM, содержащей вышеуказанные добавки, и рассевали в 6- (SPL Life Sciences, ROK, Naechon-Myeon, Pocheon-si, Korea) и 96-луночные (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) планшеты, предварительно обработанные поли-орнитином (Sigma, St. Louis, MO, USA) с плотностью  $1,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>. Пластины предварительно обрабатывали раствором 0,1 мг/мл поли-орнитина в течение нескольких часов, затем промывали один раз стерильной водой. Культуры выдерживали в инкубаторе (SHEL LAB, Cornelius, OR, США) при 37 °C, 90% влажности, 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч, затем среду заменяли на Neurobasal Medium (NBM) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, 168 Third Avenue, Waltham, MA, 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.

#### **2.2.4 Вестерн-блот анализ**

Астроциты лизировали в модифицированном буфере для радиоиммунопреципитации (RIPA) (50 mM Трис, pH 7,4, 1% NP-40 Sigma Chemicals, 0,25% Na-дезоксихолат, 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF) и коктейле ингибиторов протеаз и фосфотаз (Roche Molecular Biochemicals, Мангейм, Германия). Концентрацию белка определяли стандартным методом Брэдфорда с помощью набора DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, США). Образцы, содержащие 20 мкг белка в обычном буфере Лаеммли, загружали на каждую полосу 10% додецилсульфат натрия-полиакриламидного геля и подвергали стандартному SDS-PAGE. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с порами 0,2 мкм. Мембраны блокировали в 10% растворе Rotiblock (Roth, Nürnberg, Германия) или в буфере TBS с 5% обезжиренного молока и 0,05% Tween 20 в течение 1 ч. Затем мембраны обрабатывали первичными антителами в разведении (1:1000 или 1:2000) при 4 °C в течение ночи. Вторичные видоспецифические антитела наносили в концентрации 1:10 000 на 1 ч при комнатной температуре. Белковые полосы визуализировали с помощью хемилюминесцентного субстрата SuperSignal™ West Pico (Thermo Scientific, США) или Pierce ECL Plus (Thermo Scientific, США) или SuperSignal™ West Femta (Thermo Scientific, США) в зависимости от количества детектируемого белка в пробе. Мембраны повторно окрашивали антителом против β-тубулина (1:10000) для контроля загрузки белка.

Денситометрию проводили в трех разных экспериментах. В случае необходимости stripping мембран использовался Mild stripping buffer (Abcam, UK) по протоколу разработчика. Интенсивность полос измеряли с помощью калиброванного денситометра GS-800 или с помощью системы визуализации Odyssey (Licor, Германия) или с помощью системы ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad), а интенсивность люминесценции рассчитывали с помощью программного обеспечения и программного обеспечения Quantity One (Bio-Rad, США) Image Lab 3.0 (Bio-Rad, США) или с помощью программного обеспечения ImageJ (1.51 c) (NIH, США) и нормировали на интенсивность соответствующих полос, полученных для  $\beta$ -тубулина.

### **2.2.5 Иммунофлуоресцентный анализ**

Астроциты высевали на чашки Петри со стеклянным дном в количестве 105 клеток/стекло и давали прикрепиться в течение 12 ч. После смены среды клетки оставляли еще на 24 ч и использовали в экспериментах, как описано в другом месте. Слайды с клетками, фиксированными в 3% параформальдегиде, забуференном PBS, обрабатывали буфером, содержащим Triton X-100, блокировали FBS и затем инкубировали в течение ночи с первичными антителами против NuR (1:300) или OX-42 (1:100) или изолектин В4 (1:200) или GFAP (1:2000). Вторичные антитела Alexa, от козы, использовались в следующих разведениях: Alexa 488 анти-кролик 1:500 и Alexa 633 анти-курица 1:200. Отрицательный контроль включал инкубацию астроцитов только с вторичными антителами. В отрицательном контроле значительного окрашивания не наблюдалось. Изображения были получены с помощью Axiovert 100M (Zeiss, Германия), оснащенного программным обеспечением для конфокальной микроскопии LSM 510. Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ (1.51s), см. сайт <https://imagej.nih.gov/ij/docs/faq.html> (NIH, США).

### **2.2.6 ПЦР с детекцией в реальном времени**

Тотальную РНК выделяли с помощью PowerLyzer RNA Isolation (MO BIO, США) или с помощью набора для выделения общей РНК RNeasy (Qiagen, Германия) или с помощью набора RNeasy Pure (Qiagen, Германия) или с помощью набора GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколами производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически с помощью

спектрофотометра NanoPhotometer N («Implen», США). Синтез первой цепи проводили с помощью MMLV RT kit («Евроген», Россия) или с помощью набора First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) или с помощью набора для синтеза кДНК iScript (Bio-Rad, Германия) или с помощью набора Maxima First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, США). Реакцию проводили в соответствии с инструкциями производителя с использованием праймеров олиго(dT). ПЦР в реальном времени проводили на iCycler (Bio-Rad, США) с использованием SYBR green PCR Master Mix (Bio-Rad, США) или на системе CFX96 компании Bio-Rad с использованием iQ SYBR™ green (Bio-Rad, США) или с использованием 5-кратной смеси PCR-HS-SYBR (Evrogen, Россия) и амплификатора DTLite 4 (ДНК-Технология, Россия), как описано производителем. Специфичность амплификации продуктов ПЦР была подтверждена анализом кривой плавления и электрофорезом в агарозном геле. Последовательности праймеров представлены в Таблице 2.2. Температура отжига праймеров - 57°C. В одну реакционную смесь объемом 25 мкл брали кДНК, приготовленную из 70 нг РНК в реакции обратной транскрипции. Относительный уровень мРНК рассчитывали по методу ΔCT. В качестве конститутивного гена для нормализации использовали ген β-актина.

**Таблица 2.2.** Последовательности олигонуклеотидных праймеров, используемых для ПЦР в режиме реального времени

Ген	Последовательность праймера, 5'-3'	
	forward	reverse
β-актин	TCATCACTATCGGCAATGAGCGGT	ACAGCACTGTGTTGGCATAGAGGT
HuR	AACCCCCGGGTTCTCCGAG	CCGAGGAAGCATTGCCGGGGGG3
TTP	CAGCCTGACTTCTGCGAACCGA	TGGCTCATCGACATAAGGCTCTCGT
COX-2	TGTACAAGCAGTGGCAAAGG	TAGCATCTGGACGAGGCTTT
IL-10	CCCAGAGAAATCAAGGAGCATTTG	TCATTCTTCACCTGCTCCAC
IL-6	CTGGTCTTCTGGAGTCCGT	TGGTCTTGGTCCTTAGCCAC
iNOS	CCACAATAGTACAATACTACTTGG	ACGAGGTGTTTCAGCGTGCTCCACG
TNFα	CAAGGAGGAGAAGTTCCCAA	TGATCTGAGTGTGAGGGTCTG
IL-10	CCCAGAAATCAAGGAGCATTTG	TCATTCTTCACCTGCTCCAC
C3	AAGCCCAACACCAGCTACATC	ACTTCTGATCCTGGCATTCTTCT
IL-1β	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGGTCCATGGTGAAGTCAAC
has1	AGGTGCTGTTGGAGGAGATGTGA	AAGCTCGCTCCACATTGAAGGCTA
has2	CCAATGCAGTTTCGGTGATG	ACTTGGACCGAGCCGTGTAT
has3	CCTCATCGCCACAGTCATACAA	CCACCAGCTGCACCGTTAGT
hyal1	TCGGACCSTTTATCCTGAAC	TTCTTACACCACTCTCCACTC

hyal2	TCAGTGACGCTTCAAGTATGGA	GACTGAGGTGCAAGAAGGTA CTG
$\beta$ -actin	AGATGACCCAGATCATGTTTGAG	GGCATA CAGGGACAACACAG
C3	AAGCCCAACACCAGCTACATC	ACTTCTGATCCTGGCATTCTTCT
GBP2	CTCGACTGTGCATCAGGAAA	TAGGTCTGCACCAGGCTCT
Cxcl10	TGCAAGTCTATCCTGTCCGC	ACGGAGCTCTTTTGTACCTTC
Mrc1	CAACCAAAGCTGACCAAAGGAAG	TTGCCCATGAGATCTTTCGTGT
Fizz1	CAACAGGATGAAGACTGCAACCT	GGGACCATCAGCTAAAGAAG
Ym1	TTGCTGGGATGCGGAATAA	AGCTCAGTGTTCTGTCTTTC
PPAR $\alpha$	TGCGGGGACTACCAGTACTTAG	CGACACTCGATGTTCACTGC
PPAR $\beta$	CTCCTGCTCACTGACAGATG	TCTCCTCCTGTGGCTGTTC
PPAR $\gamma$	CCTGAAGCTCCAAGAATACC	GATGCTTTATCCCCACAGAC

### 2.2.7 Экстракция оксипинов из клеточного супернатанта

После проведения клеточных экспериментов проводился отбор 980 мл клеточного супернатанта, и далее к аликвоте добавляли 10 мкл 0,5% раствора ВНТ (бутилгидрокситолуола) ВНТ (финальная концентрация в пробе 0,005%), далее образец смешивали с 10 мкл смеси дейтерированных масспектрометрических стандартов (2нг каждого стандарта в премиксе) и центрифугировали (12000×g, 3 мин). Непосредственно перед выделением к образцам добавлялся 1 мл охлажденного метанола, после чего образец перемешивали на вортексе и далее центрифугировали 2 мин 12000 об./мин. на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия). Далее супернатант смешивали с 6 мл 0,1% уксусной кислоты и наносили на картридж для твердофазной экстракции Oasis®PRIME HLB (60 мг, 3cc) или Oasis HLB ((60 мг, 3cc)). В случае картриджей Oasis HLB предварительно перед нанесением образцов картридж промывали 2 мл 15% метанола, содержащего 0,1% муравьиной кислоты. После нанесения образцов на картридж образцы промывали 2 мл 15% метанола, содержащего 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 под мягким током азота. Далее образцы растворялись в 100 мкл безводного метанола, переносились в виалы для ВЭЖХ и хранили при температуре -80 °C до дальнейшего анализа концентрации оксипинов.

### 2.2.8 ВЭЖХ-МС/МС анализ профиля оксипинов

Липидные медиаторы анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС серии 8040 (Shimadzu, Япония) оборудованного системой ультра-ВЭЖХ Nexera. UPLC, 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. Термостратирование образцов, и температура колонки были установлены на 5°C и 40°C, 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). Масс-спектрометрическое обнаружение осуществлялось с помощью источника ионизации электрораспылением, работающего в негативном режиме с использованием азота в качестве распыляющего газа. Количественное определение проводилось в режиме мониторинга множественных реакций, и МС работал с единичным разрешением по массе для ионов предшественников и продуктов. 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, Киото, Япония). Параметры масс-спектрометрии были заданы: поток распыляющего газа, 3 л/мин; осушающий газ, 10 л/мин; температура теплового блока, 400°C; температура линии десольватации, 250°C; давление диссоциации, вызванной столкновениями, 230 кПа. Перед проведением анализа метод определения оксипинонов в плазме крови был валидирован в соответствии с рекомендациями Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) [240]. Был приготовлен исходный раствор, содержащий 2 нг каждого из 15 дейтерированных стандартов оксипинонов. Калибровочные образцы (1,4, 1, 0,4, 0,2 и 0 нг/инъекция) были получены путем дальнейшего разведения исходного раствора, содержащего такой же общий объем плазмы/клеточного супернатанта. Для каждого стандарта определяли внутрисуточные, междусуточные воспроизводимость и относительное стандартное отклонение (RSD, %). Точность измерялась с использованием приготовленных стандартов для 3 диапазонов концентраций: 0,2-0,8 нг/инъекция, 0,9-1,3 нг/инъекция и 1,4-2 нг/инъекция. Предел обнаружения (LOD) определялся как отношение сигнал/шум = 3, а предел количественного определения (LOQ) - как отношение сигнал/шум =

3. Отношение сигнал/шум рассчитывалось как стандартная ошибка регрессии/наклона.

### **2.2.9 Оценка пролиферации и жизнеспособности клеток и синхронизация клеток**

Клетки промывали раствором Хэнкса, отделяли от культурального пластика с помощью трипсина/EGTA (0,05%/0,02% w/v). Затем добавляли DMEM, содержащую 10% (v/v) FCS, для блокировки трипсинизации. Далее клетки центрифугировали в течение 5 мин при 500g, ресуспендировали в DMEM/FCS и высевали на 96-луночных планшетах при начальной плотности  $1,5 \times 10^5$  клеток/мл, по 200 мл на лунку. После 24-часовой инкубации клетки подвергались 48-часовой сывороточной депривации с использованием DMEM без FCS. В нулевой момент времени возвращали среду, содержащую 10% FCS, что приводило к синхронному возвращению клеток G0 в фазу G1 клеточного цикла. Синтез ДНК в пролиферирующих клетках оценивали путем измерения включения бромдезоксипуридина (BrdU) в течение 24 ч или 3 ч с помощью коммерческого хемилюминесцентного набора Cell Proliferation ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Световое излучение образцов измеряли при 450 нм с помощью микропланшетного люминометра (Tecan- Spectrafluor Plus).

### **2.2.10 Культура клеток макрофагов**

Клетки мышинных макрофагов RAW264.7 были получены от ATCC (ATCC TIB-71™, Manassas, VA, USA) и культивировались в модифицированной среде Дульбекко (DMEM, cat.no FG 0435, Biochrom, Berlin, Germany), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки выращивали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Клетки доводили до концентрации  $1 \times 10^6$ /мл в полной среде для использования во всех клеточных анализах.

### **2.2.11 Определение скорости деградации мРНК.**

Для определения скорости деградации РНК уровни исследуемых РНК оценивались в присутствии ингибитора транскрипции актиномицина D. После добавления актиномицина D меняется только уровень уже существующей мРНК, что позволяет установить период полураспада

мРНК. Клетки обрабатывались LPS (100 нг/мл) в течение 1 часа, после чего транскрипция РНК *de novo* блокировалась добавлением актиномицина D (5 мкг/мл). Аналогичная обработка проводилась на клетках без стимуляции LPS. Уровень мРНК в необработанных клетках перед добавлением актиномицина D был принят за 100%. В клетках, обработанных LPS, уровень мРНК принимался за 100% через 1 час обработки LPS перед добавлением актиномицина D.

#### **2.2.12 МТТ-анализ**

Жизнеспособность клеточных культур оценивали в 96-луночных плоскодонных планшетах с использованием МТТ-теста. Метод основан на способности живых клеток восстанавливать желтый 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ) до синего формазана. Кристаллы формазана, не растворимые в воде растворяли в 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксид, AppliChem, Maryland Heights, MO, USA). Оптическую плотность образцов измеряли при длине волны 570 и 660 нм с помощью планшетного спектрофотометра Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, США). Значение поглощения при длине волны 660 нм затем вычитали из значения поглощения при длине волны 570 нм.

#### **2.2.13 Иммуноферментный анализ (ИФА)**

В работе использовались следующие наборы для ИФА: TNF $\alpha$  (кат.№ KRC3012) и IL-10 (кат.№ BMS629) (InvivoGen, США). TNF $\alpha$  (кат.№ 558535), IL-10 (кат.№ 555134) и IL-6 (кат.№ 550319) от BD Biosciences, США, набор для детекции гиалуроновой кислоты (кат.№ DHYAL0) от R&D Systems, США. PGE<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  и IL-10 (Thermo Fisher Scientific). Анализ проводился в соответствии с инструкциями производителя.

#### **2.2.14 Анализ экспрессии генов и анализ SNP**

Для быстрого количественного анализа транскриптов в данных, полученных при секвенировании РНК, использовалось программное обеспечение Salmon (версия 1.0.0). Исходные данные были получены из архива Sequence Read Archive (SRA) с помощью инструментария SRA. В качестве эталона использовался транскрипт генома человека версии GRCh38. С помощью R tximport суммировались уровни экспрессии генов. Для дифференциального анализа генов и транскриптов использовались DESeq2 и StageR. Дифференциально экспрессированные гены (ДЭГ) определяли с использованием стандартных критериев, а именно р-значения

(скорректированного с помощью процедуры Беньямина-Хохберга)  $< 0,05$  и разницы в кратности изменения более чем в два раза. Визуализация результатов проводилась с помощью пакета EnchancedVolcano. Затем проводилась фильтрация полученных ростеров, опираясь на список целевых генов. Систематический поиск датасетов проводился с использованием разработанного нами ранее инструмента ARGEO [241]. Гены, связанные с заболеваниями и соответствующими SNP анализировались с использованием базы данных DisGeNET [242].

## **2.2.15 Метод случайного леса для анализа транскрипционных профилей**

### ***2.1.15.1. Источник данных***

Транскриптомные профили образцов рака молочной железы и нормальных прилегающих тканей использовались для обучения и проверки модели случайного леса. Для бинарной классификации образцов рака молочной железы и здоровых тканей были получены четыре набора данных из базы данных Gene Expression Omnibus (GEO) (GSE65216, GSE29044, GSE1078 и GSE62944) (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (по состоянию на 18 февраля 2022 г.)). Набор данных GSE62944 представляет данные TCGA из базы данных TCGA (Атлас генома рака) (Broad GDAC, <https://gdac.broadinstitute.org/> (по состоянию на 18 февраля 2022 г.)). В качестве обучающей выборки использовались три набора данных (GSE65216, GSE29044 и GSE1078), которые включали 221 опухолевый и 185 образцов здоровой ткани. Данные TCGA использовались в качестве тестовой выборки и состояли из 1082 опухолевых и 113 образцов здоровой ткани. Для оценки возможности выявления молекулярного подтипа рака молочной железы по изменениям в экспрессии генов метаболизма ПНЖК для пяти наборов данных (GSE81538, GSE25066, GSE31448, GSE96058 и GSE21653) была извлечена аннотированная информация об их молекулярных подтипах из базы данных GEO (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (по состоянию на 18 февраля 2022 г.))

### ***2.2.15.2. Модель случайного леса***

Модель случайного леса Random Forest [243] была построена с использованием пакета R Random Forest [244]. При построении классификатора случайного леса можно выделить три основных этапа:

1. Из входных данных размером  $N * M$  ( $N$  - количество образцов,  $M$  - количество признаков) случайным образом выбираются  $k$  подвыборок с возвращением.;
2. Для каждой подвыборки строится решающее дерево;
3. Финальное решение принимается большинством голосов построенных деревьев (для задач классификации) или их усреднением (для задач регрессии).

Каждое дерево решений включает в себя ряд сравнений значений признаков и порога, который устанавливается во время обучения модели. Этот факт ограничивает использование случайного леса для данных об экспрессии генов. Чтобы преодолеть это ограничение, гены ранжировали в выборке как в обучающем, так и в тестовом наборах.

После проведения процедуры ранжирования были выбраны гены из списка ПНЖК, представленного как в обучающей, так и тестовой выборке (отдельно для бинарной и мультиклассовой классификации). Для сокращения количества изучаемых генов на обучающих выборках с извлеченными генами ПНЖК (185 генов для прогнозирования опухолей и нормальных образцов; 155 генов для прогнозирования молекулярных подтипов) был использован алгоритм Боруты (пакет Boruta R). Окончательные классификаторы были построены на генах, обозначенных Борутой как наиболее важные для работы случайного леса (33 для сравнения опухолевых и нормальных образцов; 46 генов для сравнения молекулярных подтипов), при этом количество деревьев составило 450. Код описанного анализа можно найти в репозитории GitHub: [https://github.com/gurylevamv/PUFA\\_rRF](https://github.com/gurylevamv/PUFA_rRF) (по состоянию на 21 сентября 2022 г.).

### ***2.2.15.3. Алгоритм выбора функций Боруты***

Алгоритм выбора признаков Борута использовался для идентификации генов, экспрессия которых важна для различения биологических условий. Основная идея этого алгоритма состоит в том, чтобы сравнить важность признаков с их рандомизированной версией. Рандомизированные признаки называются тенями. Технически теневой признак получается из исходного путем перетасовки значений в копии набора данных. Затем объединяются два набора данных: исходные признаки и набор с теневыми признаками. Далее на объединенном наборе данных строится классификатор случайного леса, для которого рассчитывается важность всех признаков. Если важность

исходного признака превышает максимальную важность теневого признака, то он получает 1 балл. Эти операции повторяются заранее заданное количество раз. В результате получаем суммы баллов по каждому признаку после  $N$  испытаний. В нулевой модели эти испытания распределены биномиально. Если оценка признака превышает 99,5% квантиль распределения, признак считается важным. В работе использовали алгоритм Борута реализованный в пакете R Boruta (по состоянию на 18 февраля 2022 г.) [245]. Алгоритм Боруты был применен к списку генов ПНЖК как для бинарной (опухоль против контроля), так и для многоклассовой классификации. Для большей уверенности в выбранных признаках алгоритм Боруты с параметром количества циклов по умолчанию  $N$  (250) запускался 100 раз. Гены, выбранные в 90% или более экспериментах, в конечном итоге были признаны важными. При бинарном сравнении выборок были выбраны 33 гена как важные для классификации, в случае разделения молекулярных подтипов были выбраны 46 генов метаболизма ПНЖК.

#### **2.2.15.4. Последовательный выбор признаков для минимизации набора генов**

Последовательный выбор признаков (SFS) [246] был реализован для минимизации набора генов, демонстрирующего наивысшую эффективность классификации. Следовательно, этот алгоритм выбирает признак, который максимизирует критериальную функцию качества из пространства всех признаков. Кроме того использовали плавающее расширение метода SFS (SFFS), которое позволяет нам удалять признаки, если этот шаг улучшит прогноз. SFFS использовалась из пакета Python mlxtend (по состоянию на 18 февраля 2022 г.).

#### **2.2.15.5. Значения SHAP для идентификации наиболее важных генов ПНЖК**

SHAP относится к аддитивным объяснениям Шепли, которые представляют собой подход, позволяющий найти объяснение выходным данным моделей машинного обучения. Он рассчитывает важность каждого признака в каждом отдельном образце. Применение значения SHAP к построенным классификаторам повышает их прозрачность, и более того, при многоклассовой классификации это позволяет определить важность признака для того или иного класса. Расчеты SHAP выполнялись с

помощью пакета SHAP на Python (<https://shap.readthedocs.io/> (по состоянию на 18 февраля 2022 г.)).

### **2.2.15.6. Анализ обогащения**

Функциональная аннотация GO (биологический процесс, молекулярная функция), а также анализ обогащения пути KEGG для обнаруженных важных генов ПНЖК были выполнены с помощью инструмента Enrichr, реализованного в Python в пакете GSEAPy (<https://gseapy.readthedocs.io/en/latest/introduction.html#gseapy-enrichr-module> (по состоянию на 18 февраля 2022 г.)). Фоновые наборы генов были заданы в виде списков генов ПНЖК, представленных как в обучающей, так и в тестовой когортах отдельно для классификации опухолевых и здоровых образцов, а также для классификации молекулярных подтипов. Категории со скорректированным значением  $p < 0,001$  считались статистически значимыми.

### **2.2.16 Статистический анализ клеточных экспериментов**

Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение (СО). Нормальность распределения данных проверялась с помощью теста Шапиро–Уилка. Статистическая значимость данных проверялась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с последующим post hoc тестом Бонферрони. Уровень значимости  $p < 0,05$ . Данные метаболомики обрабатывались с помощью пакета mixOmics (R-версия 6.1.1). Классификация данных проводилась с помощью метода частичного дискриминантного анализа на основе метода наименьших квадратов (PLS-DA). Качество моделей с разным числом компонент оценивалась с помощью перекрестной валидации. В каждом раунде перекрестной валидации обучающая выборка включала большее подмножество данных, а проверка проводилась на случайно выбранной выборке. Эффективность моделей сравнивалась по общему коэффициенту ошибок и площади под кривой (AUC). После построения модели PLS-DA с тремя компонентами, относительная значимость каждого метаболита оценивалась с использованием параметра, называемого переменной важностью в проекции (VIP). В соответствии с инициативой стандарта метаболомики (уровень MSI = 1) отсечка для оценки VIP была принята равной 1,5.

## **2.3 Эксперименты с участием людей**

### **2.3.1 Рак молочной железы**

Набор пациентов и здоровых контролей (женщины в возрасте 24-82 лет) проводился в период с июля 2020 года по сентябрь 2021 года. Критерии исключения пациентов: (1) острое инфекционное состояние, (2) диабет, (3) аутоиммунные заболевания. В исследовании приняли участие 169 пациентов с РМЖ и 152 пациента в контрольной группе. Забор образцов крови проводили утром на голодный желудок. Полученную плазму крови аликвотировали и хранили при -80 °С для дальнейшего анализа. Исследование было рассмотрено и одобрено Комитетом по этике Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №534, 7 марта 2020 г.) в соответствии с руководящими принципами, утвержденными в рамках данного протокола (статья 20, Федеральный закон "Об охране здоровья граждан Российской Федерации N323-ФЗ, 21 ноября 2011 г.). Пациенты/участники предоставили письменное информированное согласие на участие в данном исследовании.

### **2.3.2 Болезнь Вильсона-Коновалова**

Это было обсервационное исследование, в котором приняли участие 55 человек: 39 пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова (БВК) и 16 здоровых контрольных лиц. Всего в исследование было включено 39 человек с БВК, находящихся на стационарном лечении в Научно-исследовательском центре неврологии (Москва, Россия). Критерии включения пациентов с БВК: дебют заболевания в детском, подростковом или взрослом возрасте (до 35 лет); сопутствующее поражение головного мозга и внутренних органов (цирроз печени, гепатоспленомегалия, портальная гипертензия, тубулоинтерстициальный нефрит и др.); экстрапирамидные расстройства; системное нарушение обмена меди.

Критерии исключения пациентов из когорты БВК включали следующее: проявление заболевания после 35 лет; аутосомно-доминантный тип наследования; наличие анамнестических, клинических или параклинических признаков другого заболевания, которое может вызывать сходные симптомы; галлюцинации, не связанные с приемом лекарств; наличие деменции или признаков нарушения функции коры головного мозга (афазия, апраксия и др.); замедление вертикальных саккад или паралич вертикального взора; положительный анамнез воспалительных

заболеваний; хронические заболевания и нарушения обмена веществ; лечение нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП) или кортикостероидами в течение последнего месяца; беременность или кормление грудью во время посещения исследования. Всего в исследование было включено 16 здоровых людей, не страдающих нейродегенеративными заболеваниями, подтвержденными клиническим обследованием. Они были набраны среди людей, проходящих периодические медицинские осмотры в том же центре. Критерии исключения для группы здорового контроля были такими же, как и для пациентов с БВК. Исследование было одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол №4-4/19 15.05.19). От каждого участника было получено письменное информированное согласие в соответствии с руководством, утвержденным в рамках данного протокола (статья 20, Федеральный закон "Об охране здоровья граждан Российской Федерации" N323-ФЗ, 11.21.2011).

### **2.3.3 Болезнь Паркинсона**

Группа пациентов с болезнью Паркинсона (БП) была набрана в Научно-исследовательском центре неврологии. Критерии исключения включали: (1) острое инфекционное состояние, (2) диабет, (3) аутоиммунные заболевания. Клинические диагностические критерии неврологов, специализирующихся на расстройствах движения, и стадия по шкале Хен и Яра были зарегистрированы для каждого пациента. Были набраны неродственные здоровые добровольцы (ЗД), сопоставимые по возрасту, полу, этническому происхождению и району проживания. В исследовании приняли участие 73 пациента с БП и 36 ЗД. Забор всех образцов крови проводился утром в состоянии голодания. Плазму получали сразу после забора крови, используя пробирки с гепарином, аликвотировали и хранили при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего анализа. Исследование было одобрено комитетом по этике Научного центра неврологии (протокол №4-5/19 15.05.19). От каждого участника было получено информированное письменное согласие в соответствии с руководством, утвержденным в рамках данного протокола (статья 20, Федеральный закон "Об охране здоровья граждан Российской Федерации" N323-ФЗ, 11.21.2011).

### **2.3.4 Сбор образцов слезной и внутриглазной жидкости при глаукоме**

Забор внутриглазной жидкости (ВГЖ) производился хирургом во время факоэмульсификации или непроникающей глубокой склерэктомии под перibuльбарной (2% лидокаин) и местной (проксиметакаин 0,5% глазные капли) анестезией. Разрез через роговицу делали с помощью одноразового ножа длиной 1,2 мм и 50 мкл ВГЖ аспирировали с помощью шприца, смешивали с 0,05% ВНТ (50:1 v/v), аликвотировали и хранили при -80 °С. Слезную жидкость (СЖ) собирали у пациентов в день операции с помощью отмеренных полосок бумаги для теста Ширмера без анестезии или стимуляции слезы. У всех испытуемых процедура проводилась в одинаковых условиях, а именно через 30 минут после пробуждения, в состоянии голодания, одним и тем же медицинским персоналом при одинаковых условиях воздуха и освещения. Полоске давали увлажниться на 10 мм под нижним веком, влажный фрагмент отрезали, помещали в 1 мл 95% в/в водно-метанолового раствора, содержащего 0,1% в/в ВНТ, и хранили при -80 °С. Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и было одобрено местным этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра глазных болезней имени Гельмгольца (код протокола №49/1, 7 февраля 2019 года и №50/2, 24 ноября 2020 года).

### **2.3.5 Статистический анализ метаболомных профилей человека.**

Сравнение относительных концентраций проводили с помощью двухвыборочного двустороннего t-теста с последующей поправкой Бонферрони-Холма для множественных сравнений.  $p < 0,05$  считалось статистически значимым. Данные метаболомики анализировали с помощью пакета mixOmics R версии 6.1.1. После нормализации данных по внутренним стандартам применялось центрирование среднего значения площади пика и масштабирование дисперсии на единицу. Разделение классов анализировали методом частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA). Качество построенной модели проверялось с помощью перекрестной валидации. Каждый раунд перекрестной валидации включает обучение на большом подмножестве данных и проверку на случайной выборке. Эффективность моделей сравнивалась по общему коэффициенту ошибок и площади под кривой (AUC). После создания PLS-DA модели с тремя компонентами были рассчитаны баллы VIP для каждого исследуемого метаболита. Пороговое

значение для баллов VIP было принято равным 1,5 в соответствии со стандартной инициативой метаболомики (уровень MSI = 1). Ковариационный анализ (ANCOVA) использовался для сравнения средних значений отдельных метаболитов в исследуемых группах с учетом возраста и пола. Анализ проводился с использованием пакета rstatix для R. Парное сравнение относительных концентраций метаболитов проводилось с использованием функции emmeans\_test (пакет rstatix), также с учетом возраста и пола как ковариат. Анализ проводился с поправкой Бонферрони-Холма для множественных сравнений,  $p < 0,05$  считалось статистически значимым.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **3.1 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. Были охарактеризованы либо отдельные участки сигнальных путей, либо только высвобождение цитокинов, либо одно фиксированное время развития ответа, не изучена взаимосвязь с “сопряженными” сигнальными путями, гены которых не являются прямыми участниками сигнального пути TLR, но связаны с развитием воспалительного процесса (детали см. Литобзор п. 1.5). Отсутствовала характеристика профиля оксипиринов, хотя они являются важной составляющей не только развития воспалительного ответа, но и процессов разрешения воспаления.

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) влияние процессов деградации мРНК на провоспалительные маркеры; 3) влияние концентрации сыворотки в среде культивирования.

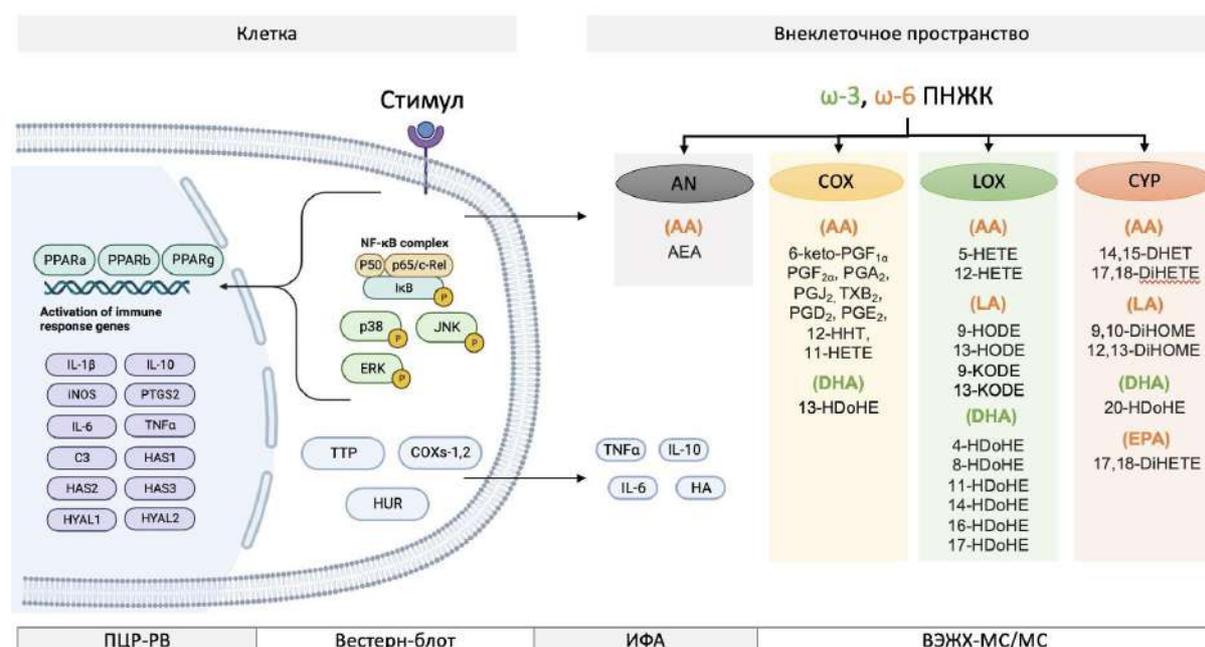
##### **3.1.1 Комплексная характеристика воспалительного ответа на астроцитах**

Комплексную характеристику при стимуляции клеток 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, а именно изменение фосфорилирования митоген-активированных протеинкиназ (МАРК) р38, киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK), с-Jun N-концевой киназы (JNK) и транскрипционного фактора NF-κB; 3) изменение в высвобождении сигнальных липидов (оксипиринов и ПНЖК); 4) изменение экспрессии генов различных метаболических процессов, сопряженных с развитием

ответов астроцитов на провоспалительные стимулы. При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [147, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256].

Полученные при активации TLR4 клеточные ответы сравнивали с ответами астроцитов при активации других TLR рецепторов, для чего использовали агонисты: 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 $\alpha$ , интерлейкины IL-1 $\alpha$  и IL-10. Общая схема получения данных при комплексной характеристике представлена на Рис. 3.1.



**Рис. 3.1.** Общая схема получения данных при комплексной характеристике ответов астроцитов на действие провоспалительных стимулов.

Полученные данные суммированы в таблице 3.1. Для всех проанализированных стимулов наблюдались характерные черты на уровне клеток для воспалительных процессов. Получено, что LPS (100 нг/мл, 4 ч) увеличивает экспрессию мРНК цитокинов TNF $\alpha$  ( $\uparrow$  x50), IL-10 ( $\uparrow$  x20), IL-1 $\beta$  ( $\uparrow$  x100), IL-6 ( $\uparrow$  x100), а также генов маркеров воспалительного ответа C3 ( $\uparrow$  x10), iNOS ( $\uparrow$  x100) и COX-2 ( $\uparrow$  x30) (Таблица 3.1).

На уровне белка наблюдали увеличение концентрации в супернатанте цитокинов TNF $\alpha$  ( $\uparrow$  x3), IL-10 ( $\uparrow$  x7), IL-6 ( $\uparrow$ ), а также снижение количества белка COX-1 ( $\downarrow$  x1,2), и увеличение COX-2 ( $\uparrow$  x4). Помимо этого, стимуляция астроцитов LPS вызывала увеличение фосфорилирования MAPK: p-p38/p38 ( $\uparrow$  x4), p-JNK/JNK ( $\uparrow$  x5), p-ERK/ERK ( $\uparrow$  x1,8) и транскрипционного фактора NF-kB: pNF-kB/NF-kB ( $\uparrow$  x2,8) (Таблица 3.1).

Для сопряженных генов показано: 1) увеличение экспрессии на уровне мРНК гена белка, участвующего в деградации мРНК тристетрапролина (ТТР) ( $\uparrow$  x7), в то время как экспрессия на уровне мРНК белка человеческий антиген R (HuR), вовлеченного в стабилизацию мРНК, не изменялась; 2) увеличение экспрессии генов, вовлеченных в синтез гиалуроновой кислоты, гиалуронансинтаз HAS1 ( $\uparrow$  x8) и HAS2 ( $\uparrow$  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), а именно, снижение экспрессии PPAR $\alpha$  ( $\downarrow$  x1,5) и PPAR $\gamma$  ( $\downarrow$  x1,2) и увеличение экспрессии PPAR $\beta$  ( $\uparrow$  x1,5) (Таблица 3.1).

**Таблица 3.1.** Влияние активации Толл-подобных рецепторов на клеточный ответ астроцитов.

Стимул	Маркер	Ссылка*
Экспрессия генов (ПЦР в реальном времени)		
LPS (100 нг/мл, 4 ч)	TNF $\alpha$ ( $\uparrow$ x50), IL-10 ( $\uparrow$ x20), C3 ( $\uparrow$ x10), IL-1 $\beta$ ( $\uparrow$ x100), IL-6 ( $\uparrow$ x100), iNOS ( $\uparrow$ x100) COX-2 ( $\uparrow$ x30), ТТР ( $\uparrow$ x7), HuR, HAS1 ( $\uparrow$ x8), HAS2 ( $\uparrow$ x120), HAS3, HYAL1, HYAL2, PPAR $\alpha$ ( $\downarrow$ x1,5), PPAR $\beta$ ( $\uparrow$ x1,5), PPAR $\gamma$ ( $\downarrow$ x1,2)	[247–249]
LPS (100 нг/мл, 24ч)	C3 ( $\uparrow$ x50), GBP2 ( $\uparrow$ x8), IL-1 $\beta$ ( $\uparrow$ x40), iNOS ( $\uparrow$ x500), TNF $\alpha$ ( $\uparrow$ x4), CXCL10, IL-10 ( $\uparrow$ x8), MRC1 ( $\downarrow$ x4), FIZZ1, Ym1	[250]
PGN (5 мкг/мл)	COX-2 ( $\uparrow$ x25), ТТР ( $\uparrow$ x5), HuR, PPAR $\alpha$ ( $\downarrow$ x2), PPAR $\beta$ ( $\uparrow$ x2), PPAR $\gamma$	[249,251]
FGL (5 мкг/мл)	COX-2 ( $\uparrow$ x10), ТТР, HuR, PPAR $\alpha$ ( $\downarrow$ x1,3), PPAR $\beta$ ( $\uparrow$ x1,3), PPAR $\gamma$ ( $\downarrow$ x1,3)	[249,251]
Экспрессия белков (ИФА, иммуноблоттинг)		
LPS (100 нг/мл, 4 ч)	TNF $\alpha$ ( $\uparrow$ x3), IL-10 ( $\uparrow$ x7), IL-6 ( $\uparrow$ ), COX-1 ( $\downarrow$ x1,2), COX-2 ( $\uparrow$ x4), HuR, ТТР	[147,247,250, 252–254]
PIC (10 мкг/мл, 4 ч)	TNF $\alpha$ , COX-2 ( $\uparrow$ x2,5)	[147,253]

Локализация белков (микроскопия, иммуноблоттинг)		
LPS (1 ч /4 ч)	HUR (↓ ядро), TTP (↑ цитоплазма)	[251]
Активность фосфо-белков (иммуноблоттинг)		
LPS (100 нг/мл, 2 ч)	p-p38/p38 (↑ x2,5), p-JNK/JNK (↑ x7), p-ERK/ERK (↑ x1,5), pNF-kB/NF-kB (↑ x2)	[247]
LPS (100 нг/мл, 4 ч)	p-p38/p38 (↑ x4), p-JNK/JNK (↑ x5), p-ERK/ERK (↑ x1,8), pNF-kB/NF-kB (↑ x2,8)	[247,251,254]
Высвобождение гиалуроновой кислоты (ГК)		
LPS (100 нг/мл, 4 ч)	ГК (↑ x1,5)	[247]
LPS (100 нг/мл, 24ч)	ГК (↑ x20)	[247]

\* приведены ссылки на статьи, где нами опубликованы приведенные в таблице данные

Для сравнения процессов активации системы врожденного иммунитета через TLR рецепторы были получены характеристики для других стимулов, которые участвуют в патологиях, связанных с нейровоспалением. Данные представлены в Таблице 3.2. Характеристики воспалительных процессов наблюдались для всех указанных стимулов.

**Таблица 3.2.** Ответ астроцитов при действии стимулов, участвующих в воспалительных процессах ЦНС.

Стимул	Маркер	Ссылка*
Экспрессия генов (ПЦР в реальном времени)		
Thr (1 U/мл, 4ч)	COX-2(↑ x8), TTP (↑ x2,5), HuR	[251]
АТР (50 мкМ)	COX-2 (↑ x4), TTP (↑ x2), HuR	[251]
IL-1α (5 нг/мл, 3ч)	COX-2 (↑ x10), NOS2 (↑ x100), CXCL10 (↑ x10), IL-6 (↑ x100), TNFα (↑ x5), CCL5 (↑ x100)	[255]
TNFα (20 нг/мл, 3ч)	COX-2 (↑ x3), NOS2 (↑ x100), CXCL10 (↑ x10), IL-6 (↑ x100), TNFα (↑ x10), CCL5 (↑ x50)	[255]
Экспрессия белков (ИФА, иммуноблоттинг)		
IL-1α (5 нг/мл, 3ч)	COX-2 (↑ x3)	[255]
Активность фосфо-белков (иммуноблоттинг)		
IL-1α (5 нг/мл, 3ч)	p-JNK/JNK (↑), p-IKK/IKKbeta (↑), p-p38/p38 (↑), pAMPK/AMPK	[255]

\* приведены ссылки на статьи, где нами опубликованы приведенные в таблице данные

### 3.1.1.1 Изменение профиля оксипинов при стимуляции астроцитов LPS

Для разных стимуляций во внеклеточной среде проанализированы ПНЖК и образующиеся из них оксипины (Таблица 3.3, указаны данные для стимула LPS 4 и 24 часа). Всего во внеклеточной среде характеризовали 29 соединений, включая 12 производных АА, 8 производных ДНА, 6 производных LA, а также свободные ПНЖК АА, ДНА и ЕРА. Из этих соединений 9 относят к образующимся через СОХ-путь, 12 — через LOX-путь, 5 — через СУР-путь. При стимуляции астроцитов в первую очередь наблюдали значительное увеличение синтеза оксипинов, образующихся через СОХ-путь биосинтеза. Таким образом, вне зависимости от природы стимула наблюдается схожий паттерн ответа: увеличение высвобождения провоспалительных цитокинов, оксипинов, образующихся через СОХ-путь, и активация внутриклеточных маркеров.

Профиль оксипинов при активации TLR-сигнального пути был получен впервые. Проведенные нами исследования дали возможность соотнести профили оксипинов с уровнем синтеза про- и противовоспалительных цитокинов, внутриклеточных маркеров воспаления и экспрессией генов, которые могут быть связаны с патологиями нейровоспаления, в которых участвуют астроциты. Далее изменения профилей оксипинов исследовали в контексте общей характеристики воспалительных процессов при различных воздействиях на клетки.

**Таблица 3.3.** Высвобождение ПНЖК и оксипинов астроцитами обработанными LPS

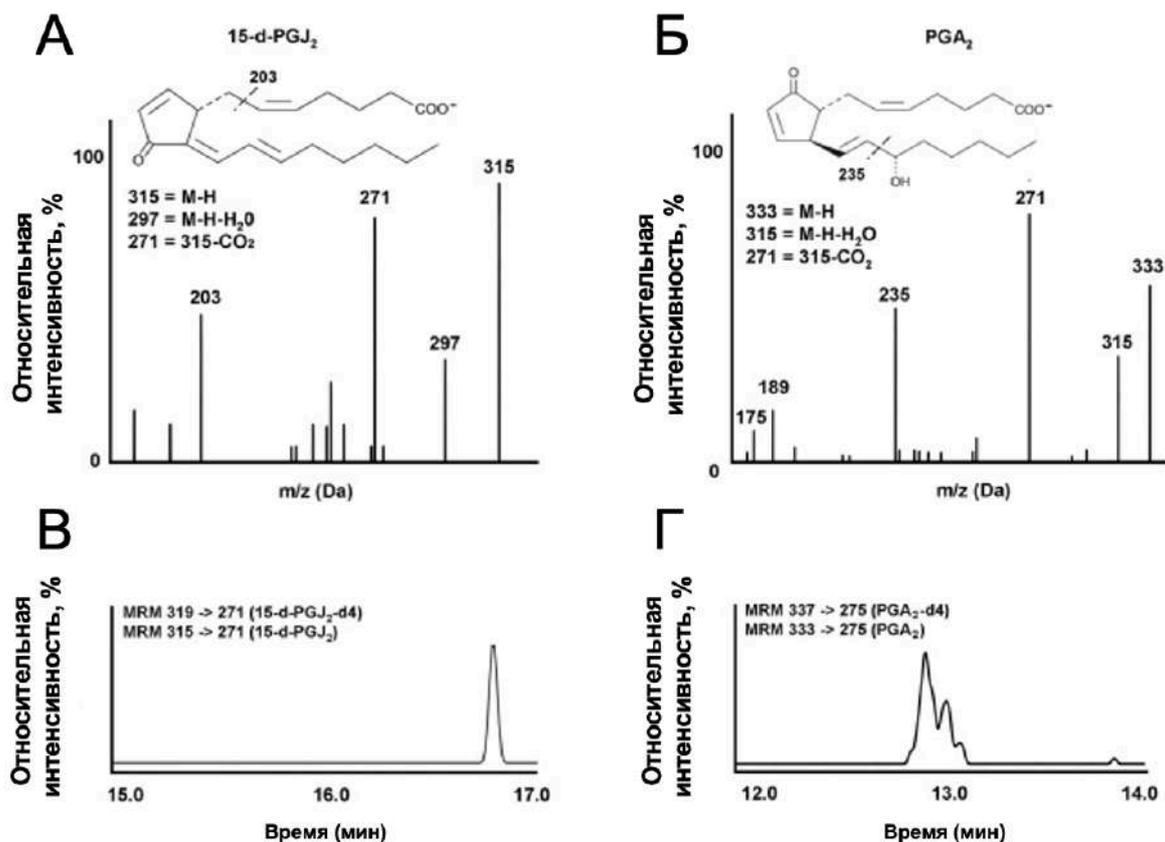
Путь	ПНЖК	Соединение*	LPS 4ч	LPS 24ч
СОХ-путь	АА	12-ННТ	↑ x6	↑ x11
	АА	6-keto-PGF <sub>1α</sub>	↑ x10	↑ x35
	АА	PGA <sub>2</sub> +PGJ <sub>2</sub>	↑ x2	↑ x25
	АА	PGE <sub>2</sub>	↑ x6	↑ x250
	АА	PGD <sub>2</sub>	↑ x6	↑ x36
	АА	PGF <sub>2α</sub>	↑ x2	↑ x15
	АА	TXB <sub>2</sub>	↑ x2	↑ x10
	АА	11-НЕТЕ	↑ x2	↑ x9
	ДНА	13-НDoHE	↑ x2	↑ x4
LOX-путь	АА	12-НЕТЕ	-	↓ x0,7
	АА	5-НЕТЕ	-	↓ x0,5
	ДНА	16-НDoHE	-	-
	ДНА	4-НDoHE	-	↓ x0,2

	DHA	8-HDoHE	-	↓ x0,3
	LA	13-HODE	-	-
	LA	13-KODE	-	-
	LA	9-HODE	-	-
	LA	9-KODE	-	-
	DHA	17-DHoHE	-	-
	DHA	14-HDoHE	-	-
	DHA	11-HDoHE	-	-
СУР-путь		14,15-DHET	-	-
		17,18-DiHETE	-	-
		12,13-DiHOME	-	-
		9,10-DiHOME	-	-
		20-HDoHE	-	-
ПНЖК		AA	-	↓ x0,3
ПНЖК		DHA	-	↓ x0,4
ПНЖК		EPA	-	↓ x0,2

### 3.1.1.2 Участие оксилипинов в регуляции функций астроцитов

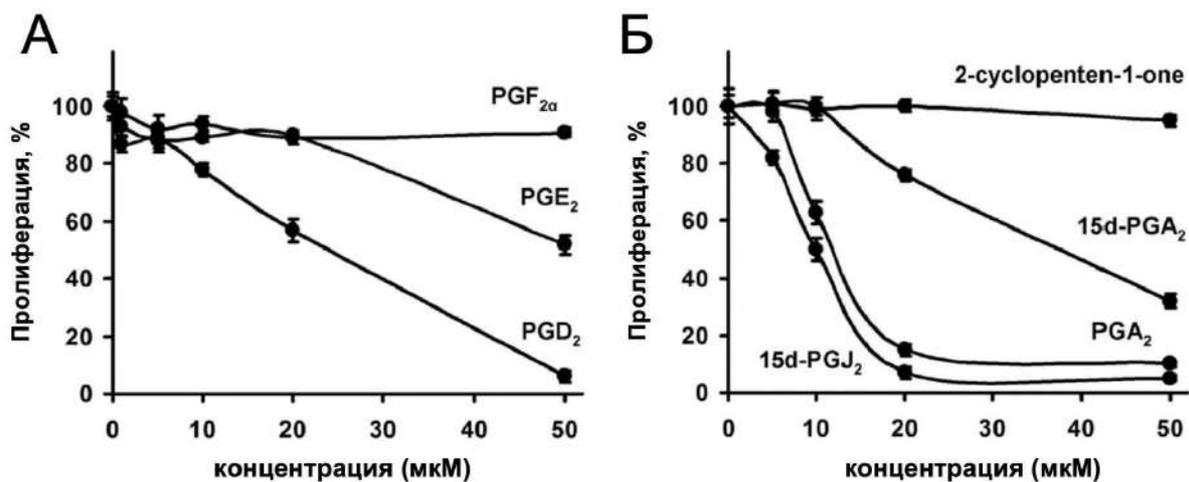
Астроциты участвуют в проявлении невропатологии, а их пролиферация является важной частью астроглиоза — клеточного нейровоспалительного ответа. Роль оксилипинов в этом процессе была не ясна, поэтому были поставлены следующие задачи: 1) измерить количество первичных (PG) и циклопентеноновых (суPG) простагландинов, выделяемых LPS-стимулированными астроцитами; 2) оценить влияние первичных и суPG простагландинов на пролиферацию астроцитов; 3) оценить влияние веществ-ингибиторов воспалительного пути как ко-стимуляторов действия PG на пролиферацию. Результаты, представленные в данном разделе, опубликованы в работе [256].

Для оценки синтеза PG после воспалительной стимуляции применили метод ВЭЖХ-МС/МС и определили концентрации производных циклопентенона  $PGA_2$  и  $15d-PGJ_2$ , а также первичных PG  $PGE_2$  и  $PGD_2$  после стимуляции астроцитов в течение 24 ч LPS (100 нг/мл). На Рис. 3.2 представлены МС/МС спектры и репрезентативные хроматограммы для  $15d-PGJ_2$  (рис.3.2А) и  $PGA_2$  (рис.3.2Б). Концентрации составили  $15d-PGJ_2$  ( $87 \pm 17$  пг/мл),  $PGA_2$  ( $308 \pm 23$  пг/мг)  $PGE_2$  ( $1410 \pm 36$  пг/мл) и  $PGD_2$  ( $344 \pm 24$  пг/мг).



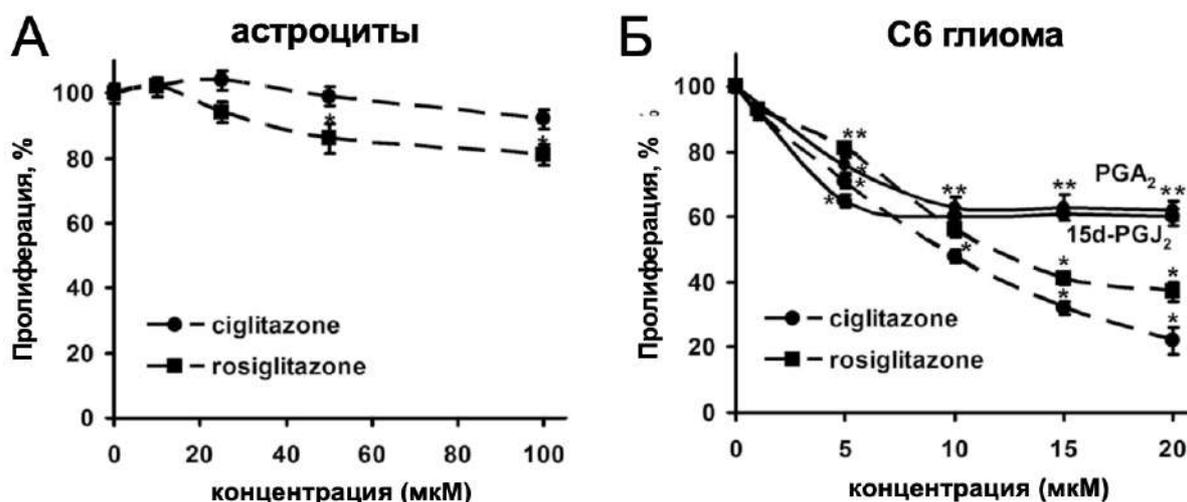
**Рис. 3.2.** ВЭЖХ-МС/МС-анализ высвобождения PGA<sub>2</sub> и 15d-PGJ<sub>2</sub> в астроцитах, обработанных LPS. Астроциты предварительно обрабатывали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 24 ч. Анализ клеточной культуральной среды проводили, как описано в разделе "Материалы и методы". (А) МС/МС-спектры 15d-PGJ<sub>2</sub> и (Б) PGA<sub>2</sub>. Репрезентативные хроматограммы мониторинга множественных реакций (С) 15d-PGJ<sub>2</sub> и (Д) PGA<sub>2</sub>, идентифицированных в супернатанте клеток астроцитов, обработанных LPS.

Для характеристики влияния оксипрогландинов на пролиферацию, клетки обрабатывали простагландинами PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> и PGD<sub>2</sub> (рис. 3.3А), циклопентеноновыми простагландинами PGA<sub>2</sub>, 15d-PGJ<sub>2</sub> и 2-циклопентен-1-оном в качестве контроля (рис. 3.3Б). Пролиферацию клеток в синхронизированных клеточных культурах стимулировали добавлением сыворотки в присутствии различных PG. Показано, что PGF<sub>2α</sub> и 2-циклопентен-1-он не влияли на пролиферацию. Для других PG наблюдали следующий порядок потенций (% ингибирования при концентрации 20 мкМ в анализе): PGE<sub>2</sub> (5%) < 15d-PGA<sub>2</sub> (20%) < PGD<sub>2</sub> (40%) < PGA<sub>2</sub> (80%) < 15d-PGJ<sub>2</sub> (90%).



**Рис. 3.3.** 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). Значения представляют собой средние  $\pm$  SEM из трех независимых экспериментов, каждый из которых проводился в трех экземплярах.

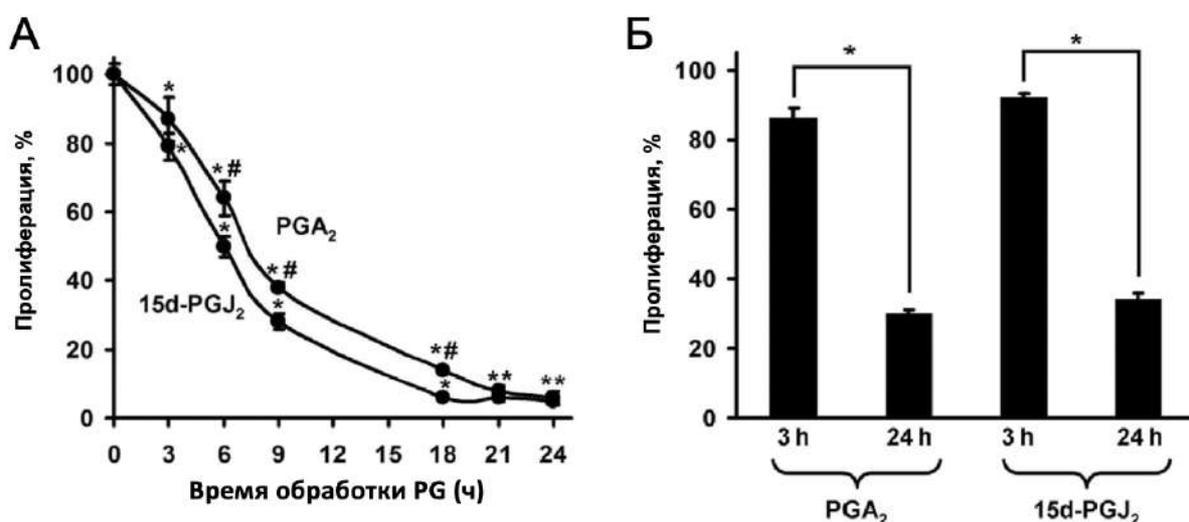
15d-PGJ<sub>2</sub> считается эндогенным лигандом PPAR $\gamma$  [224,257]. Известно, что активация PPAR $\gamma$  различными агонистами, включая 15d-PGJ<sub>2</sub>, подавляет пролиферацию опухолевых клеток [258]. Поэтому влияние суPG сравнили с влиянием росиглитазона и циглитазона (синтетических агонистов PPAR $\gamma$ ) (Рис. 3.4А). Розиглитазон в концентрации 100 мМ подавлял пролиферацию на 20%, а циглитазон практически не оказывал влияния (рис. 3.4А). Также протестировали клетки глиомы С6 и получили, что, в отличие от астроцитов, клетки глиомы С6 чувствительны к синтетическим агонистам PPAR $\gamma$ , тогда как PGA<sub>2</sub> и 15d-PGJ<sub>2</sub> обладают низкой активностью (рис. 3.4Б). Ингибирующий эффект глитазонов и суPGs на пролиферацию клеток глиомы С6 имеет следующий порядок потенций (% ингибирования при концентрации 15 мМ): циглитазон (80%) > росиглитазон (60%) > [PGA<sub>2</sub> (40%) > 15d-PGJ<sub>2</sub> (35%)] (рис. 3.4Б).



**Рис. 3.4.** Влияние синтетических агонистов PPAR $\gamma$  циглитазона и росиглитазона на пролиферацию астроцитов (А) и клеток С6 (Б). Исследуемые вещества 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). Значения представляют собой средние  $\pm$  SEM из трех независимых экспериментов, каждый из которых проводился в трех экземплярах.

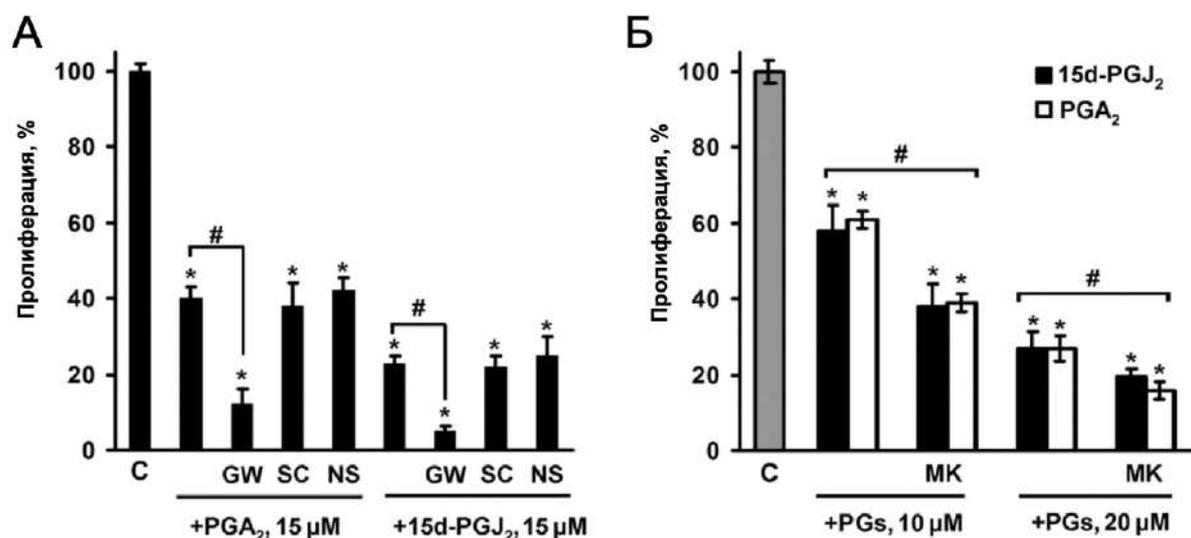
Для выявления механизмов, с помощью которых два наиболее активных соединения — PGA<sub>2</sub> и 15d-PGJ<sub>2</sub>, модулируют пролиферацию астроцитов, было оценено их влияние на повторное вхождение синхронизированных астроцитов в клеточный цикл. PGA<sub>2</sub> и 15d-PGJ<sub>2</sub> добавляли в разные моменты времени после инициации пролиферации сывороточной стимуляцией (рис. 3.5А). Уровень пролиферации необработанных клеток принимали за 100%. Оба вещества проявили сходный эффект и достигли сопоставимого уровня ингибирования, который коррелировал со временем воздействия клеток на суPGs. Поскольку тестировали синхронизированные клетки, а добавление сыворотки индуцировало повторное вхождение в клеточный цикл, существуют две возможности объяснить кривые, наблюдаемые на рис. 3.5А: i) тестируемые соединения запускают некоторые сигнальные каскады на начальных стадиях клеточного цикла, или, альтернативно, ii) эти соединения не обладают сигнальным эффектом, а уровень эффекта зависит от продолжительности воздействия веществ. Для разграничения этих двух гипотез провели следующий эксперимент: через 3 часа после одновременного добавления сыворотки и суPG одну фракцию обработанных культур промывали и возобновляли пролиферацию добавлением новой культуральной среды с сывороткой (контрольные

клетки подвергались той же процедуре) в течение следующих 21 часа. Данные показаны в столбце "3h" (рис. 3.5Б). Вторую фракцию культур не отмывали и, соответственно, подвергали непрерывному воздействию суPG в течение 24 ч (данные в столбцах, обозначенных "24h" (рис. 3.5Б)). Уровень пролиферации отмывых и не отмывых, но не обработанных клеток принимали за 100%. Сравнение пролиферации клеток, экспонированных в течение 3 ч и 24 ч, показало, что ингибирующий эффект PGA2 составил 70% после 24 ч инкубации, тогда как удаление PGA2 после 3 ч инкубации привело к заметно более слабому 15% ингибированию (рис. 3.5Б). Соответствующие эффекты наблюдались и при обработке 15d-PGJ2 (рис. 3.5Б). Эти данные показывают, что действие суPG зависит от продолжительности их применения; они не активируют "переключатели" сигнального каскада повторного входа в клеточный цикл. Эти данные также указывают на общие черты, лежащие в основе ингибирования пролиферации этими двумя суPG.



**Рис. 3.5.** Влияние длительности воздействия PGA2 и 15d-PGJ2 на пролиферацию синхронизированных астроцитов, стимулированных сывороткой (А). Клетки синхронизировали путем лишения сыворотки и стимулировали пролиферацию добавлением стандартной среды, содержащей сыворотку, в момент времени "0". Затем добавляли 20 мкМ PGA<sub>2</sub> или 15d-PGJ<sub>2</sub> в указанные моменты времени. Пролиферацию оценивали через 24 ч по методике с BrdU. \*p<0,05 по сравнению с нативными контрольными клетками, #p<0,05 по сравнению с соответствующей временной обработке 15d-PGJ<sub>2</sub> (Б). Влияние удаления суPG из внеклеточной среды на пролиферацию. После добавления сыворотки и суPG часть клеточных культур отмывали после 3-часовой инкубации и сравнивали пролиферацию через 24 ч. Показан эффект для 20 мкМ PG. Значения представляют собой средние ± SEM из трех независимых экспериментов, каждый из которых проводился в трех повторностях. \*p < 0,05.

СуPG тесно связаны с воспалительными процессами. Поэтому их использовали в комбинации с типичными противовоспалительными ингибиторами: GW9662, антагонистом PPAR $\gamma$ ; SC-560 и NS-398, ингибиторами циклооксигеназы (COX) 1 и 2, соответственно (рис. 3.6А), и МК-571, ингибитором рецепторов MRP1 (белок множественной лекарственной устойчивости-1) и CysLT1 (рис. 3.6Б). Рабочие концентрации ингибиторов были выбраны на основе ранее опубликованных данных [231,259]. Комбинирование PGA $_2$  или 15d-PGJ $_2$  с ингибиторами COX-1 или COX-2 не влияло на пролиферацию астроцитов (рис. 3.6А); в то же время GW9662 потенцирует эффекты обоих суPG (с 40% до 15% для PGA $_2$  и с 20% до 5% для 15d-PGJ $_2$ ) (рис. 3.6А). Комбинация суPG с другим потенциальным противовоспалительным веществом, МК-571, также усиливала действие суPG (рис. 3.6Б). Таким образом, PGA $_2$  и 15d-PGJ $_2$  имеют общие черты в контроле пролиферации астроцитов. Важно отметить, что их эффект усиливается при сочетании с веществами, которые антагонизируют связывание рецепторов PPAR $\gamma$  или CysLT1.



**Рис. 3.6.** PGA $_2$  и 15d-PGJ $_2$  имеют общие черты в модификации пролиферации. (А) Комбинация суPG с антагонистом PPAR $\gamma$  GW9662 (GW, 10 мМ), специфическими ингибиторами циклооксигеназы COX-1 SC-560 (SC, 10 нМ) и COX-2 NS-398 (NS, 3 мМ). (Б) Комбинация суPG с ингибитором рецепторов MRP1 (белок множественной лекарственной устойчивости-1) и CysLT1, МК-571 (МК, 5 мМ). Ингибиторы добавляли за 10 минут до сыворотки и суPG. Пролиферацию оценивали через 48 часов по методике с BrdU. За 100% взята пролиферация без добавления тестируемых соединений (контроль). Значения представляют собой средние  $\pm$  SEM из трех независимых экспериментов, каждый из которых проводился в трех экземплярах. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками (C); # $p < 0,05$  по сравнению с указанными столбиками.

В этом исследовании было показано, что стимуляция LPS, который действует как агонист TLR4 в астроцитах [116,231], приводит к синтезу как первичных (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>), так и циклопентеноновых PG (PGA<sub>2</sub> и 15d-PGJ<sub>2</sub>) в наномолярных концентрациях. Насколько нам известно, это первый случай оценки синтеза циклопентеноновых PG в астроцитах. При количественном определении PGA<sub>2</sub> и 15d-PGJ<sub>2</sub> *in vivo* в различных состояниях, таких как ишемия, инсульт или травмы, наблюдаются концентрации от 10 пг/мл до 5 нг/мл [9,260]. В исследовании пролиферации наблюдали действие простагландинов в концентрациях 1-5 мкМ. Таким образом, при прямом сравнении концентрации PG, высвобождающиеся из астроцитов *in vitro*, не являются "физиологически активными". Однако важно учитывать, что существует гетерогенность астроцитов [137], поэтому нельзя исключить локальные концентрации PG, достигающие микромолярных значений в воспаленной ткани. Во-вторых, все протестированные вещества (первичные PG и суPG) подавляют пролиферацию; следовательно, и первичные, и суPG схоже влияют на астроглиоз. Несмотря на разный молекулярный механизм действия (т.е. первичные PG действуют через рецепторы, связанные с G-белками, а суPG - через PPAR-зависимые или PPAR-независимые пути), в некоторых процессах их эффекты аддитивны, что дает дополнительные возможности для регуляции.

В настоящее время проводятся исследования, направленные на выявление терапевтических мишеней, подходящих для ограничения пролиферации астроцитов. СуPGs являются кандидатами для этой цели, но механизмы их действия в основном неизвестны. Полученные данные открывают новые механистические возможности. (i) Полученные данные являются первыми, которые свидетельствуют о независимом от PPAR $\gamma$  контроле пролиферации астроцитов с помощью суPG, обладающих такой же силой действия, как PGA<sub>2</sub> и 15d-PGJ<sub>2</sub>. (ii) суPG не действуют через индуцированные сигнальные пути, поскольку для проявления эффекта требуется их постоянное присутствие в клеточной системе. (iii) Комбинация суPG с противовоспалительными веществами повышает чувствительность клеток. Этот последний факт открывает новые подходы для сочетания различных веществ в регуляции пролиферации астроцитов.

Ранее 15d-PGJ<sub>2</sub> привлекал большое внимание и часто применялся в качестве активного эндогенного лиганда транскрипционного фактора PPAR $\gamma$  [257]. PGA<sub>2</sub>, однако, изучался меньше, поскольку считался слабым

агонистом PPAR $\gamma$ . Тем не менее, в ходе воспалительной реакции PGE $_2$ , предшественник PGA $_2$ , обычно находится в большей концентрации, чем PGD $_2$ , предшественник 15d-PGJ $_2$  [7]. Предыдущие исследования показали важную роль PPAR в регуляции ответов астроцитов на провоспалительную стимуляцию [116,231], но регуляция пролиферации суPG является PPAR $\gamma$ -независимым процессом. Более того, регуляция отличается для глиомы и первичных глиальных клеток. Активные синтетические агонисты PPAR $\gamma$ , розиглитазон и циглитазон, практически не влияют на пролиферацию астроцитов, а GW9662, антагонист PPAR $\gamma$ , даже потенцирует действие обоих суPG. Таким образом, сигнальные пути PPAR не участвуют напрямую в регуляции пролиферации, опосредованной суPG, или обладают даже противоположными эффектами.

PPAR $\gamma$ -независимые эффекты суPG в основном объясняются их прямой модуляцией внутриклеточных белков за счет активных химических связей в этих молекулах [8]. Сравнение PGA $_2$ , 15d-PGJ $_2$ , 15d-PGA $_2$  и 2-циклопентен-1-она (все имеют структуру сопряженного энона) и отсутствие эффекта 2-циклопентен-1-она позволяют заключить, что  $\alpha,\beta$ -ненасыщенная карбонильная группа циклопентенового кольца недостаточна для ингибирования пролиферации астроцитов. Сравнение эффектов пролиферации 15d-PGA $_2$ , 15d-PGJ $_2$  и PGA $_2$  свидетельствует об узкой структурной специфичности циклопентенонов. Мотив перекрестно сопряженного диенона считается важным для эффектов 15d-PGJ $_2$  [261], в этой структуре электрофильность углерода-11 обеспечивает химическую реактивность с тиолами [261]. PGA $_2$  не имеет перекрестно-сопряженной диеноновой структуры, но действует так же, как 15d-PGJ $_2$ , в то время как 15d-PGA $_2$  не был эффективен в тестах. Ранее было показано, что PGA $_1$  и 15d-PGJ $_2$  одинаково модифицируют глутатион S-трансферазу человека [262]. В нашем исследовании PGA $_2$  и 15d-PGJ $_2$  имеют сходные черты в регуляции пролиферации астроцитов и могут иметь идентичные мишени в астроцитах. Привлекательным является предположение о роли глутатион S-трансферазы, но это требует дальнейшего изучения.

Таким образом, хотя определяемые в клеточных экспериментах концентрации оксипинов находятся в наномолярном диапазоне, полученные результаты позволили сделать предположение, что их эффекты могут достигаться не за счет повышения концентрации отдельных эндогенных веществ, а за счет комбинации слабых модуляций, т.е. изменения профиля оксипинов, соотношения внутри профиля про- и

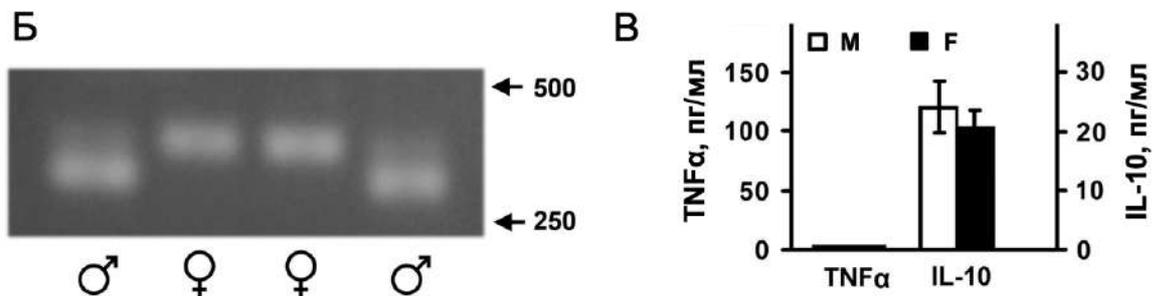
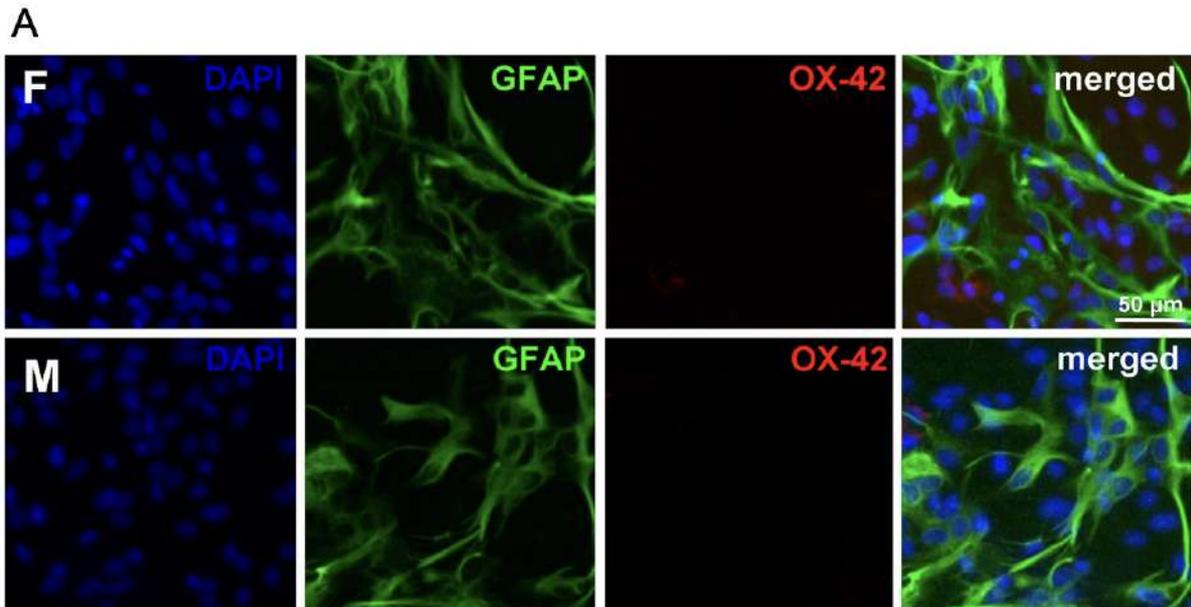
антивоспалительных компонентов. Это также актуализировало задачу выявления сигнальных путей, на которые можно воздействовать для получения заданных свойств смесей синтезируемых оксилипинов.

### **3.1.2 Влияние пола на TLR4-стимулированный клеточный ответ**

Влияние пола на воспалительный ответ на уровне организма и на уровне клеток детально рассмотрено в Литобзоре п. 1.5.2. Чтобы изучить гипотезу о том, что астроциты могут участвовать в опосредованных полом различиях воспалительных реакций, было исследовано, отличается ли ответ культур первичных астроцитов, полученных из особей разного пола, на стимуляцию LPS. При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [252].

#### **3.1.2.1 Астроциты, выделенные из эмбрионов крыс самцов и самок, имеют сходную морфологию, но демонстрируют различия в реакции на LPS**

Для оценки различия в морфологии первичных астроцитов, полученных из целого мозга самцов и самок в качестве маркеров использовали: 1) GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок) как маркер астроцитов; 2) ОХ-42 (анти-CD11b/c антитело ОХ-42) как маркер микроглии; 3) DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) маркер для окрашивания ядер (Рис. 3.7А). Чистота астроцитов в культурах превышала 98% для образцов, полученных как от самцов, так и самок. Для определения пола использовали метод ПЦР с последующим анализом электрофорезом (Рис. 3.7Б). Не было обнаружено морфологических различий между культурами клеток, полученных от самцов и самок (Рис. 3.7А).

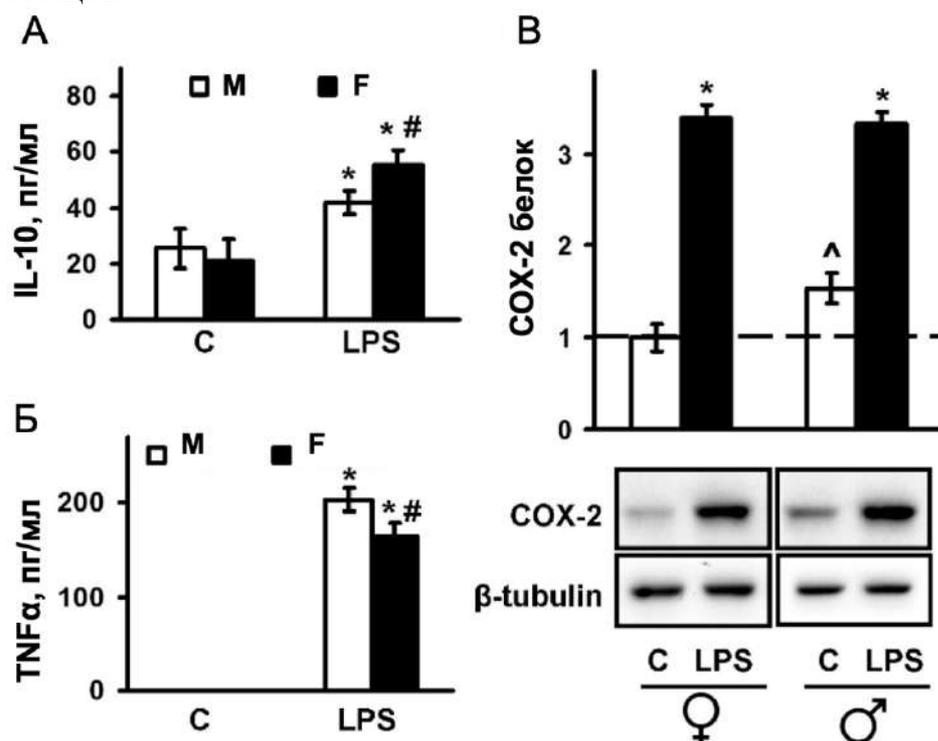


**Рис. 3.7.** Сравнение культур астроцитов, полученных от самцов и самок крыс. (А) Репрезентативные изображения иммунофлуоресценции, показывающие морфологию и чистоту клеточных культур астроцитов самок (F) и самцов (M). Культуры фиксировали 3% параформальдегидом и инкубировали с DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол, синий), OX-42 (анти-CD11b/c антитело OX-42, красный) и GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок, зеленый). (Б) Пример электрофореза продуктов ПЦР в агарозе (2%). Образцы, полученные из хвостов самцов, имеют два продукта (крайние полосы), а из хвостов самок - один продукт (центральные полосы). (В) Сравнение базальных уровней TNFα и IL-10 измеренных методом ИФА в супернатанте (самцы, M, белые столбы и самки, F, черные столбы). Значения представляют собой среднее ± СО из трех независимых экспериментов, проведенных в трех экземплярах.

Ранее сообщалось, что эстроген влияет на синтез цитокинов в мозге [263]. Поэтому были сравнены базальные уровни провоспалительного медиатора TNFα и противовоспалительного цитокина IL-10 в астроцитах из самцов и самок, однако статистически значимых различий в базальных уровнях этих цитокинов между клетками, полученными от детенышей противоположных полов, обнаружено не было (Рис. 3.7В).

Ранее сообщалось, что уровни мРНК провоспалительных цитокинов (IL-6, TNFα, и IL-1β) после обработки LPS были выше в астроцитах самцов, чем в астроцитах самок мышей [264], поэтому сравнили интенсивность про-

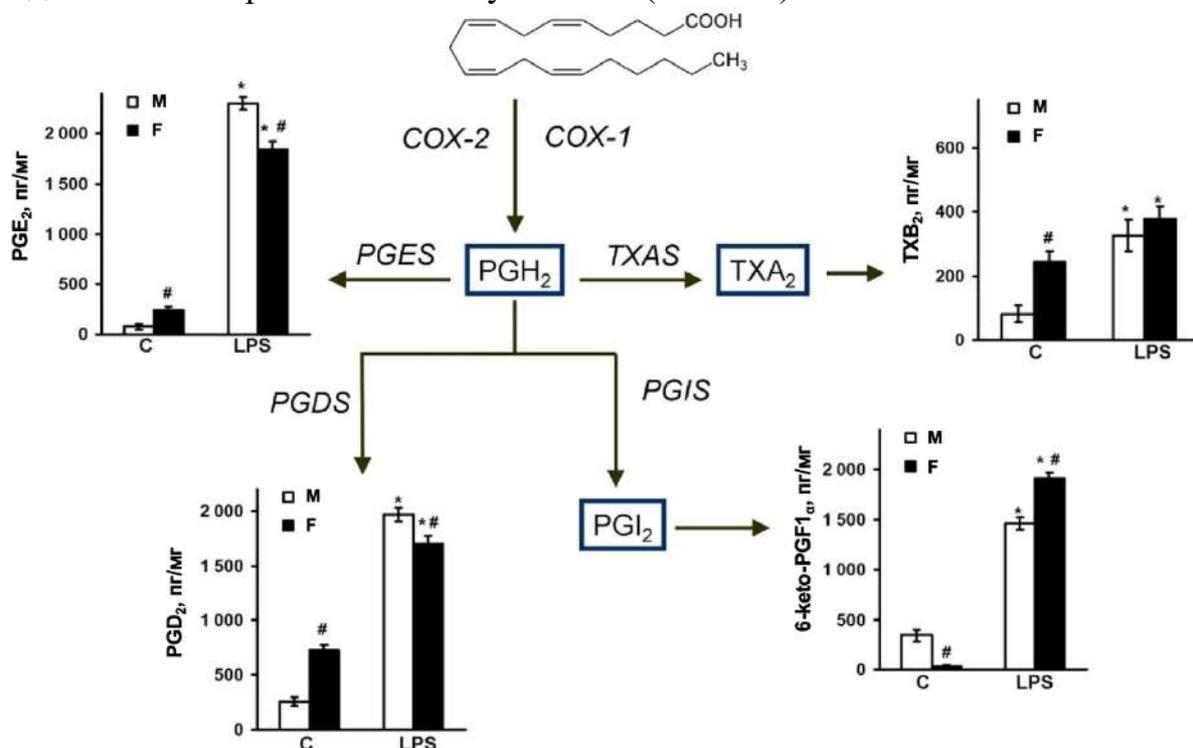
и противовоспалительной сигнализации астроцитов после стимуляции LPS (100 нг/мл, 4 ч) в культурах самцов и самок: различия в уровнях высвобождения TNF $\alpha$  и IL-10 (Рис. 3.8А,Б), а также внутриклеточного белка COX-2 (Рис. 3.8В). Действительно, уровень провоспалительного медиатора TNF $\alpha$  был выше в астроцитах самцов по сравнению с самками (Рис. 3.8Б), что совпадает с ранее представленными данными [264]. В то же время уровень противовоспалительного цитокина IL-10 (Рис. 3.8А) был повышен в астроцитах самок по сравнению с клетками, полученными от самцов.



**Рис. 3.8.** Влияние пола на экспрессию фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ), циклооксигеназы (COX-2) и интерлейкина-10 (IL-10) во время острого воспаления. Культуры астроцитов самцов (M, белые столбы) и самок (F, черные столбы) обрабатывали в течение 4 ч LPS (100 нг/мл), затем концентрации IL-10 (А) и TNF $\alpha$  (Б) измеряли методом ИФА в образцах супернатантов. Результаты представлены как среднее  $\pm$  СО из трех независимых экспериментов, проведенных в трех экземплярах. (В) Уровень белка COX-2 измеряли методом вестерн-блоттинга. Изображение является репрезентативным для трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, #  $p < 0,05$  по сравнению с указанными столбиками (влияние пола), ^ $p < 0,05$  по сравнению с базальными уровнями белка COX-2 у самцов.

Таким образом, существуют различия в ответах астроцитов, полученных из самцов и самок, при активации TLR4, хотя не наблюдается изменения морфологии клеток, оцениваемой по маркерам. Астроциты из самцов более ярко отвечают высвобождением провоспалительного цитокина TNF $\alpha$ , в то время как астроциты из самок выбрасывают больше противовоспалительного цитокина IL-10.

Интересным результатом было обнаружение повышенного содержания фермента COX-2 в нативных астроцитах, полученных из самцов (Рис. 3.8В), хотя уровень экспрессии этого маркера воспалительного ответа, отвечающего за синтез простаноидов, не отличался при стимуляции LPS (Рис. 3.8В). Поэтому было оценено, как меняется уровень оксилипинов в данных экспериментальных условиях (Рис. 3.9).



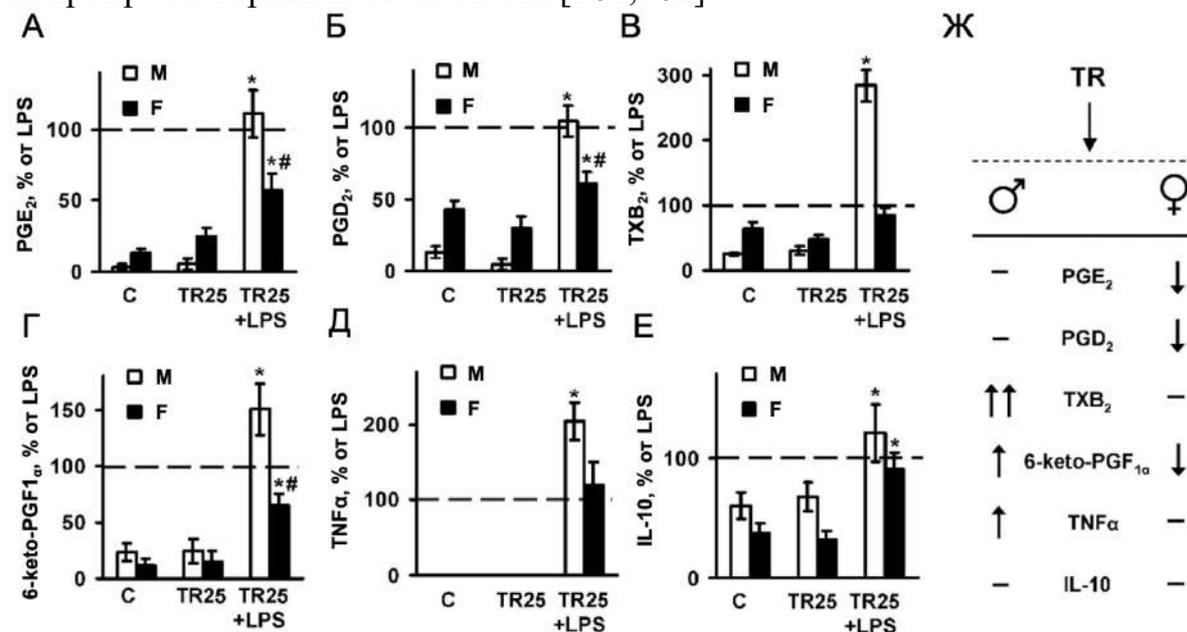
**Рис. 3.9.** Влияние пола животного на LPS-стимулированное высвобождение астроцитами PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> и 6-keto-PGF<sub>1α</sub>. Культуры астроцитов, выделенные из самцов (M) и самок (F) обрабатывали LPS (100 нг/мл, 4 часа) и анализировали концентрацию простагландинов в культуральной среде. Результаты представлены в виде схемы метаболического пути с промежуточными медиаторами (синяя рамка) и ферментами (над линиями, представляющими химические реакции). Значения представлены как среднее ± CO из трех независимых экспериментов, проведенных в трех экземплярах. \* p < 0,05 по сравнению с нативными клетками, # p < 0,05 по сравнению с указанными столбиками (половая разница). Сокращения: С - контроль; COX-циклооксигеназа; TXAS-тромбоксан А синтаза; PGES-простагландин Е синтаза; PGDS-простагландин D синтаза; PGIS-простагландин I синтаза.

На Рис. 3.9 представлена общая схема метаболизма арахидоновой кислоты с участием циклооксигеназ (COX). Нами получено, что астроциты самок вырабатывают больше PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> и PGD<sub>2</sub> и меньше 6-keto-PGF<sub>1α</sub> в базальных условиях по сравнению с астроцитами самцов (рис. 3.9). LPS вызывал значительное увеличение синтеза в обоих видах культур, однако высвобождение PGE<sub>2</sub> и PGD<sub>2</sub> было выше в астроцитах самцов, а уровень 6-keto-PGF<sub>1α</sub> был выше в астроцитах самок (рис. 3.9). Уровень TXB<sub>2</sub> не

различался. Таким образом, было выявлено заметное влияние пола на синтез простагландинов.

### 3.1.2.2 Модуляция синтеза простагландинов астроцитов с помощью трилостана, конкурентного ингибитора $3\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы.

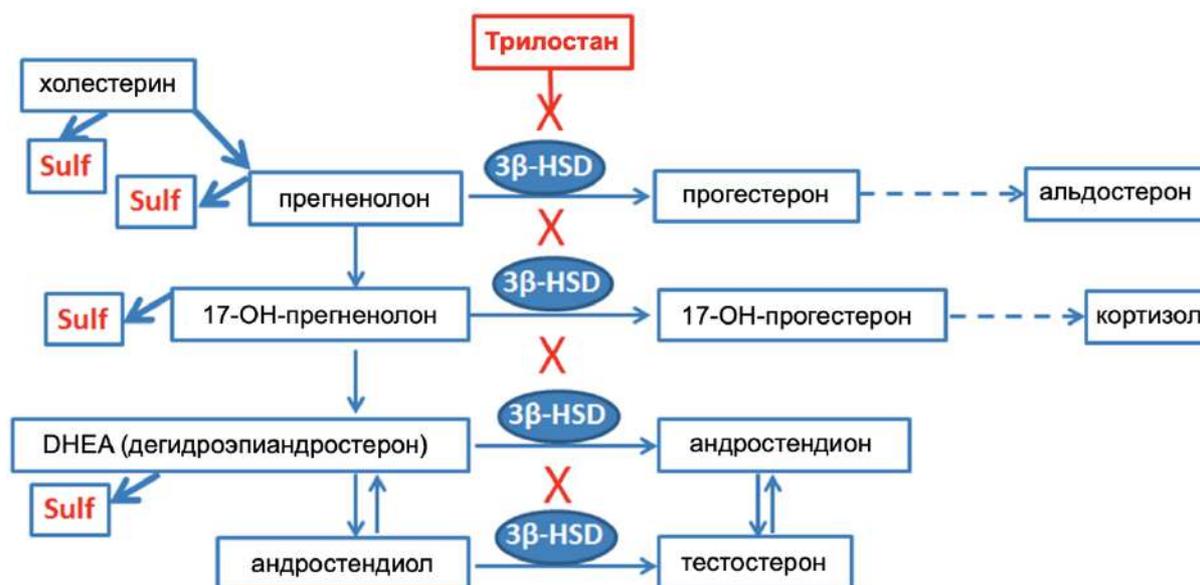
Чтобы оценить возможность регуляции зависящих от пола LPS-индуцированных воспалительных реакций астроцитов, было проверено, может ли трилостан, конкурентный ингибитор  $3\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы ( $3\beta$ -HSD) [265], дифференциально модулировать LPS-индуцированные реакции астроцитов, полученных от самцов и самок крыс (Рис. 3.10).  $3\beta$ -HSD является ключевым ферментом, катализирующим превращение прегненолона, дегидроэпиандростерона (DHEA) и других предшественников в прегненолон, андростендион и другие активные вещества, которые обладают противовоспалительными и нейропротекторными свойствами [161,162].



**Рис. 3.10. Различия действия трилостана на острый воспалительный ответ астроцитов самцов и самок.** Астроциты предварительно обрабатывали в течение 0,5 ч трилостаном (TR, 25 мкМ), а затем стимулировали LPS в течение 4 ч. (А-Г) Концентрации простагландинов в супернатантах; (Д,Е) изменения в уровнях высвобождения TNFα и IL-10 в клеточных супернатантах; (Ж) схема, суммирующая различия в синтезе простагландинов и высвобождении TNFα и IL-10 в астроцитах, полученных из самцов и самок при стимуляции LPS (↑: повышенное высвобождение, ↑↑: сильно повышенное высвобождение, ↓: пониженное высвобождение, -: отсутствие эффекта). Обработка LPS принималась за 100%. Белые столбики обозначают культуру астроцитов полученную из самцов, черные столбики - самок. Значения представлены как среднее ± СО из трех независимых экспериментов, проведенных в трех экземплярах. \* p < 0,05 по сравнению с нативными клетками, # p < 0,05 по сравнению с указанными столбиками (различие пола).

Трилостан не влиял на уровень TNF $\alpha$  у самок, но потенцировал высвобождение TNF $\alpha$  у самцов (рис. 3.10Д). Исследуемый препарат не влиял на LPS-индуцированное высвобождение IL-10 (Рис. 3.10Е). Трилостан потенцировал высвобождение PGD $_2$  (Рис. 3.10Б) и 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  (Рис. 3.10Г) в ответ на LPS в астроцитах самцов и, напротив, снижал продукцию 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  (Рис. 3.10Г) в культурах самок. LPS-индуцированный синтез PGE $_2$  (Рис. 3.10А), PGD $_2$  (Рис. 3.10Б) и 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  (Рис. 3.10Г) был снижен предварительной обработкой трилостаном.

Из анализа результатов следует: 1) подтверждение наблюдаемых различий в ответе на LPS в зависимости от пола; 2) возможность регуляции этих различий; 3) возможность использования трилостана в регуляции воспалительных процессов в ЦНС. Полученные данные подтверждают потенциальную возможность использования трилостана в качестве вещества с противовоспалительными, антидепрессивными и анксиолитическими свойствами [266]. Действительно, стероидогенные и ферменты метаболизирующие стероиды, расположенные в периферических тканях-мишенях, были предложены в качестве мишеней для новых методов лечения заболеваний, чувствительных к действию стероидов [267]. Астроциты считаются активными стероидогенными клеткам и [159]. Они вырабатывают ферменты холестеринавого и стероидного метаболизма (Рис. 3.11), чувствительные к действию прегненолона, 17-ОН-прегненолона, ДНЕА (дегидроэпиандростерона), прогестерона и других гормонов [161,162,268]. Хотя это не было проверено напрямую в рамках данного исследования, можно предположить, что трилостан смещает количество метаболитов в левую сторону в реакциях, представленных на Рис. 3.11. Это предположение подтверждается данными о том, что прием трилостана снижал уровень прогестерона и увеличивал прегненолон, а также повышал уровень ДНЕА и ДНЕА-сульфата в мозге различных животных, в соответствии с тем, что можно было бы ожидать при ферментативном ингибировании и изменении соотношения субстрата и продукта [266,269].



**Рис. 3.11.** Метаболизм нейроактивных стероидов в астроцитах и роль трилостана как конкурентного ингибитора  $3\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы ( $3\beta$ -HSD), ключевого фермента стероидных превращений. "Sulf" означает сульфатные метаболиты веществ, "X" - блокирующий эффект трилостана, прямые стрелки соединяют субстраты и метаболиты, а пунктирные стрелки указывают на участие нескольких ферментативных превращений (адаптировано из [269]).

Важным результатом исследования является то, что в исследуемой модели клеточного воспалительного ответа астроциты самцов и самок не имеют различий в нативном состоянии, но отличаются в своих ответах на воспалительный стимул. Эта клеточная модель может быть предложена для тестирования различных веществ, направленных на процессы, опосредованные полом. Было показано такое влияние пола на ответ для трилостана, противовоспалительного препарата с антидепрессивными свойствами [266]. Важно подчеркнуть, что не было обнаружено различий в уровнях про- и противовоспалительных маркеров в нативных клетках. Это означает, что стероидогенные регуляторные пути обнаруживают влияние пола только в процессе ответа на внешние стимулы.

Представляется рациональным, что противовоспалительный цитокин IL-10 в большей степени выражен в астроцитах, выделенных из самок, что может проявляться в чувствительности женщин к заболеваниям с воспалительной компонентой. Примечательно, что ранее сообщалось о половых различиях в реакции астроцитов на митохондриальный токсин 1-метил-4-фенил-пиридин, используемый для моделирования симптомов болезни Паркинсона [270]. Полученные нами данные позволяют

рекомендовать учитывать половые различия в будущих исследованиях, посвященных проблеме воспаления в мозге.

Важный вывод, сделанный на основании полученных данных, касается половых различий в LPS-индуцированном синтезе простагландинов (PG). Интересно, что различия в базальных уровнях простагландинов и их синтезе при стимуляции LPS были показаны для нейтрофилов человека [163], т.е. в дополнение к этим данным с нейтрофилами, наша работа с астроцитами позволяет предположить, что такие различия могут являться общим свойством системы врожденного иммунитета: зависимость ответа от пола. Это предположение требует дальнейших исследований. Проведенные исследования показывают, что воспалительные процессы в ткани мозга зависят от метаболизма стероидов в организме.

В целом, полученные результаты расширяют предыдущие наблюдения за половыми различиями в ответах астроцитов и включают не только цитокины, но и метаболизм арахидоновой кислоты, указывая на важность учета полового диморфизма при анализе эффектов этих молекул и родственных противовоспалительных веществ как *in vitro*, так и *in vivo*. Полученные данные показывают важный факт, что клетки не иммунного происхождения, астроциты, также дают различный ответ при активации системы врожденного иммунитета, при этом у самок более выражен синтез IL-10, который относят к факторам разрешения воспаления.

В дальнейшем были использованы клеточные модели, при получении которых использовали одинаковое количество эмбрионов из самцов и самок, чтобы нивелировать различия, поскольку вопросы исследования носили более общий характер.

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

Посттранскрипционный уровень контроля активно участвует в регулировании процесса воспаления. Важным этапом такой регуляции является модуляция скорости деградации мРНК (см. Литобзор 2.5.3). Характеристика этого этапа в астроцитах до недавнего времени оставалась в тени. Ранее было показано, что стимуляция LPS изменяет скорость деградации мРНК нескольких генов в астроцитах, связанных с ответами клеток на провоспалительные стимулы [117]. Важными участниками

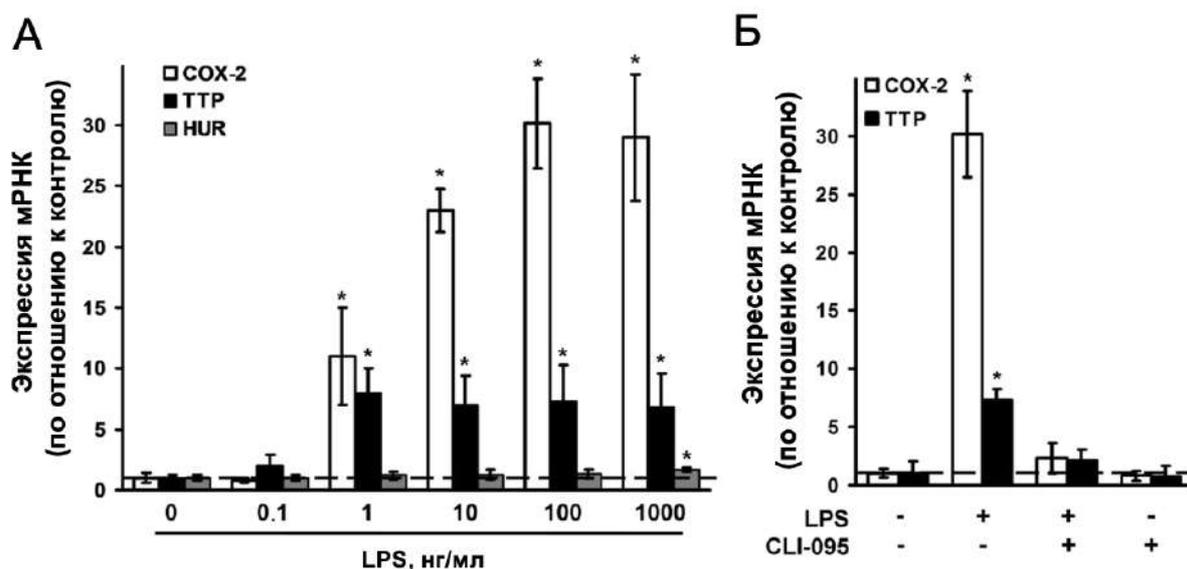
регуляции скорости деградации мРНК являются ARE-связывающие белки HuR и TTP, однако их участие в ответах астроцитов на провоспалительные стимулы было непонятно. Поэтому было детально исследовано поведение белков HuR и TTP в астроцитах при провоспалительной стимуляции. При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [255, 253].

### **3.1.3.1 мРНК TTP, но не мРНК HuR, повышается при провоспалительной стимуляции**

Ранее было показано, как стимуляция астроцитов тромбином, АТФ, а также агонистами рецепторов TLR2 (пептидогликан), TLR4 (LPS) и TLR5 (флагеллин) влияет на экспрессию мРНК генов HUR и TTP (Таблица 3.1 и Таблица 3.2 из раздела 3.1.1 комплексной характеристики воспалительного ответа на астроцитах). Вкратце, уровень мРНК HuR не изменялся ни при одной из этих стимуляций (Таблица 3.1 и Таблица 3.2). Все стимулы, за исключением флагеллина, индуцировали TTP на уровне экспрессии мРНК (Таблица 3.1 и Таблица 3.2). Полученные данные показали, что уровень мРНК TTP увеличивался примерно в 14 раз через 1 ч после обработки LPS и оставался значительно повышенным через 4 ч. Уровень мРНК HuR оставался неизменным через оба выбранных периода времени (Таблица 3.1 и Таблица 3.2). Примечательно, что уровень изменения TTP, по-видимому, соответствовал характеру экспрессии COX-2, индуцированной различными стимулами (Таблица 3.1 и Таблица 3.2). Другими словами, интенсивность воспаления, по-видимому, определяла интенсивность экспрессии TTP. Для того чтобы проверить эту гипотезу, была проанализирована связь между различными концентрациями LPS, используемыми для инициации воспаления, и уровнем мРНК TTP. Полученные результаты показали, что экспрессия мРНК TTP была чувствительна к концентрации LPS. Действительно, LPS в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 нг/мл вызывал одинаковое увеличение мРНК TTP.

HuR не был чувствителен к действию LPS, за исключением того, что 1 мкг/мл LPS вызывал небольшое повышение уровня экспрессии HuR (Рис. 3.12А), что указывает на то, что этот фактор не регулируется на уровне транскрипции при нормальном провоспалительном событии, но может быть активирован в условиях чрезмерного воспаления.

Обработка клеток антагонистом TLR4 CLI-095 снимало LPS-стимулированное увеличение экспрессии мРНК TTP (Рис. 3.12Б). Таким образом, изменение экспрессии TTP на уровне мРНК в астроцитах при стимуляции LPS было опосредовано TLR4.

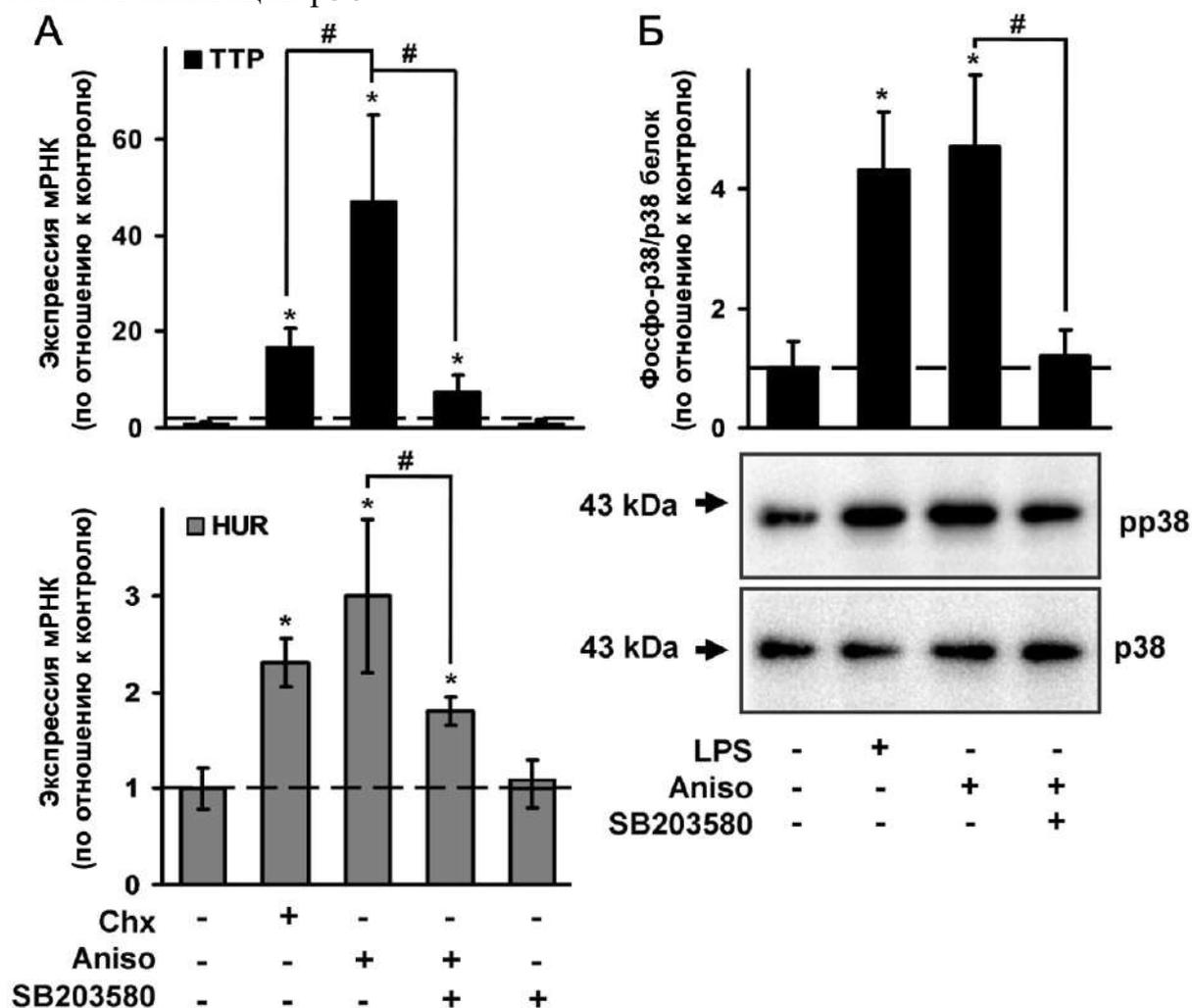


**Рис. 3.12.** LPS стимулирует экспрессию мРНК COX-2 и TTP, но не HuR. (А) Астроциты стимулировали LPS (0, 0,1, 1, 10, 100 или 1000 нг/мл) в течении 4 часов. (Б) Клетки обрабатывали антагонистом TLR4 CLI-095 (5 мкМ) и через 30 мин стимулировали LPS (100 нг/мл, 4 ч). Уровни мРНК COX-2, TTP и HUR определяли методом RT-PCR в реальном времени. Пунктирными линиями показаны уровни мРНК соответствующих генов в необработанных астроцитах; данные представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками.

### 3.1.3.2 Фосфорилирование p38 регулирует экспрессию мРНК TTP и HuR

Для макрофагов и других типов клеток хорошо известно, что экспрессия и активность TTP, а также HuR регулируются посредством p38-зависимого фосфорилирования [182,183]. Поэтому была проверена роль этого сигнального пути в регуляции HuR и TTP в астроцитах (Рис. 3.13А). Было изучено действие анизомицина, активатора p38, и SB203580, ингибитора активации p38 [117]. Эффективность обработки анизомицином и SB203580 контролировали по их влиянию на уровень фосфорилирования p38. Результаты, представленные на Рис. 3.13, свидетельствуют о том, что фосфорилирование p38 участвует в регуляции мРНК TTP и HuR. Обработка анизомицином вызывала приблизительно 50-кратное увеличение уровня мРНК TTP и 3-кратное увеличение уровня мРНК HuR (Рис. 3.13А). Для обоих исследуемых РНК-связывающих белков эти эффекты анизомицина лишь частично подавлялись SB203580 (Рис. 3.13Б), в то время как используемая концентрация ингибитора полностью подавляла анизомицин-

индуцированное фосфорилирование (Рис. 3.13Б). Известно, что помимо активации фосфорилирования, анизомицин может подавлять синтез белка [272]. Поэтому было сравнено влияние анизомицина на экспрессию мРНК ТТР и HuR с действием циклогексимида, другого ингибитора синтеза белка, который не влияет на p38 [273] (Рис. 3.13А). Действительно, циклогексимид вызывал примерно 20-кратное увеличение уровня мРНК ТТР и 1,7-кратное повышение уровня HuR. Эти данные показывают, что регуляция уровней мРНК ТТР и HuR в астроцитах зависит как от ингибирования синтеза белка, так и от активации p38.

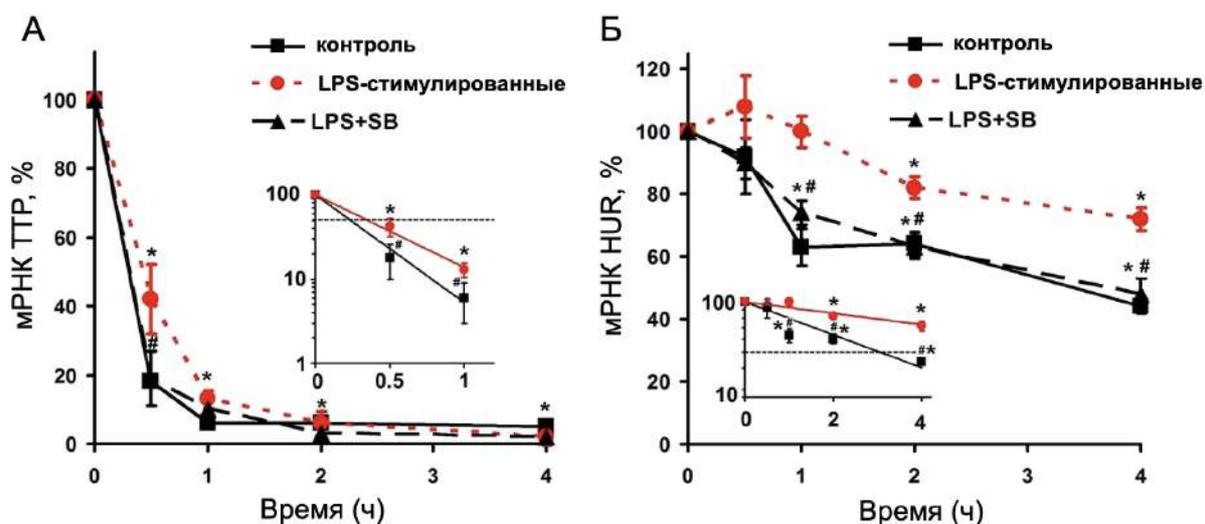


**Рис. 3.13.** Влияние анизомицина, циклогексимида и SB203580 на экспрессию мРНК ТТР и HuR. Астроциты стимулировали в течение 4 ч циклогексимидом (Chx; 5 мкг/мл), анизомицином (Aniso; 1 мкг/мл), ингибитором p38 MAPK SB203580 (20 мкМ) или комбинациями SB203580 и анизомицина (SB203580 наносили за 15 мин до анизомицина). (А): Уровни мРНК ТТР и HuR были определены с помощью RT-PCR в реальном времени. (Б) Изменение фосфорилирования p38. Пунктирные линии показывают соотношения в необработанных астроцитах как среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками.

### 3.1.3.3 Экспрессия мРНК ТТР и HuR посттранскрипционно регулируется в ответ на действие LPS

Известно, что мРНК ТТР и HuR сами содержат ARE и посттранскрипционно регулируются собственными белковыми продуктами в клетках миелоидного происхождения [176,274]. Для того чтобы проверить, регулируется ли скорость распада ТТР и HuR в астроцитах, обработанных LPS, был применен обычный протокол анализа деградации мРНК с использованием актиномицина D, ингибитора транскрипции [275]. Актиномицин D образует с ДНК устойчивый комплекс, препятствующий раскручиванию двойной спирали ДНК и тем самым подавляющий активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Актиномицин D широко используется в анализах стабильности мРНК для подавления синтеза новой мРНК, что позволяет оценить степень распада мРНК путем измерения количества мРНК после ингибирования транскрипции.

Мы обрабатывали клетки LPS в течение 1 ч, а затем добавляли актиномицин D (5 мкМ) в течение различных периодов времени - 0,5, 1, 2 и 4 ч - и определяли уровни мРНК HuR и ТТР (Рис. 3.14). Чтобы проверить, участвует ли р38-зависимое фосфорилирование в обороте мРНК ТТР и HuR, некоторые клетки также обрабатывали SB203580 в течение 15 минут перед стимуляцией LPS. Контрольные условия включали обработку актиномицином D без предварительной обработки LPS. В каждом случае уровни мРНК в клетках до добавления актиномицина D принимали за 100%. Периоды полураспада определяли как временные точки, когда в клетках оставалось только 50% от исходного уровня мРНК (вставки Рис.3.14). Получено, что мРНК ТТР сравнительно нестабильна и достигает точки полураспада примерно через 20 мин после ингибирования транскрипции актиномицином D (Рис. 3.14А, сплошная линия). С другой стороны, мРНК HuR стабильна и деградирует до половинного уровня только через 3 ч после применения актиномицина D (Рис. 3.14Б, сплошная линия). Обе мРНК стабилизируются при обработке LPS в условиях воспаления (Рис. 3.14А и Б, красные линии). Влияние LPS на скорость распада мРНК в обоих случаях отменялось при обработке SB203580, ингибитором р38 (Рис. 3.14А и Б, пунктирная черная линия). Таким образом, ТТР и HuR стабилизируются в ходе ранних этапов воспаления, и эта стабилизация включает активацию р38.

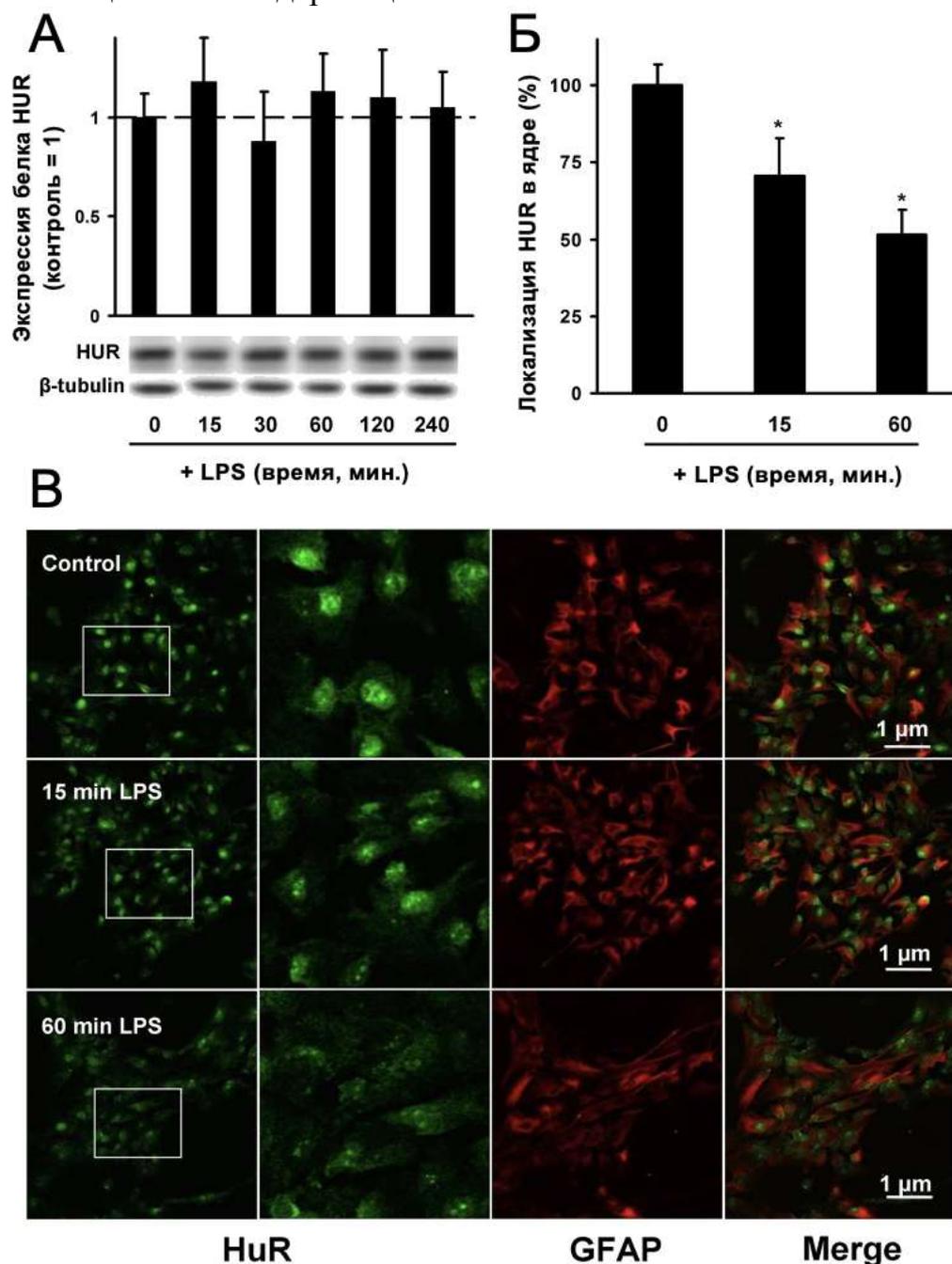


**Рис. 3.14.** Модуляция деградации мРНК ТТР и HuR ингибитором p38 MAPK и стимуляцией LPS. Астроциты оставляли без дополнительных стимуляций (черная линия, уровень экспрессии принимали за 100%), или предварительно обрабатывали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 1 ч (пунктирная красная линия, уровень экспрессии принимали за 100%) или SB (SB 203580, 20 мкМ) + липополисахарид (LPS, 100 нг/мл) LPS (пунктирная линия, уровень экспрессии принимали за 100%). Затем клетки инкубировали с актиномицином D (5 мкг/мл). мРНК собирали в различные временные точки, указанные на графиках. Вставки: полулогарифмическое представление временных кривых начальной стадии деградации мРНК в логарифмической координате по оси Y. Уровни мРНК ТТР (А) и мРНК HuR (Б) были определены методом RT-PCR в реальном времени. Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению со 100%, взятыми для обоих - нативных и LPS-стимулированных клеток, # $p < 0,05$  по сравнению с астроцитами после обработки LPS в указанных периодах.

### 3.1.3.4 Регуляция HuR на уровне белка

На макрофагах и некоторых типах клеток опухолевого происхождения было показано, что изменение уровня мРНК HuR сопровождается повышением уровня белка [178,179,181]. Хотя не наблюдалась модуляция экспрессии мРНК HuR, было проверено: 1) существует ли какой-либо детектируемый уровень белка HuR в астроцитах; 2) происходит ли транслокация белка HuR из ядра в цитозоль в астроцитах, как это было показано ранее для макрофагов и других клеток [177,180]. Повышения уровня белка HuR при обработке LPS (100 нг/мл) не наблюдали (Рис. 3.15А). Тем не менее, после стимуляции LPS наблюдали перераспределение белка HuR между ядром и цитоплазмой (Рис. 15Б). В необработанных клетках белок HuR накапливался в основном в ядрах клеток, через 15 мин после стимуляции LPS плотность иммуноокрашивания HuR в ядрах уменьшилась, что свидетельствует о транслокации белка в цитоплазму. Этот эффект стал еще более выраженным после 60 мин обработки LPS: в этот момент не было обнаружено различий в иммуноокрашивании HuR в ядрах и цитоплазме клеток. Таким образом,

экспрессия белка HuR не изменяется при стимуляции LPS, однако меняется его внутриклеточная локализация и, таким образом, он может участвовать в стабилизации ARE-содержащей мРНК.

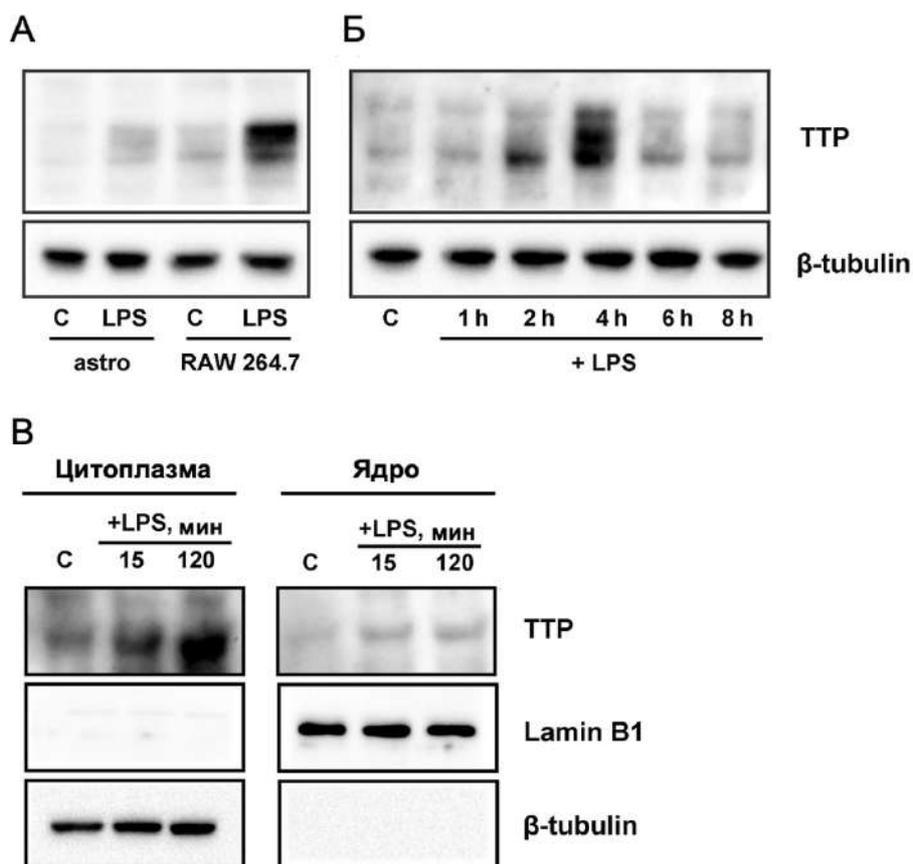


**Рис. 3.15.** Регуляция HuR на уровне белка. (А) Уровни белка HuR в клетках определяли методом вестерн-блота в указанные сроки после воздействия на клетки LPS (100 нг/мл). Значения были нормализованы к уровню белка  $\beta$ -тубулина. Количественные результаты были получены в трех независимых экспериментах. На Рис. показан репрезентативный блот. (Б) Транслокация HuR из ядра в цитозоль после обработки LPS (100 нг/мл) в течение 15 или 60 мин. За 100% принят уровень локализации HUR в ядре в необработанных клетках. (В) Репрезентативные изображения иммунофлуоресценции, показывающие влияние LPS на перераспределение HuR между ядром и цитоплазмой.

### 3.1.3.5 Регуляция TTP на уровне белка

Показано, что LPS стимулирует экспрессию белка TTP в различных макрофагах, включая мышинные макрофаги линии J774, человеческие макрофаги THP-1 и культуру макрофагов, полученную из костного мозга [276,277]. О различии между уровнями мРНК и белка ранее сообщалось для тучных клеток, полученных из костного мозга [278]. Экспрессия белка TTP в астроцитах ранее не была продемонстрирована. Поэтому было изучено, как влияет LPS на экспрессию белка TTP в астроцитах (Рис. 3.16А) и оценили связь между временем обработки LPS и уровнем белка TTP (Рис. 3.16Б). Получено, что уровень белка TTP был самым высоким через 4 ч и вернулся к своему базальному уровню через 8 ч после стимуляции LPS (Рис. 3.16Б).

Чтобы оценить, с какой скоростью TTP транслоцируется из цитоплазмы в ядро при провоспалительной обработке в астроцитах, клетки подвергали воздействию LPS в течение 15 или 120 мин; цитоплазматические фракции и ядерные фракции разделили и анализировали уровни TTP, ламина В и  $\beta$ -тубулина. Получено, что, хотя наблюдается повышение уровня TTP в цитоплазме через 15 и 120 мин после обработки LPS, транслокации TTP между цитоплазмой и ядром в указанные временные точки не наблюдается (Рис. 3.16В). Это указывает на то, что астроциты экспрессируют TTP и повышают его экспрессию при стимуляции LPS, накапливая белок в цитоплазме после кратковременного воздействия LPS. Данные позволяют предположить, что регуляция на посттранскрипционном уровне является значимой для развития ответов астроцитов на активацию TLR. Такое исследование на клетках не миелоидного происхождения было проведено впервые.



**Рис. 3.16.** Регуляция ТТР на уровне белка. (А) Стимуляция LPS увеличивает экспрессию белка ТТР в клетках RAW 264.7 и астроцитах. Клетки стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч, или оставляли без обработки (С). Клеточный лизат RAW 264.7 использовался в качестве положительного контроля. (Б) Астроциты обрабатывали 100 нг/мл LPS в течение 1, 2, 4, 6 или 8 ч и экспрессию белка ТТР определяли методом вестерн-блоттинга. (В) Субклеточное фракционирование после 15 и 120 мин обработки LPS. Астроциты подвергали воздействию LPS в течение 15 и 120 мин или оставляли без обработки для контрольных образцов (С), затем клетки лизировали и разделяли на цитоплазматическую и ядерную фракции, где уровни ТТР,  $\beta$ -тубулина и ламина В анализировали методом иммуноблоттинга. Результаты являются репрезентативными для трех аналогичных экспериментов.

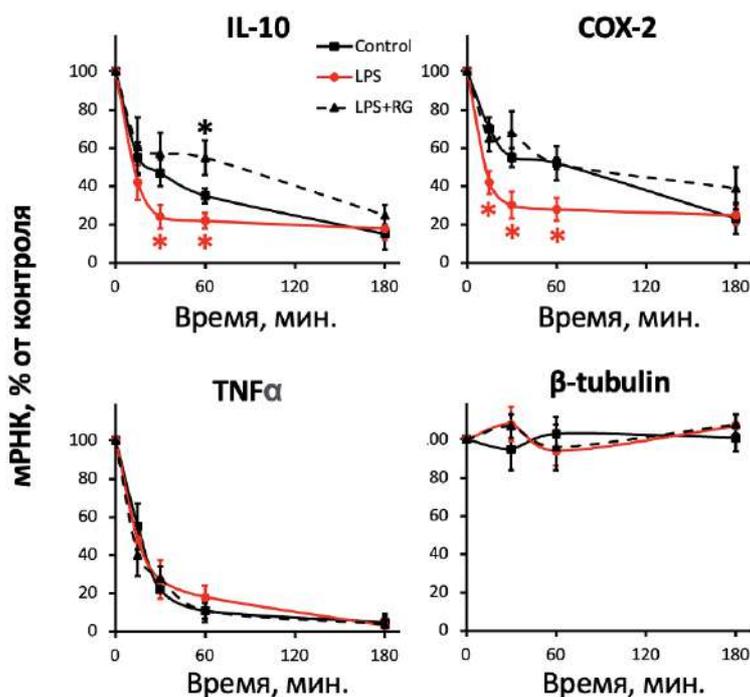
### 3.1.3.6 Розиглитазон препятствует дестабилизации мРНК IL-10 и COX-2 при TLR4-стимулированном клеточном ответе

В фокусе исследований находится посттранскрипционная регуляция генов, участвующих в воспалительной реакции, поскольку скорость их распада (в том числе мРНК COX-2, TNF $\alpha$  и IL-10) меняется в ответ на различные стимулы [120]. Однако до настоящего момента не была продемонстрирована регуляция экспрессии этих генов через изменение скорости деградации мРНК в астроцитах. Ранее было показано, что экспрессия COX-2 регулируется на уровне стабильности мРНК в

астроглиальной линии опухолевых клеток крысы С6 после обработки LPS и росиглитазоном [279]. Поэтому в данной серии экспериментов было исследовано, как росиглитазон влияет на стабилизацию мРНК других генов воспалительного ответа.

Для этого были определены изменения в уровне мРНК IL-10, COX-2 и TNF $\alpha$  в присутствии ингибитора транскрипции актиномицина-D (по методике, описанной выше) после стимуляции с LPS и росиглитазоном (Рис. 3.17). Скорость распада мРНК  $\beta$ -тубулина использовалась в качестве контроля, так как этот ген не участвует непосредственно в пути передачи сигнала при активации TLR.

Показано, что LPS дестабилизирует мРНК COX-2 и IL-10 (Рис. 3.17). Предварительная обработка клеток росиглитазоном стабилизировала вызванное LPS снижение времени полужизни мРНК COX-2 и IL-10. Следовательно, увеличение LPS-индуцированной экспрессии COX-2 и IL-10, вызванное росиглитазоном, может быть опосредовано стабилизацией мРНК. После стимуляции LPS (с предварительной обработкой клеток росиглитазоном или без нее) значительных изменений в стабильности мРНК TNF $\alpha$  по сравнению с необработанными клетками не наблюдалось. Эти данные позволяют предположить, что росиглитазон участвует в посттранскрипционной регуляции экспрессии IL-10 и COX-2 в астроцитах, стимулированных LPS, и таким образом может повысить доступность мРНК этих генов для синтеза белка. Это может приводить к увеличению количества противовоспалительных агентов на поздних стадиях воспалительной реакции. Полученные данные указывают на новый эффект росиглитазона: он не подавляет провоспалительную реакцию (экспрессию TNF $\alpha$ ), а стимулирует разрешение воспаления (путем повышения экспрессии IL-10 и COX-2).



**Рис. 3.17.** Влияние розиглитазона (RG) и LPS на скорость деградации мРНК IL-10, COX2, TNFα и β-тубулина. Клетки предварительно обрабатывали в течение 30 мин RG (10 мкМ) и затем стимулировали LPS (100 нг/мл, 1 ч). После стимуляции клетки инкубировали с актиномицином D (5 мкг/мл) в течение 15, 30, 60 или 180 мин. Уровни мРНК определяли методом RT-PCR в реальном времени, значения нормированы на уровень мРНК в клетках до добавления актиномицина D (\*p < 0,05 по сравнению с нативными клетками).

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

Любой стимул вызывает изменения в клеточном ядре, увеличение или уменьшение транскрипции генов, участвующих в ответе. Насколько это воздействие “перепрограммирует” клетки, пока не ясно. Обработку до 12 часов рассматривали как “острый” ответ, а обработку клеток более 24 часов — как длительный. Предполагается, что они адаптировались к действию обработки, и если на такие клетки воздействовать стимулом, эта адаптация будет проявляться в ответе.

Исследовали следующие адаптации: 1) нормальная (NG, 5 мМ) и повышенная (HG, 22,5 мМ) концентрация 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) эндотоксинового

хронического воспаления, 3) терапевтического воздействия противовоспалительных цитокинов, 4) изменения внеклеточного матрикса при воспалении. Эти модели дали возможность охарактеризовать профили оксилипинов и изучить изменения воспалительных ответов астроцитов при адаптациях.

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

Хотя уже давно указывали на существование взаимосвязи воспалительных и метаболических процессов в мозге [192], только недавно эти связи оказались в центре внимания исследований на уровне сигнальных путей, и были предложены различные экспериментальные клеточные модели гипергликемии [148,193,194]. Было продемонстрировано ухудшение функций астроцитов на клеточном уровне, в частности, ухудшение функционирования клеточных контактов и снижение индукции окислительного стресса [148,149,193] при воздействии высокой глюкозы.

Клеточные модели адаптации к различным концентрациям глюкозы начали исследовать относительно недавно (см. Литобзор п.1.5.4). Ранее первичные клетки обычно культивировали с высокой концентрацией глюкозы (22,5 мМ), поскольку они лучше растут при данных условиях. Однако, как показали проведенные исследования, адаптация к высоким концентрациям глюкозы ведет к изменениям в ответах клеток на активацию системы врожденного иммунитета. При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [249, 280].

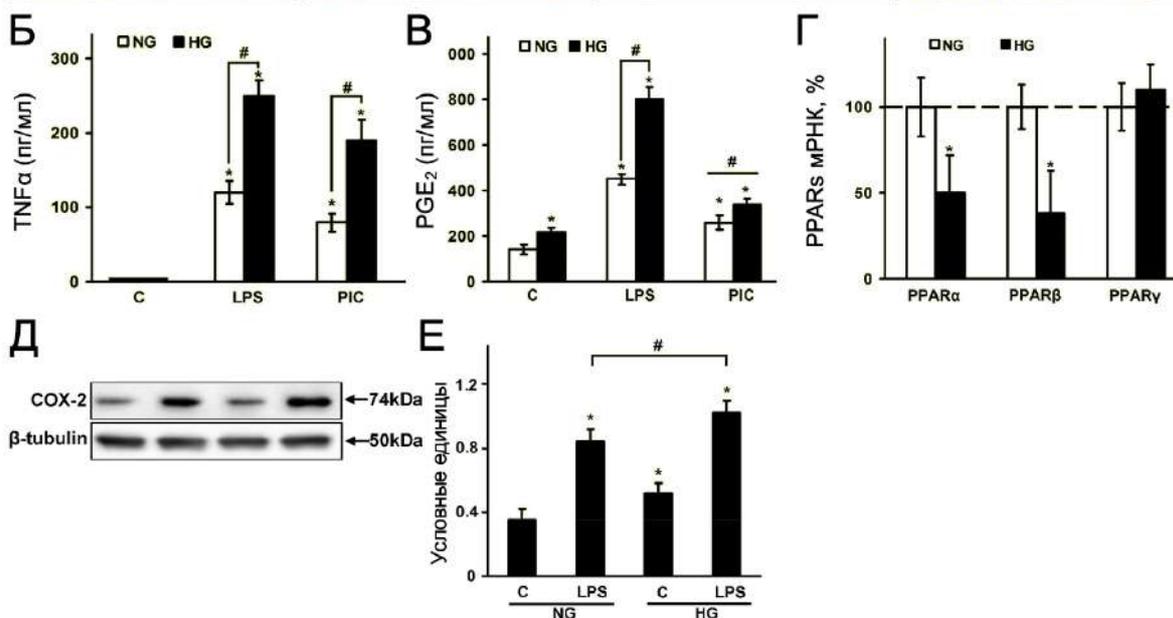
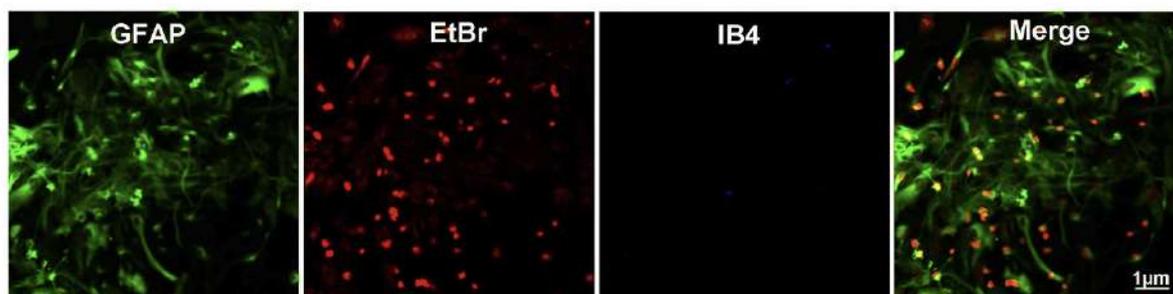
#### **3.2.1.1 Сравнение клеток, в течении 48 часов адаптированных к действию нормальной (5 мМ) и повышенной (22,5 мМ) концентрации глюкозы**

Астроциты содержат три типа ядерных рецепторов PPAR, которые связывают процессы метаболизма и ответы на воспалительные стимулы [199]. Поэтому изменение уровня экспрессии мРНК PPAR было использовано как маркер пересечения воспалительных и метаболических сигнальных путей. Целью исследования в данной серии экспериментов было изучение связи между TLR и сигнальными путями p38 и JNK MAPK

в астроцитах крысы, культивируемых в среде с “нормальной” (5,5 мМ; NG) и “высокой” (22,5 мМ, HG) концентрацией глюкозы. Клетки стимулировались различными агонистами TLR. Также проверили изменения сигнальных путей TLR/p38 MAPK и TLR/c-Jun N-term Kinase (JNK) в астроцитах при различной адаптации к глюкозе. Использовали ингибиторы p38 и JNK и экспрессию мРНК PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$  как маркеры для оценки специфичности TLR/MAPK/мРНК PPAR сигнализации в астроцитах.

Показано, что адаптация клеток к высокой концентрации глюкозы не изменяет морфологию клеток (Рис. 3.18А), но модулирует ответы на действие воспалительных стимулов. Для характеристики ответов сравнили влияние концентрации глюкозы на ответ астроцитов на воздействие PIC (агонист TLR3) и LPS (агонист TLR4). Ответ оценивали по уровню провоспалительных маркеров, цитокина TNF $\alpha$  и простагландина E2, во внеклеточной среде через 4 ч после стимуляции TLR (Рис. 3.18Б, В). Агонисты TLR3 и TLR4 вызывали почти двукратное увеличение уровня TNF $\alpha$  в астроцитах, инкубированных в среде с высоким содержанием глюкозы, по сравнению со средой с нормальным содержанием глюкозы (Рис. 3.18Б). Аналогичное увеличение воспалительного ответа было получено и для PGE $_2$  (Рис. 3.18В). Культивирование клеток в течение 48 ч в среде с высоким содержанием глюкозы снижало уровни PPAR $\alpha$  и PPAR $\beta$ , но не влияло на уровни мРНК PPAR $\gamma$  (Рис. 3.18Г). Воздействие высокой концентрации глюкозы увеличило экспрессию белка COX-2 как в нативных, так и в LPS-стимулированных клетках (Рис. 3.18Д, Е). Таким образом, хотя 48-часовая инкубация с высоким содержанием глюкозы не повлияла на морфологию клеток, TLR-опосредованные ответы провоспалительных маркеров и уровни экспрессии PPAR были явно изменены.

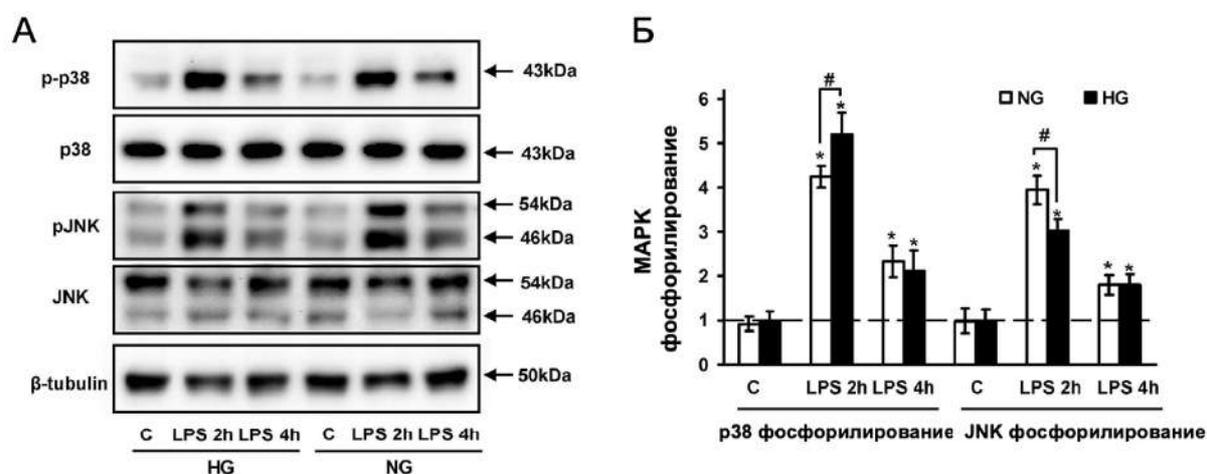
A



**Рис. 3.18.** Сравнение культур астроцитов, культивируемых в среде с высокой и нормальной концентрацией глюкозы в течение 48 ч. Астроциты новорожденных крыс культивировали в среде с нормальной (5,5 мМ; NG) или высокой (22,5 мМ; HG) концентрацией глюкозы в течение 48 ч. (А). Иммуноцитохимия культур астроцитов в среде HG, окрашенных на астроциты (GFAP, зеленый), ядро (EtBr, красный) и микроглиальные клетки (IB4, синий). (Б), (В) Сравнение влияния агонистов TLR на высвобождение TNFα (Б) и PGE<sub>2</sub> (В). Клетки стимулировали агонистами TLR - липополисахаридом (LPS; 100 нг/мл, TLR4) и поли:IC (PIC; 10 мкг/мл, TLR3) в течение 4 ч. Концентрацию PGE<sub>2</sub> и TNFα измеряли методом ИФА в образцах супернатантов. (Г) Экспрессия мРНК PPAR в нативных астроцитах, культивируемых в условиях высокой и нормальной глюкозы. Уровни мРНК PPAR были определены методом RT-PCR в реальном времени. (Д, Е) Уровень белка COX-2 оценивали методом вестерн-блоттинга. Значения представляют собой среднее ± СО из трех независимых экспериментов. \**p* < 0,05 по сравнению с нативными клетками, #*p* < 0,05 по сравнению с указанными столбиками.

Ранее было показано, что белки p38 и JNK MAPK участвуют в регуляции экспрессии мРНК PPAR в астроцитах при стимуляции LPS [117]. Чтобы охарактеризовать клеточную модель адаптации к глюкозе, были измерены экспрессия и фосфорилирование p38 и JNK в интактных клетках

и клетках, стимулированных LPS (Рис. 3.19А, В). Уровни обоих МАРК не изменились в нестимулированных клетках, подвергшихся воздействию высокой или нормальной глюкозы (Рис. 3.19), однако активация TLR4 вызвала 4-кратное повышение уровня p38 и JNK с пиком через 2 ч (Рис. 3.19Б). Стимуляция LPS усиливала активность p38 МАРК, но снижала активность JNK в клетках, культивируемых при высокой концентрации глюкозы, в течение 2 ч (Рис. 3.19Б). Инкубация в течение 4 ч не оказала существенного влияния на уровни фосфорилирования субъединиц p46 и p54 для JNK. Таким образом, существует четкое влияние адаптации к высокой концентрации глюкозы на ранней стадии развития ответа клеток на действие LPS.

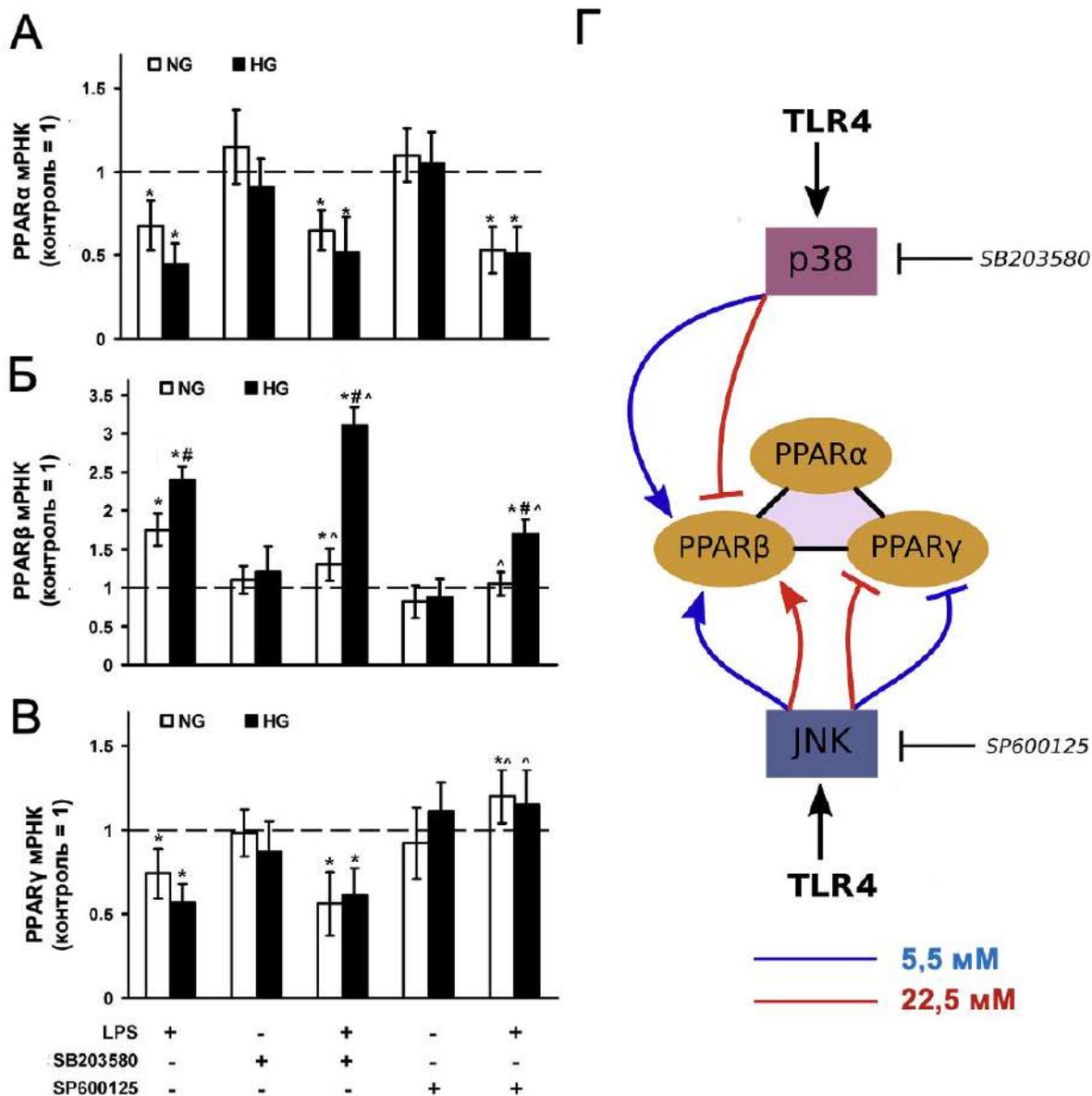


**Рис. 3.19.** Сравнение активности p38 и JNK МАРК в астроцитах, культивируемых с глюкозой в концентрациях 5,5 мМ и 22,5 мМ после стимуляции LPS. Астроциты подвергались воздействию глюкозы в концентрации 5,5 мМ (NG) и 22,5 мМ (HG) в течение 48 ч. Затем клетки стимулировались в течение 2 ч и 4 ч агонистом TLR4 липополисахаридом (LPS; 100 нг/мл). Уровни белков p38, p-p38, pJNK и JNK оценивались методом вестерн-блоттинга в указанное время (указано в ч). (А) Репрезентативные вестерн-блоты, демонстрирующие уровни фосфорилированного фосфо-p38 (p-p38), фосфо-JNK (pJNK) и общего p38 (p38), JNK (JNK) белков. Пример является репрезентативным для трех независимых экспериментов. (Б) Результаты выражены в виде кратности изменения с нативными астроцитами. Значения представляют собой среднее  $\pm$  СО из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, # $p < 0,05$  по сравнению с указанными столбиками.

Известно, что экспрессия мРНК PPAR чувствительна к изменениям активности различных МАРК [116,117,281], поэтому было оценено влияние на экспрессию мРНК PPAR ингибиторов p38 (SB203580) и JNK (SP600125), которые добавляли к клеткам за 0,5 ч, а затем стимулировали LPS в течение 4 ч (Рис. 3.20). Уровни мРНК PPAR в условиях нормального (NG; белые

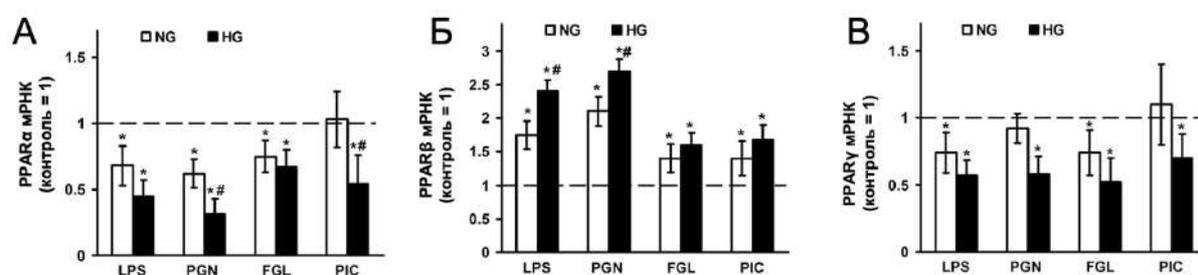
столбы) и высокого содержания глюкозы (HG; черные столбы) измеряли методом ПЦР в реальном времени (Рис. 3.20). Ингибиторы, к интактным клеткам, не влияли на уровни экспрессии генов PPAR, поэтому эти уровни экспрессии использовались для нормализации данных (Рис. 3.20). LPS снижал мРНК PPAR $\alpha$  одинаково как при высокой, так и при нормальной глюкозе, и ингибиторы не влияли на этот эффект (Рис. 3.20А). LPS снижал мРНК PPAR $\gamma$  как при высоком, так и при нормальном уровне глюкозы, на что не влияла обработка ингибитором p38 MAPK (Рис. 3.20В). Ингибирование JNK снимало эффект LPS (Рис. 3.20В). Важно отметить, что для PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  не было разницы в чувствительности к ингибированию MAPK между клетками, культивируемыми в разных концентрациях глюкозы. Наиболее поразительными были результаты для PPAR $\beta$  (Рис. 3.20Б). LPS повышал мРНК PPAR $\beta$  (Рис. 3.20Б). Оба ингибитора MAPK оказывали различное влияние на экспрессию PPAR $\beta$  в зависимости от концентрации глюкозы. Ингибитор JNK SP600125 полностью отменял LPS-индуцированную экспрессию мРНК PPAR $\beta$  в нормальной глюкозе и значительно, хотя и слабее, ингибировал LPS-индуцированную экспрессию мРНК PPAR $\beta$  в высокой глюкозе (Рис. 3.20Б). Ингибитор p38 отменял LPS-индуцированную экспрессию мРНК PPAR $\beta$  в нормальной глюкозе, но значительно повышал уровень экспрессии в высокой глюкозе, т.е. SB203580 действует как усилитель LPS при высокой глюкозе (Рис. 3.20Б).

Таким образом, роль MAPK в регуляции изменений экспрессии PPAR многогранна и зависит от концентрации глюкозы, что представлено на схеме Рис. 3.20Г. Синие линии указывают на влияние MAPK при нормальной концентрации глюкозы, красные — при высокой. Наконечники стрелок указывают на увеличение экспрессии мРНК (что соответствует ингибирующему эффекту ингибитора MAPK), наконечники “молотков” — на соответствующее уменьшение (что соответствует потенцирующему эффекту ингибитора MAPK).



**Рис. 3.20.** Высокая глюкоза изменяет чувствительность уровней экспрессии мРНК PPAR к ингибиторам p38 и JNK, как в нативных клетках, так и в сочетании с липополисахаридом (LPS). Астроциты культивировали в течение 48 ч в среде с нормальной (5,5 мМ; NG; белые колонки) и высокой (22,5 мМ; HG; черные колонки) глюкозой. Астроциты предварительно обрабатывали в течение 30 мин ингибиторами сигнальной оси MAPK, включающей p38 (SB203580, 20 мкМ), JNK (SP600125, 10 мкМ), а затем стимулировали LPS (100 нг/мл, 4 ч). Уровни мРНК PPAR $\alpha$  (А), PPAR $\beta$  (Б) и PPAR $\gamma$  (В) определяли методом RT-PCR в реальном времени. Экспрессия в нативных клетках принята за 1; \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, # $p < 0,05$  по сравнению при одинаковой обработке глюкозой, ^ $p < 0,05$  по сравнению с астроцитами после обработки LPS. (Г) Схема LPS-индуцированной экспрессии мРНК PPAR в норме и при высокой глюкозе. Красные линии - высокая глюкоза, синяя линия - нормальная глюкоза, стрелки - активация, молоток-ингибирование.

На следующем этапе сравнивали эффекты различных типов агонистов TLR на клетки, выращенные при высокой (HG) и нормальной (NG) концентрации глюкозы (Рис. 3.21). Использовали агонисты различных типов TLR: LPS, PGN, FGL, PIC (Рис. 3.21). Все агонисты увеличивали экспрессию мРНК PPAR $\beta$ ; различия между нормальной и высоким уровнями глюкозы наблюдались для агонистов TLR4 и TLR1/2 (Рис. 3.21Б). TLR1/2, TLR4 и TLR5 подавляли экспрессию мРНК PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  (Рис. 3.21А,В) до одинакового уровня как в нормальной, так и в высокой глюкозе, за исключением влияния PGN на экспрессию мРНК PPAR $\alpha$ , где эффект в высокой глюкозе был значительно сильнее, чем в нормальной глюкозе (Рис. 3.21А). Более значительные изменения при высокой и нормальной глюкозе были получены при использовании PIC, агониста TLR3. PIC не влиял на уровень экспрессии мРНК PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  в нормальной глюкозе, в то время как в высокой глюкозе он значительно снижал экспрессию (Рис. 3.21А,В). Такое различие в чувствительности к глюкозе между рецепторами плазматической мембраны TLR (агонисты бактериальной природы) и внутриклеточными мембранами (агонисты вирусного происхождения) путей сигнальной трансдукции может указывать на различные сигнальные механизмы, регулирующие воспалительный ответ в метаболическом контексте.



**Рис. 3.21.** Сравнение экспрессии мРНК PPAR после стимуляции различными TLR астроцитов, культивированных с нормальной (NG) и высокой (HG) глюкозой. Астроциты культивировали в течение 48 ч в среде с нормальным (5 мМ, белые столбы) и высоким (22,5 мМ, черные столбы) содержанием глюкозы. Затем клетки стимулировали в течение 4 ч агонистами TLR: липополисахаридом (LPS; 100 нг/мл, TLR4), поли:IC (PIC; 10 мкг/мл, TLR3), пептидогликаном (PGN; 5 мкг/мл, TLR1/2) и флагеллином (FGL; 5 мкг/мл, TLR5). Уровни мРНК PPAR $\alpha$  (А), PPAR $\beta$  (Б) и PPAR $\gamma$  (В) были определены методом RT-PCR в реальном времени. Экспрессия в необработанных = 1. Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов, проведенных в трех экземплярах. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, # $p < 0,05$  при сравнении одинаковой обработки клеток в условиях нормальной и высокой концентрацией глюкозы.

Показано, что культивирование клеток в течение 2 дней в высокой глюкозе i) не влияло на клеточную морфологию, но ii) усиливало LPS (агонист TLR4) и PIC (агонист TLR3)- индуцированное высвобождение TNF $\alpha$  и PGE2, iii) изменяло сигнальные пути TLR4/MAPK (увеличение активности p38 MAPK и снижение активности JNK на ранних стадиях активации TLR), iv) модулировало экспрессию COX-2 на уровне белка. Таким образом, инкубация в высокой концентрации глюкозы переводит астроциты в провоспалительное состояние и ухудшает воспалительный ответ на агонисты TLR4 или TLR3. Эти изменения сопровождаются повышением активности p38 MAPK и снижением активности JNK. Примечательно, что различия были преходящими и модулировали начальную стадию TLR-сигналикации: наиболее значительные изменения наблюдались через 2 ч после стимуляции агонистом TLR4, а через 4 ч различий между нормальными и культивированными с высоким содержанием глюкозы уже не было. Противоположный эффект высокого содержания глюкозы на активность JNK и p38 MAPK особенно актуален в тех путях, где соотношение активностей двух киназ JNK и p38 MAPK важно для сигнализации.

Изменение уровня мРНК PPAR при высоком уровне глюкозы хорошо показано на других типах клеток и считается перспективной мишенью для манипуляций с воспалительным процессом. Действительно, было показано, что снижение экспрессии мРНК PPAR $\gamma$  при высоком уровне глюкозы сопровождалось повышенным высвобождением провоспалительных цитокинов, что было обнаружено для различных клеток, таких как гепатоциты, жировые клетки, эпителиальные клетки почек, эндотелиальные клетки, макрофаги [233,282–284]. Возвращение экспрессии PPAR $\gamma$  на уровень, соответствующий нормальному содержанию глюкозы, после манипуляций с соответствующими химическими веществами коррелирует с уменьшением высвобождения цитокинов [283]. Примечательно, что вещества и физиологические состояния, индуцирующие PPAR $\gamma$ , демонстрируют противовоспалительные свойства [282,284], а изменения в экспрессии мРНК PPAR $\gamma$  сопровождают поляризацию макрофагов и инсулинорезистентность [285]. До сих пор не было сопоставимых данных относительно экспрессии PPAR $\alpha$  и PPAR $\beta$ . Наблюдалось снижение уровня мРНК PPAR $\alpha$  и PPAR $\beta$  и не было обнаружено изменений в мРНК PPAR $\gamma$  в нативных клетках, подвергшихся воздействию высокой глюкозы. Заманчиво предположить, что изменения

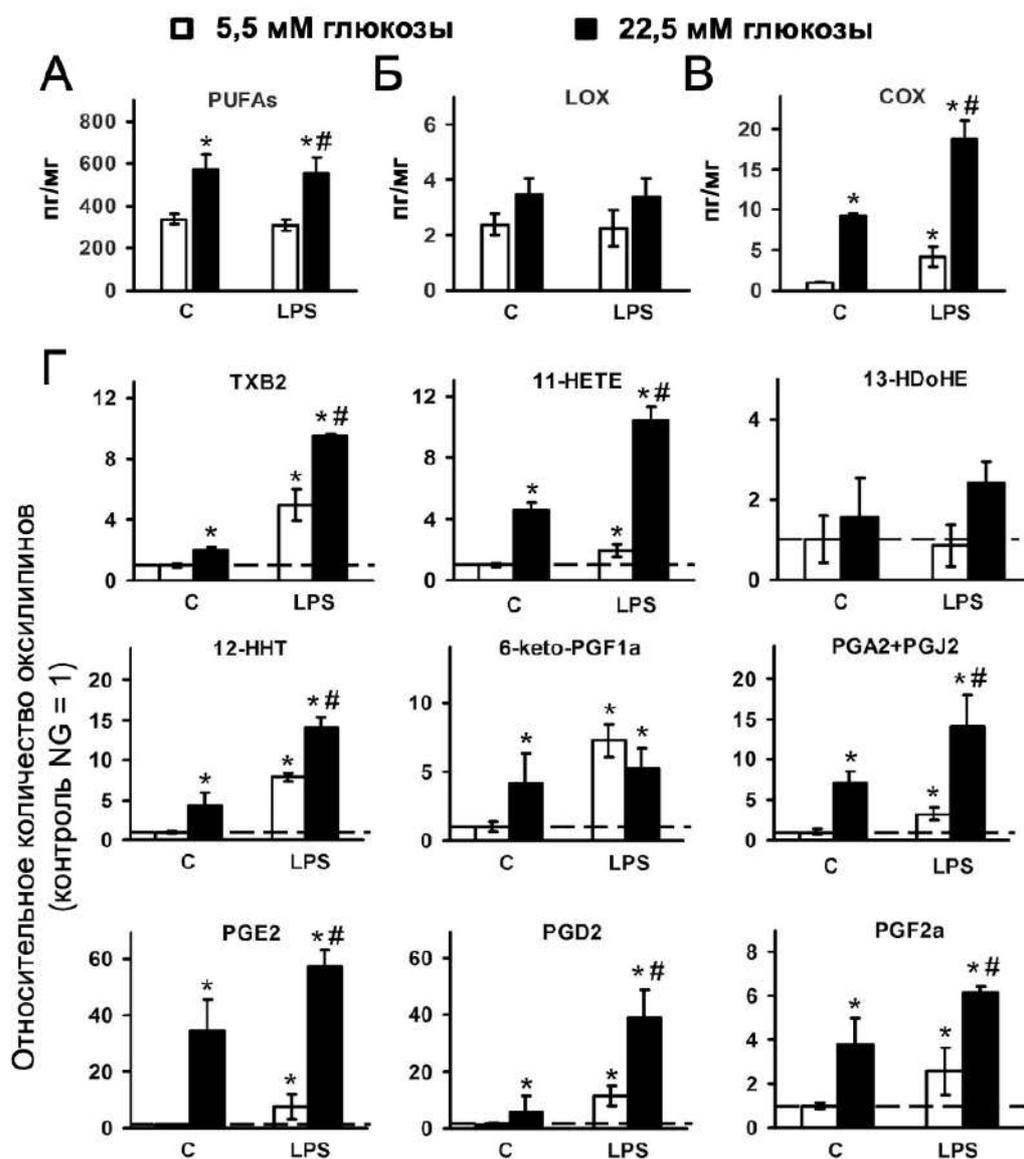
экспрессии PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  и PPAR $\gamma$  в различных метаболических состояниях приводят к различным паттернам вовлечения PPAR в TLR-опосредованные сигнальные пути в астроцитах. В пользу этого предположения указывают данные по изменению уровня белка COX-2. Ранее было показано, что экспрессия COX-2 напрямую зависит от уровня экспрессии мРНК PPAR $\beta$  [231], то есть COX-2 может служить референсным геном для оценки активности PPAR $\beta$  в астроцитах. Действительно, инкубация в условиях повышенного содержания глюкозы приводит к повышению базального уровня COX-2 и увеличению его экспрессии при стимуляции LPS параллельно с увеличением экспрессии мРНК PPAR $\beta$ .

Ранее была показана прямая корреляция между уровнями мРНК и белка для трех типов PPAR в астроцитах при различных стимуляциях [116,117,231]. Была предложена концепция “триады PPAR” как единого взаимодействующего регуляторного комплекса. Фундаментальная идея этой концепции заключается в том, что изменения в соотношении базальных уровней типов PPAR важны для клеточных ответов на провоспалительные стимулы [199]. Полученные результаты поддерживают эту концепцию.

Регуляция PPAR может осуществляться через комбинацию активности различных MAPK. Экспрессия мРНК PPAR $\beta$  продемонстрировала чувствительность к ингибированию MAPK и адаптации к глюкозе. JNK индуцировал экспрессию мРНК PPAR $\beta$ , и этот эффект не зависел от адаптации клеток к глюкозе. Влияние p38 различается: при высокой глюкозе активация p38 MAPK снижалась, а при нормальной глюкозе p38 активировал экспрессию мРНК PPAR $\beta$ . Это переключение в регуляции экспрессии мРНК PPAR $\beta$  при высокой глюкозе, приводящее к обратному эффекту, можно отметить, как наиболее значимое среди полученных нами результатов в данной серии экспериментов.

### **3.2.1.2 Способность астроцитов, адаптированных к разным концентрациям глюкозы, синтезировать оксипирины**

В следующей серии экспериментов было изучено изменение синтеза оксипиринов при адаптации астроцитов к различным концентрациям глюкозы. Были получены профили оксипиринов для четырех групп: (1) нормальные (NG) нативные клетки; (2) нативные клетки с высоким содержанием глюкозы (HG); (3) NG клетки, стимулированные LPS; (4) HG клетки, стимулированные LPS (Рис. 3.22, Приложение А, Таблица А.1).



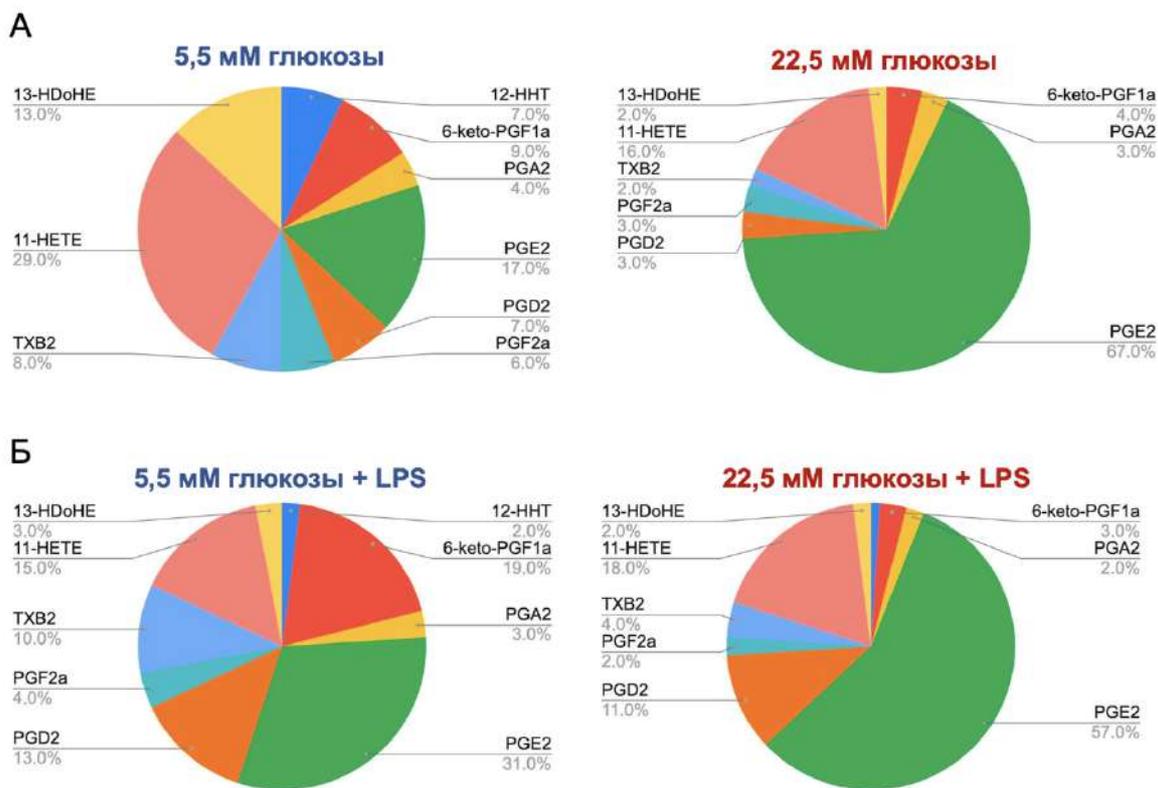
**Рис. 3.22.** Изменения в профилях оксипинов в астроцитах, культивируемых в среде с нормальной и высокой концентрацией глюкозы. Астроциты адаптировали в среде с нормальной (5,5 мМ) или высокой (22,5 мМ) концентрации глюкозы в течении 12 дней и далее стимулировали 4 ч LPS (100 нг/мл). Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. (А) суммарная концентрация ПНЖК (АА, ДНА, ЕРА); Суммарные концентрации (Б) производных LOX-пути метаболизма; (В) производных COX-пути метаболизма; (Г) производных COX-пути метаболизма. Значение концентраций детектируемых метаболитов в необработанных клетках (С), культивируемых в среде с 5,5 мМ глюкозы приняты за 1. \*  $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками в условиях нормальной глюкозы, #  $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками в условиях нормальной глюкозы.

Обнаруженные оксипиновы делили на три группы: (1) свободные ПНЖК (Рис. 3.22А); (2) производные LOX-пути (Рис. 3.22Б); и (3) производные COX-пути (Рис. 3.22В,Г). В группу ПНЖК входят три кислоты: ЕРА, ДНА и АА. Хотя культивирование клеток в НГ увеличивает

общее содержание ПНЖК почти в два раза, стимуляция LPS не приводит к увеличению содержания ПНЖК в среде (Рис. 3.22А).

К метаболическому пути LOX относят метаболиты: 12-НЕТЕ, 5-НЕТЕ, 9-НОДЕ, 8-НДоНЕ, 14-НДоНЕ и 17-НДоНЕ. Изменений этих метаболитов не наблюдали (Рис. 3.22Б).

К метаболическому пути COX относят метаболиты, производные АА (12-ННТ, 6-keto-PGF<sub>2α</sub>, PGA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TXB<sub>2</sub>, 11-НЕТЕ), а также 13-НДоНЕ, производное ДНА. Культивирование клеток в НГ увеличивает общее содержание производных COX (Рис. 3.22Г). Чувствительность COX-опосредованного синтеза к стимуляции LPS снижается в группе НГ (Рис. 3.22Г). Наблюдалось почти двукратное увеличение концентрации производных COX в LPS по сравнению с нативными группами для клеток НГ и почти четырехкратное для клеток NG (Рис. 3.22Г). Таким образом, хотя при высоком уровне глюкозы высвобождается гораздо больше метаболитов COX-пути, ответ на стимуляцию провоспалительного стимула менее выражен. Производные COX-опосредованного пути содержат как провоспалительные, так и противовоспалительные вещества [1]. Детальный анализ этой группы веществ выявил различия в их чувствительности к стимулам НГ и LPS (Рис. 3.22Г). Для наглядности анализа профилей оксипинов были сравнены круговые диаграммы концентраций метаболитов, образующихся по COX-пути биосинтеза, нативных и LPS-стимулированных астроцитов (Рис. 3.23). На рисунке приведены концентрации метаболитов в %, где общая концентрация COX-опосредованных веществ принимается за 100%. Наглядно видно значительное изменение профиля при адаптации к НГ, которое также заметно после стимуляции LPS (Рис. 3.23). По сравнению с нативными клетками NG/НГ, наблюдается снижение доли вещества, среди прочих, для 12-ННТ, 6-keto-PGF<sub>2α</sub>, PGA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TXB<sub>2</sub>, 11-НЕТЕ и 13-НДоНЕ (Рис. 3.23). Доля PGE<sub>2</sub> значительно увеличивается (Рис. 3.23). Поскольку PGE<sub>2</sub> обычно рассматривают как маркер воспалительного процесса [6], можно предположить, что даже в нативных клетках, культивируемых в НГ, происходит сдвиг в сторону воспалительного ответа на уровне синтеза оксипинов. Для LPS-стимулированных профилей оксипинов также заметно увеличение доли PGE<sub>2</sub> (Рис. 3.23). При этом доля 6-keto-PGF<sub>2α</sub> уменьшается в LPS-стимулированных профилях оксипинов для НГ по сравнению с NG (Рис. 3.23).



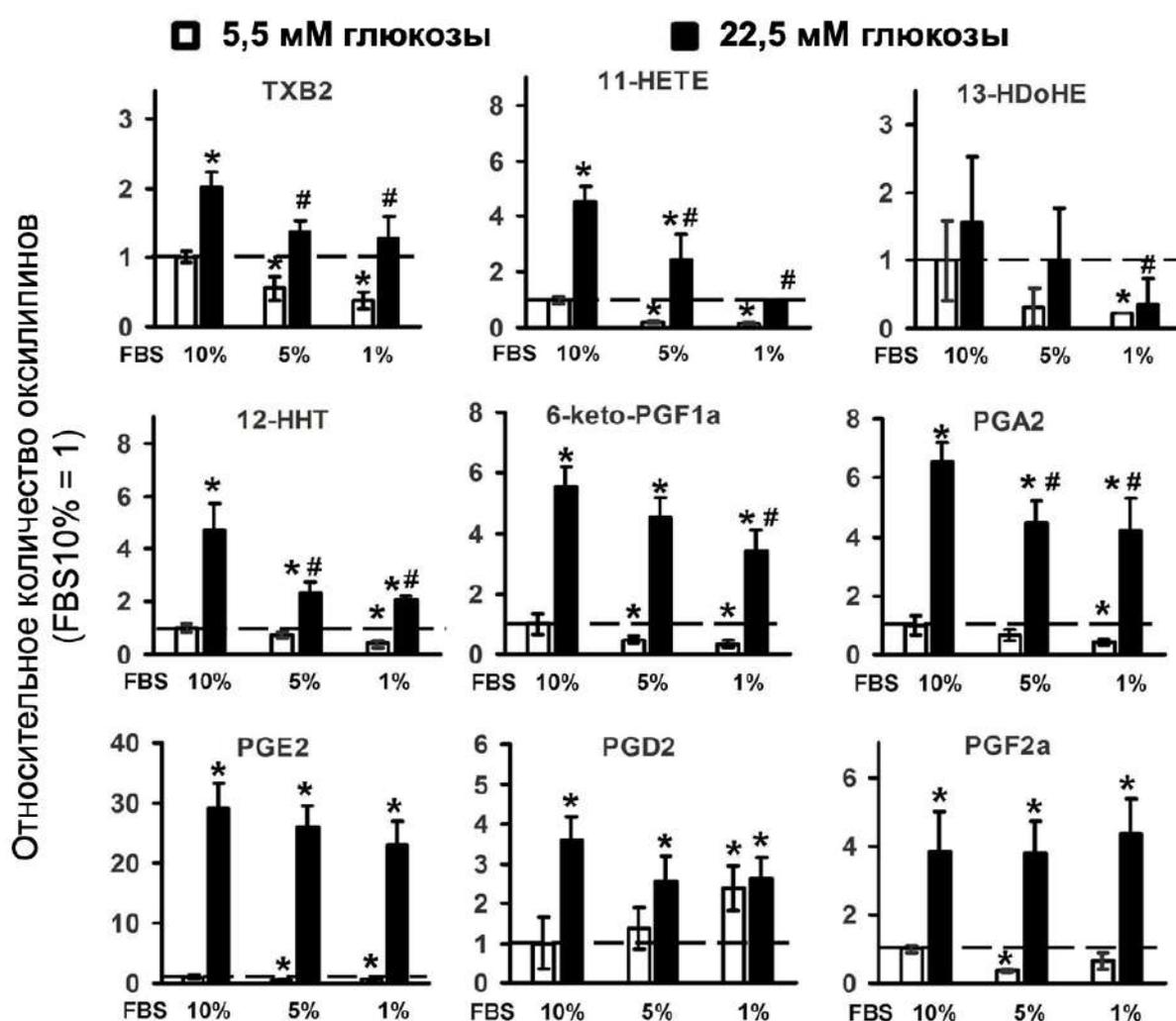
**Рис. 3.23.** Сравнение COX-опосредованных метаболитов в астроцитах, культивируемых в среде с нормальной (5,5 мМ) и повышенной (22,5 мМ) концентрацией глюкозы. Первичные крысиные астроциты культивировали в среде с нормальной (5,5 мМ) или повышенной (22,5 мМ) концентрацией глюкозы в среде, затем стимулировали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 4 ч. Круговые диаграммы, показывающие распределение COX-опосредованных метаболитов, высвобожденных из (А) нативных или (Б) LPS-стимулированных астроцитов.

По сравнению с астроцитами, культивируемыми при нормальной концентрации глюкозы (NG), клетки из среды культивирования с высокой концентрацией глюкозы (HG) проявляют следующие свойства: (1) наблюдается воспалительное состояние нативных клеток, оцененное по уровню оксипинов, производных COX; (2) толерантность в ответе синтеза оксипинов на провоспалительный стимул LPS. Полученные данные позволяют предположить, что регуляция COX-опосредованного синтеза оксипинов является потенциальной новой мишенью в лечении нарушений работы мозга, связанных с гипергликемией.

### 3.2.1.3 Влияние концентрации сыворотки во внеклеточной среде на профиль оксипинов

Для дальнейшей характеристики профилей оксипинов было оценено влияние концентрации сыворотки в среде культивирования. Сравнивали эффекты 10% (нормальная концентрация для культивирования клеток), 5% и 1% сыворотки. Это было сделано по нескольким причинам. Во-первых, оксипины способны связываться с внеклеточными белками [63,286], и эти процессы могут влиять на профили оксипинов и

клеточные реакции [287,288]. Во-вторых, было известно, что для астроцитов сыворотка также сама по себе может выступать фактором стресса [146]. Кроме того, в разных протоколах оценки синтеза оксипинов (методами ВЭЖХ и связанными с ними) используют разные концентрации сыворотки или даже проводят оценку синтеза оксипинов в бессывороточной среде. Поэтому задача изучения влияния концентрации сыворотки на синтез оксипинов имела и методическое значение. Поскольку в данном экспериментальном протоколе высокую концентрацию глюкозы использовали как стимул к адаптации клеток (фактор стресса длительного воздействия), то оценили влияние на эти адаптации сыворотки как фактора стресса острого воздействия (Рис. 3.24).

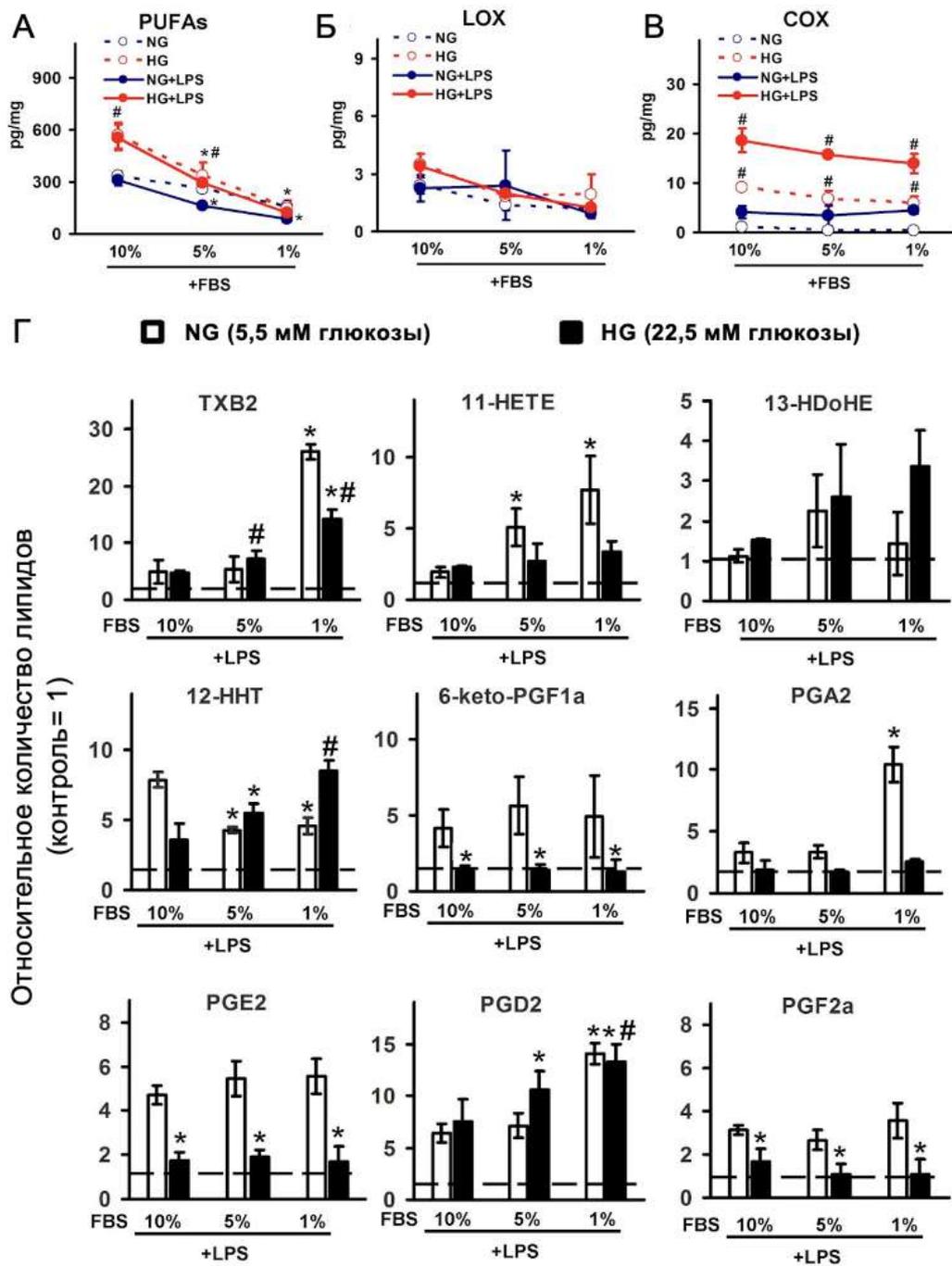


**Рис. 3.24.** Зависимость COX-производных оксипинов от концентрации сыворотки в культуральной среде в нативных клетках. Сравнение нормальной (5,5 мМ) и повышенной (22,5 мМ) концентрации глюкозы в культуральной среде. Первичные астроциты крысы культивировали в среде с нормальной (5,5 мМ) или повышенной (22,5 мМ) концентрацией глюкозы и различными концентрациями FBS (10%, 5% и 1%). Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками в условиях нормального содержания глюкозы с 10% FBS; # $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками в условиях высокого содержания глюкозы с 10% FBS.

Получено, что концентрация сыворотки меняет количественный состав профиля оксипинов для клеток, адаптированных к разным концентрациям глюкозы (Рис. 3.24). Наибольшие изменения в высвобождении оксипинов наблюдаются для COX-производных. При нормальной концентрации глюкозы снижение концентрации сыворотки с 10% до 1% приводит к понижению синтеза всех анализируемых оксипинов, за исключением  $PGD_2$ , высвобождение которого увеличивается ~ в 2 раза (Рис. 3.24). Для клеток, адаптированных к высокой концентрации глюкозы, 1% сыворотки снижает концентрацию всех тестируемых оксипинов, кроме  $PGD_2$ ,  $PGE_2$  и  $PGF_{2\alpha}$ , которые не зависят от изменения концентрации сыворотки (Рис. 3.24). Таким образом, наблюдается сразу два процесса: влияние связывания оксипинов с белками и действие самой сыворотки как стресса. Эти данные поддерживают предположение, что сыворотка представляет собой не просто набор белков, связывающих оксипины, а обладает самостоятельным воздействием на функции астроцитов.

Чтобы проверить предположения о наличии дополнительных эффектов низкой концентрации сыворотки на функционал астроцитов, было оценено влияние сыворотки на LPS-опосредованный клеточный ответ в астроцитах (Рис. 3.25). При сравнении общих концентраций метаболитов, разделенных на группы (ПНЖК, метаболиты, образующиеся через LOX-опосредованные или COX-опосредованные пути биосинтеза), получено, что суммарный уровень ПНЖК зависит от сыворотки (в 10% FBS больше, чем в 1% FBS) и глюкозы (больше в HG, чем в NG, с наибольшей разницей, наблюдаемой в 10% сыворотке), однако стимуляция LPS не оказывает существенного влияния на концентрацию суммарных ПНЖК (Рис. 3.25А). Культивирование клеток при высокой концентрации глюкозы или стимуляция LPS с различными концентрациями сыворотки не влияли на содержание LOX-производных метаболитов (Рис. 3.25Б).

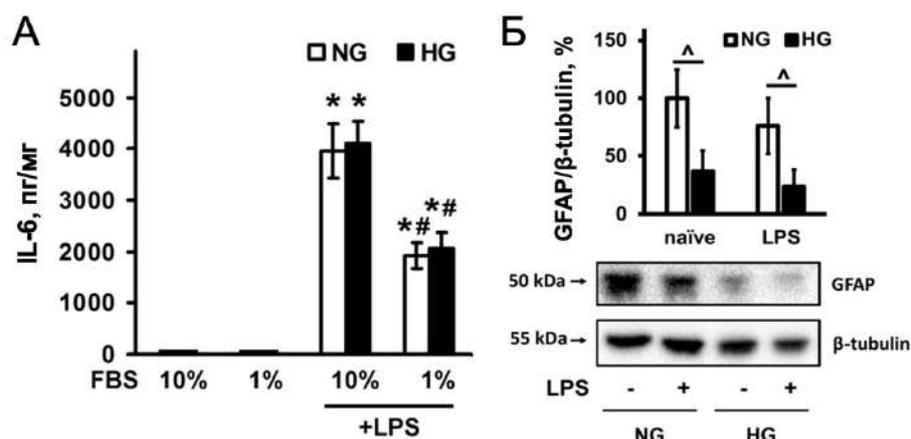
Различные концентрации сыворотки не влияют на общее количество метаболитов COX, в то время как высокая концентрация глюкозы увеличивает общий уровень этих метаболитов во всех протестированных концентрациях сыворотки (Рис. 3.25В), что согласуется с данными, представленными на Рис. 3.24, а также предыдущими данными об общей провоспалительной трансформации клеток, адаптированных к высокой концентрации глюкозы. Также наблюдается изменение профиля оксипинов, а именно, снижение концентрации сыворотки приводит к увеличению LPS-стимулированного высвобождения  $TXB_2$ , 11-НЕТЕ, 13-НДоНЕ,  $PGA_2$  и  $PGD_2$ , в то время как LPS-стимулированное высвобождение 12-ННТ, 6-keto- $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGE_2$  и  $PGF_{2\alpha}$  не зависит от концентрации сыворотки, т.е. изменение концентрации сыворотки влияет на количество выделяемых оксипинов и их соотношение (Рис. 3.25Г). Это надо учитывать при сопоставлении профилей оксипинов.



**Рис. 3.25.** Влияние разных концентраций сыворотки (10%, 5%, 1%) в культуральной среде в LPS-стимулированных клетках, культивированных в нормальной (5,5 мМ) или высокой (22,5 мМ) среде глюкозы. После культивирования астроциты стимулировали LPS (100 нг/мл, 4 ч). Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. Суммарные концентрации (А) ПНЖК; (Б) производных LOX-пути метаболизма; (В) производных COX-пути метаболизма; (Г) изменения в отдельных метаболитах, производных COX-пути метаболизма, контроль с соответствующим процентом сыворотки принят за 1. \* $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками в условиях нормального содержания глюкозы, с 10% FBS; # $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками в условиях высокого содержания глюкозы, с 10% FBS.

Чтобы более детально изучить чувствительность астроцитов к стимуляции LPS, IL-6 был использован как маркер воспалительного ответа. Поскольку синтез и высвобождение IL-6 детектируется на значительном уровне только в присутствии LPS, а не в нативных клетках [289], этот цитокин удобно использовать как маркер активации астроцитов при стимуляции. Сравнено высвобождение IL-6 в LPS-стимулированных клетках в присутствии 10% и 1% сыворотки (Рис. 3.26). Разницы в высвобождении IL-6 между клетками, культивируемыми в NG и HG, не было (Рис. 3.26А). При этом снижение концентрации сыворотки привело к почти двукратному снижению LPS-стимулированного высвобождения IL-6, независимо от концентрации глюкозы (Рис. 3.26А). Таким образом, адаптация клеток к разным концентрациям глюкозы не влияет на синтез провоспалительного цитокина IL-6, при этом меняется профиль оксипиринов, т.е. нарушается работа ансамбля клеточного ответа на провоспалительный стимул (соотношение между высвобождаемыми цитокинами и оксипиринами).

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) является частью цитоскелета зрелых астроцитов и других глиальных клеток и используется как один из маркеров активированных астроцитов [137]. Было показано, что уровень экспрессии GFAP снижается при адаптации клеток к высокой концентрации глюкозы (Рис. 3.26Б). Однако уровень его экспрессии не изменяется при стимуляции LPS (Рис. 3.26Б), т.е. уровень GFAP зависит только от концентрации глюкозы, но не от стимуляции LPS. Отсутствие изменений после стимуляции LPS может быть связано с коротким временем действия LPS (4 ч); что согласуется с данными других авторов [290]. Изменение уровня GFAP при стимуляции LPS показано для длительных экспозиций (24 ч) [154,194]. Также следует иметь в виду, что протокол в работе Wang и соавторов [194] включал этап обработки клеток без глюкозы в среде, что может быть причиной разницы в полученных данных.



**Рис. 3.26.** Зависимость экспрессии GFAP и высвобождения IL-6 от концентрации сыворотки в культуральной среде в LPS-стимулированных клетках, культивируемых в среде с нормальной (NG, 5 мМ) или повышенной (HG, 22,5 мМ) концентрацией глюкозы. (А) Астроциты культивировали в среде с NG или HG с концентрацией FBS 10% или 1%, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл, 4 ч). Высвобождение белка IL-6 измеряли методом ИФА в образцах супернатанта. (Б) первичные астроциты крыс культивировали в среде NG или HG с концентрацией FBS 10%, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл, 4 ч). Уровни белка оценивали методом вестерн-блоттинга. Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, #  $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками с 10% FBS, ^ $p < 0,05$  по сравнению с указанными столбами.

Результаты, полученные в ходе экспериментов с различной концентрацией глюкозы и сыворотки в клеточной среде имеют значение как в методическом плане - при изучении механизмов клеточного сигналинга следует учитывать концентрацию глюкозы и содержание сыворотки (при следует уделять особое внимание протоколам, подразумевающим смену среды на бессывороточную или с низким процентом сыворотки), так и при изучении влияния глюкозы на клеточные ответы.

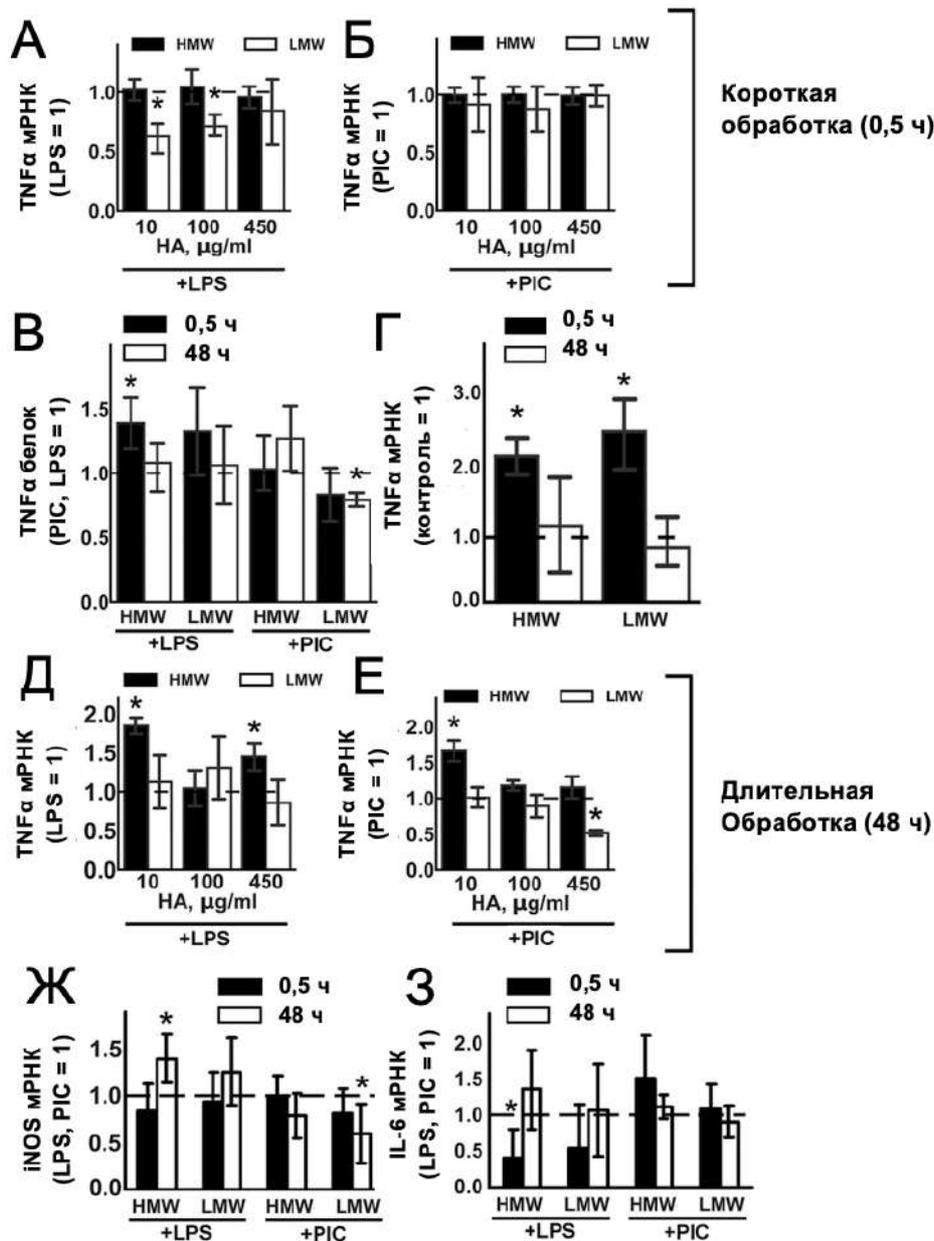
### 3.2.2 Взаимосвязь системы метаболизма гиалуроновой кислоты и сигнального пути TLR4 на астроцитах

Известно, что в функционировании астроцитов большую роль играют их контакты между собой, а также состояние внеклеточного матрикса [202]. Гиалуроновая кислота является важным компонентом внеклеточного матрикса и может быть потенциальной мишенью для терапевтического воздействия (см Литобзор 1.5.5). Поэтому, чтобы оценить роль матрикса в развитии ответов астроцитов на действие провоспалительных стимулов, была проведена серия экспериментов с гиалуроновой кислотой. Поскольку роль длинноцепочечных и короткоцепочечных полимеров гиалуроновой

кислоты оставалась неясной, было оценено как низкомолекулярная (LMW) и высокомолекулярная (HMW) ГК могут инициировать и/или изменять опосредованные астроглией воспалительные реакции. Обработывали астроциты LMW ГК и HMW ГК, совместно или отдельно с агонистами TLR3 и TLR4 и анализировали экспрессию провоспалительного маркера TNF $\alpha$ , противовоспалительного маркера интерлейкина 10 (IL-10) и высвобождение липидных медиаторов, оксипинов, участвующих в воспалении. При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [147,247].

### **3.2.2.1 Изменение экспрессии TNF $\alpha$ под действием HMW и LMW ГК**

Мы оценили влияние вариаций концентраций и времени обработки HMW (1000-1800 кДа) и LMW (41-65 кДа) ГК на LPS- и PIC-стимулированную экспрессию TNF $\alpha$  (Рис. 3.27).



**Рис. 3.27.** Влияние низкомолекулярной (LMW) и высокомолекулярной (HMW) гиалуроновой кислоты (ГК) на экспрессию TNF $\alpha$  при стимуляции агонистами TLR3 и TLR4. Астроциты предварительно обрабатывали в течение 0,5 ч (краткосрочно) или 48 ч (долгосрочно) LMW (10, 100, 450 мкг/мл) и HMW (10, 100, 450 мкг/мл), затем добавляли липополисахарид (LPS) (100 нг/мл) или поли:IC (PIC) (10 мкг/мл) на 4 ч. Относительные уровни мРНК TNF $\alpha$  определяли методом ПЦР в реальном времени. Результаты в (А, Б, Д, Е) представлены в виде кратных изменений TNF $\alpha$  по сравнению с LPS или PIC-стимулированными клетками без обработки ГК. Результаты в (Г) представлены как изменения TNF $\alpha$  в разах по сравнению с клетками, не подвергшимися обработке. (В) Концентрация TNF $\alpha$  при соответствующих обработках (LPS = 1, PIC = 1 соответственно). Результаты в (Ж, З) представлены как изменения уровней мРНК iNOS и IL-6 по отношению к экспрессии соответствующих генов в LPS или PIC-стимулированных клетках. Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов, проведенных в трех сериях. \* $p < 0,05$  по сравнению со стимулированными клетками (А, Б, В, Д, Е), \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками в (Г).

В первой серии экспериментов оценили влияние кратковременной обработки ГК с различными концентрациями (Рис. 3.27А, Б). ГК добавляли на 30 мин, затем добавляли LPS (100 нг/мл) или PIC (10 мкг/мл) на 4 ч. Уровень мРНК TNF $\alpha$  в присутствии агонистов TLR без добавления ГК принимался за единицу. Получено, что LMW ГК в концентрациях 10 и 100 мкг/мл снижала LPS-стимулированный уровень мРНК TNF $\alpha$ , в то время как HMW ГК не оказывала никакого эффекта ни в одной из тестируемых концентраций (Рис. 3.27А). Испытываемые концентрации ГК не влияли на уровень PIC-индуцированной мРНК TNF $\alpha$  (Рис. 3.27Б). На белковом уровне эти эффекты ГК были заметны только для LPS-индуцированного повышения в сочетании с 450 мкг/мл HMW ГК (Рис. 3.27В).

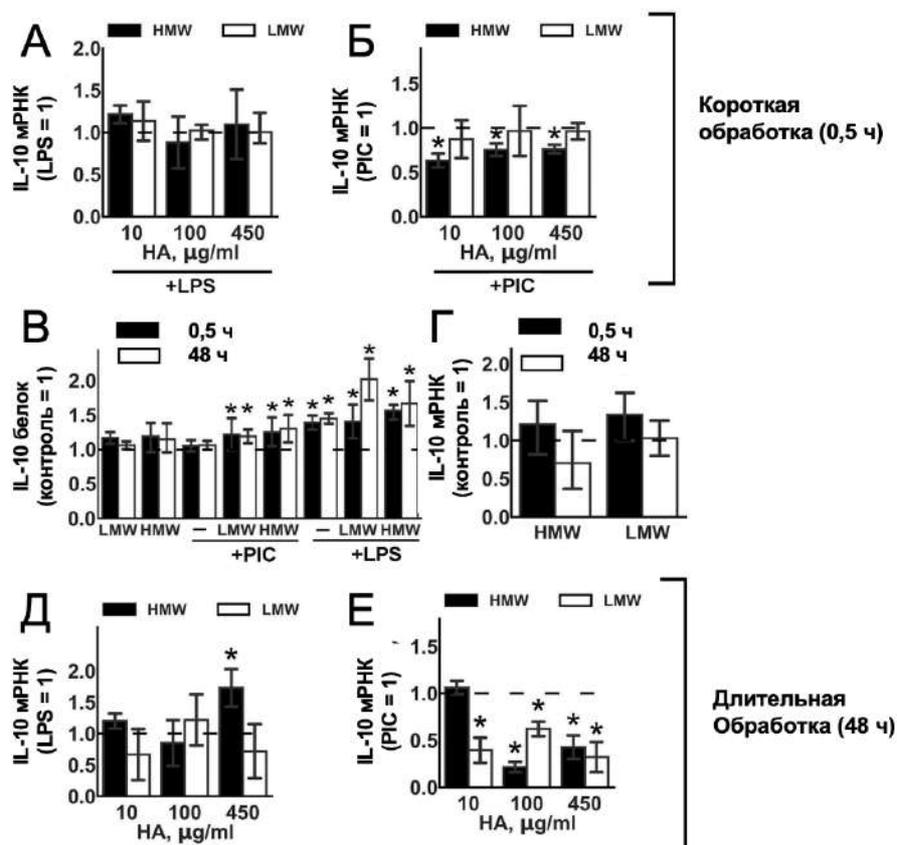
Во второй серии экспериментов оценили влияние длительной (48 ч) обработки ГК на LPS- или PIC-индуцированные стимуляции. Была предположена возможность того, что формы ГК могут модулировать экспрессию мРНК TNF $\alpha$  в нестимулированных клетках в условиях краткосрочной и долгосрочной экспозиции (Рис. 3.27Г). Краткосрочная инкубация с LMW или HMW ГК вызывает двукратное повышение экспрессии TNF $\alpha$  (Рис. 3.27Г). Длительная инкубация с обоими исследуемыми НА не меняет уровни мРНК TNF $\alpha$  (Рис. 3.27Г). После 48 ч экспозиции с ГК культуральную среду меняли, и клетки стимулировали LPS (100 нг/мл) или PIC (10 мкг/мл) в течение 4 ч. Уровни мРНК TNF $\alpha$  в присутствии агонистов TLR без добавления ГК принимали за единицу (Рис. 3.27Д, Е). Длительная инкубация с LMW не влияла на LPS-индуцированную экспрессию мРНК TNF $\alpha$  (Рис. 3.27Д), но ингибировала PIC-индуцированное повышение экспрессии (Рис. 3.27Е), при этом снижение уровня мРНК коррелировало со снижением уровня белка (Рис. 3.27В).

Чтобы оценить, является ли влияние LMW и HMW ГК на TNF $\alpha$  специфичным для этого цитокина, сравнили их влияние на экспрессию других маркеров воспаления — iNOS и IL-6. Клетки обрабатывали 450 мкг/мл HMW или LMW в тех же экспериментальных процедурах, что и при анализе TNF $\alpha$  (Рис. 3.27Ж, З). Изменения экспрессии iNOS были схожи с данными полученными для TNF $\alpha$  (Рис. 3.27Ж). Длительная инкубация с HMW потенцирует LPS-индуцированную экспрессию генов, в то время как длительная инкубация с LMW снижает PIC-индуцированную экспрессию генов. Кратковременная инкубация с HMW снижала экспрессию IL-6, вызванную LPS (Рис. 3.27З).

Итак, полученные данные показали: 1) гиалуроновые кислоты с разной молекулярной массой модулируют ответы астроцитов при их обработке агонистами TLR; 2) для астроцитов нельзя относить HMW ГК к противовоспалительным, а LMW ГК к провоспалительным соединениям, поскольку обе группы соединений модулируют экспрессию маркеров воспаления.

### **3.2.2.2 Изменение экспрессии IL-10 при воздействии HMW и LMW ГК**

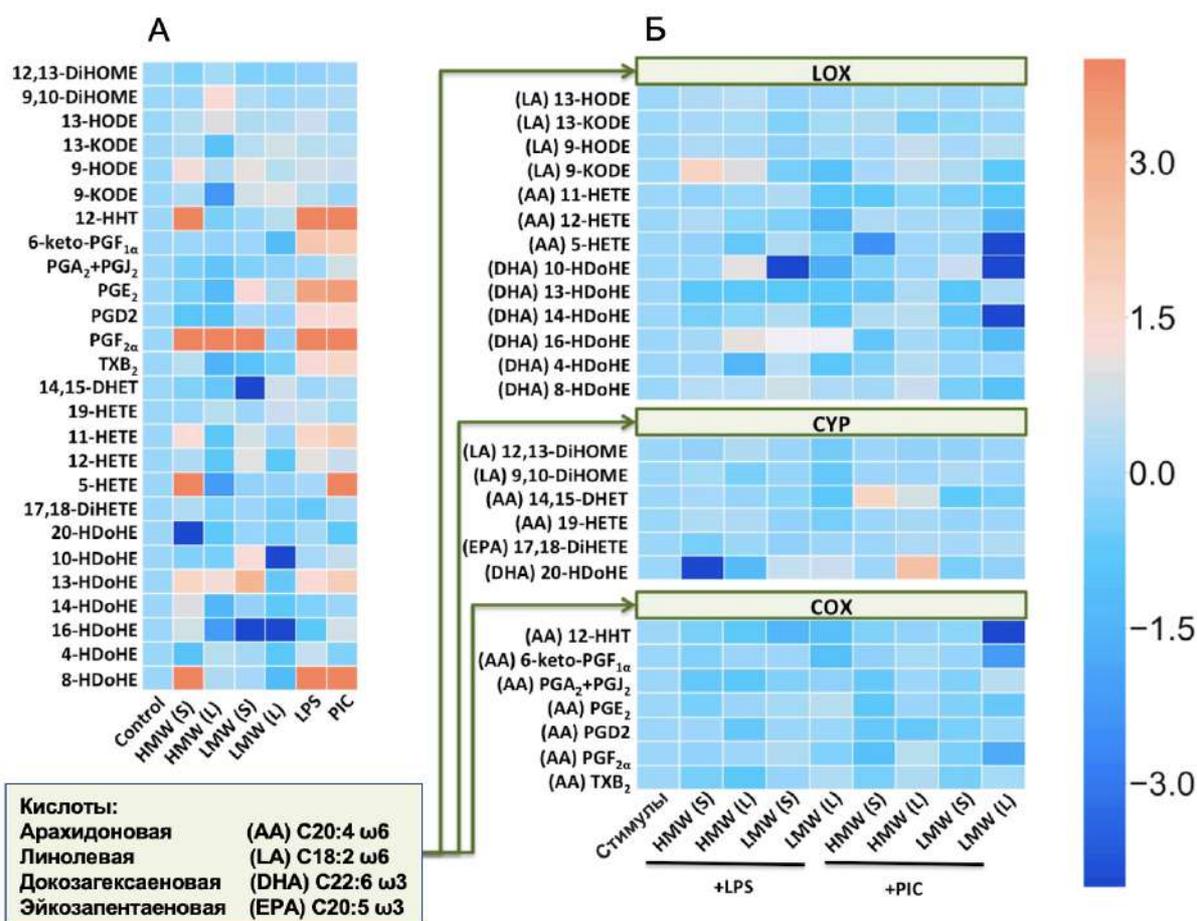
На следующем этапе оценили влияние различных концентраций HMW и LMW ГК на LPS- и PIS-индуцированную экспрессию противовоспалительного цитокина IL-10 (Рис. 3.28). Кратковременная (Рис. 3.28А, Б) или длительная (Рис. 3.28Д, Е) инкубация с LMW ГК не влияла на LPS-индуцированную экспрессию мРНК IL-10. Краткосрочное (Рис. 3.28Г) воздействие LMW ГК также не оказало никакого влияния, в то время как долгосрочное воздействие LMW (Рис. 3.28Е) снижало PIS-индуцированную экспрессию мРНК IL-10 для всех тестируемых концентраций. Краткосрочная (Рис. 3.28Б) и долгосрочная (Рис. 3.28Е) экспозиция HMW ГК снижали уровень PIS-индуцированной экспрессии IL-10, в то время как только долгосрочная экспозиция HMW ГК в концентрации 450 мкг/мл модулировала экспрессию IL-10 (Рис. 3.28В, Е). Примечательно, что, хотя обе испытанные формы ГК индуцировали TLR-опосредованное высвобождение IL-10 на уровне белка (Рис. 3.28В), эффекты были слабыми, но статистически значимыми. Добавление ГК без агонистов TLR не влияло на высвобождение IL-10 (Рис. 3.28Г). Таким образом, обе протестированные формы ГК повышали экспрессию белка IL-10 при TLR3- или TLR4-опосредованном клеточном ответе.



**Рис. 3.28.** Влияние низкомолекулярной (LMW) и высокомолекулярной (HMW) гиалуроновой кислоты (ГК) на экспрессию IL-10 при стимуляции агонистами TLR3 и TLR4. Астроциты предварительно обрабатывали в течение 0,5 или 48 ч HMW (10, 100 или 450 мкг/мл) и LMW (10, 100 или 450 мкг/мл) ГК отдельно или в комбинации с LPS (100 нг/мл) или PIC (10 мкг/мл) в течение 4 ч. Относительные уровни мРНК IL-10 определяли методом ПЦР в реальном времени, данные нормировали на уровни мРНК  $\beta$ -актина. Концентрацию белка IL-10 измеряли методом ИФА в супернатантах образцов при длительной (белые столбы) и краткосрочной (черные столбы) обработке HMW (450 мкг/мл) и LMW (450 мкг/мл) ГК с последующей стимуляцией LPS или PIC в течение 4 ч. Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов, проведенных в трех экземплярах. \* $p < 0,05$  по сравнению со стимулированными клетками (А, Б, Д, Е), \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками в (В, Г).

### 3.2.2.3 Модуляция синтеза оксипинов с помощью HMW и LMW ГК

Для характеристики изменений синтеза оксипинов были получены профили при стимуляции LPS и PIC на фоне обработки клеток ГК разной длины (Рис. 3.29А). Данные представлены в виде тепловой карты, где по горизонтальной оси указаны стимулы, а по вертикальной оси — относительное количество ( $\ln$ ) каждого липидного медиатора.



**Рис. 3.29.** Тепловая карта изменения профиля оксилипинов при обработке астроцитов LMW и HMW ГК и стимуляции TLR3, TLR4 рецепторов. Тепловая карта показывает относительное количество каждого липидного медиатора по сравнению с контролем. По горизонтальной оси указаны стимулы, а по вертикальной оси - относительное количество (ln) каждого липидного медиатора. (А) Астроциты обрабатывали высокомолекулярной (HMW, 450 мкг/мл) и низкомолекулярной (LMW, 450 мкг/мл) гиалуроновой кислотой в течение 0,5 или 48 ч, LPS (100 нг/мл) или PIC (10 мкг/мл) в течение 4 ч. (Б) Астроциты предварительно обрабатывали в течение 0,5 или 48 ч HMW (HMW, 450 мкг/мл) и (LMW, 450 мкг/мл) ГК, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) или PIC (10 мкг/мл) в течение 4 ч. Значения представляют собой среднее значение из трех независимых экспериментов. Метаболиты были разделены на: Липоксигеназный (LOX), циклооксигеназный (COX) и цитохромный (CYP) пути биосинтеза оксилипинов.

Во внеклеточной среде астроцитов было идентифицировано: 1) производные арахидоновой кислоты (AA), образующиеся по LOX (11-НЕТЕ, 12-НЕТЕ, 5-НЕТЕ), CYP (14,15-DHET, 19-НЕТЕ) и COX (12-ННТ, 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, PGA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TXB<sub>2</sub>) путям; 2) производные докозагексаеновой кислоты (DHA), образующиеся по LOX (4-, 8-, 10-, 13-, 14-, 16-HDoHE) или CYP (20-HDoHE) путям; 3) производные линолевой кислоты (LA), образующиеся через LOX (9-, 13-HODE, 9-, 13-KODE) и CYP

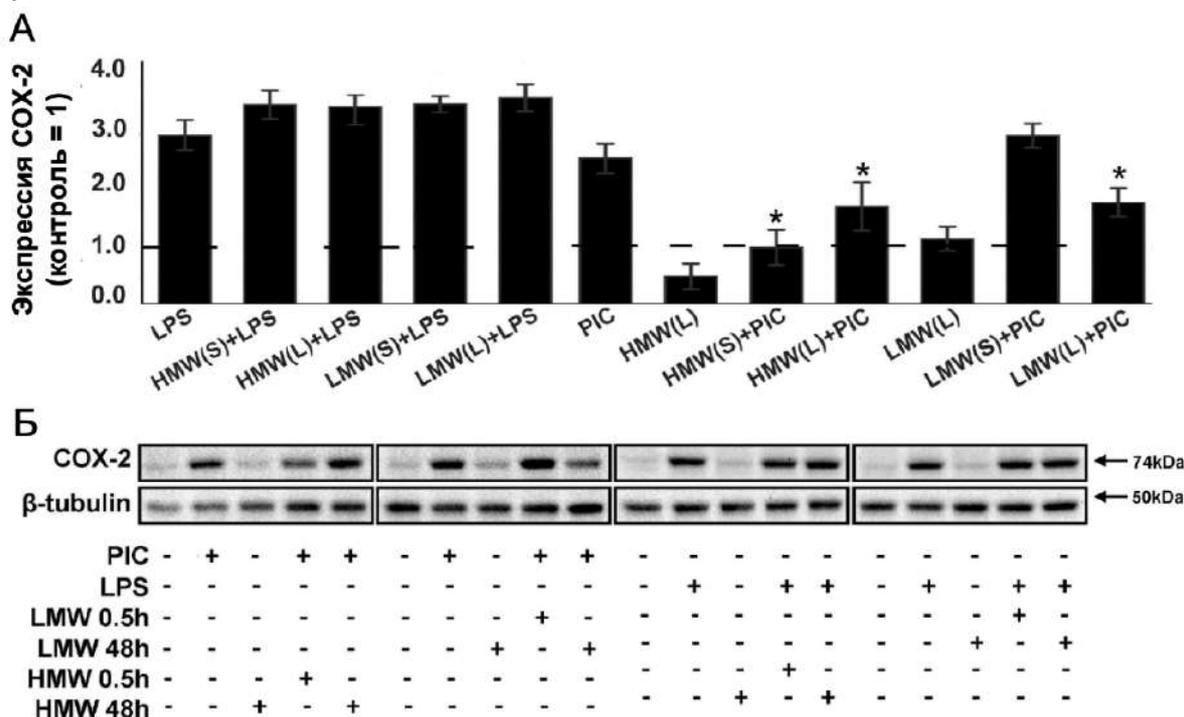
(9,10-DiHOMЕ, 12,13-DiHOMЕ) пути (Рис. 3.29). Также было показано наличие соединения 17,18-DiHETE, производного эйкозапентаеновой кислоты (ЕРА), образующегося по пути СУР, но оно не изменялось при используемых клеточных обработках (Рис. 3.29А). Как LPS, так и стимуляция РИС индуцировали метаболизм АА через СОХ путь (Рис. 3.29А) и метаболизм DHA через LOX путь (Рис. 3.29А).

Хотя изменение профилей оксипиринов под воздействием LMW ГК или HMW ГК ранее не было показано, возможность связи между опосредованным LMW ГК воспалением и метаболизмом арахидоновой кислоты через СОХ путь была показана для моноцитов и макрофагов [291]. На астроцитах этот процесс не изучали. Было сравнено долгосрочное и краткосрочное воздействие ГК и получено, что эффекты различались для LMW и HMW ГК (Рис. 3.29А). Интересно, что влияние кратковременной обработки HMW ГК на такие метаболиты, как 12-NHT, PGF<sub>2α</sub>, 8-HDoHE, сравнимо с эффектами LPS или РИС (Рис. 3.29А). Кроме того, влияние на 5-HETE сопоставимо с ответом клеток на обработку РИС. Эффект добавления ГК с высокой молекулярной массой различается в зависимости от длительности обработки, что указывает на возможность адаптации к действию ГК. ГК с низкой молекулярной массой также влияет на спектр оксипиринов, хотя и в меньшей степени (Рис.3.29А). Кратковременная обработка LMW ГК индуцировала высвобождение PGF<sub>2α</sub> на уровне, сопоставимом со стимуляцией с LPS или РИС. Также наблюдалось заметное уменьшение концентрации 14,15-DHET и 16-HDoHE (Рис. 3.29А). Опять же, долгосрочное применение LMW ГК выявило изменения в профилях оксипиринов по сравнению с краткосрочным применением (Рис. 3.29А).

На следующем этапе было исследовано влияние ГК на профили оксипиринов, индуцированные LPS и РИС (Рис. 3.29Б). На Рис. 3.29Б количество соответствующих оксипиринов в стимулированных клетках было принято за единицу, а изменения каждого обнаруженного соединения при стимуляциях представлены как натуральный логарифм (ln) (Рис. 3.29Б). Было обнаружено, что LMW ГК модулирует LOX путь биосинтеза оксипиринов, и эффект усиливается при длительной экспозиции (Рис. 3.29Б), при этом обе протестированные формы ГК уменьшают СОХ путь, активированный LPS или РИС (Рис. 3.29Б).

### 3.2.2.4 Влияние HMW и LMW ГК на экспрессию COX-2

Влияние ГК на профили оксипинов в PIC-стимулированных астроцитах (Рис. 3.29Б) позволяет предположить изменения уровня экспрессии COX-2, ключевого фермента синтеза простагландинов, после воспалительной стимуляции. Было охарактеризовано изменение уровня LPS- и PIC-стимулированной экспрессии COX-2 под действием HMW и LMW ГК в условиях краткосрочного и долгосрочного воздействия (Рис. 3.30). Получено, что исследуемые формы ГК не влияют на экспрессию COX-2 после стимуляции LPS, в то время как наблюдается значительное снижение экспрессии COX-2 после стимуляции клеток PIC на фоне добавления HMW и LMW ГК (Рис. 3.30). Данные, касающиеся экспрессии белка COX-2 коррелировали с изменениями в синтезе оксипинов, образующихся по COX-пути биосинтеза при соответствующих обработках (Рис. 3.29Б). Это свидетельствует о влиянии ГК на TLR-опосредованный синтез простагландинов в астроцитах через модуляцию метаболического пути COX-2.

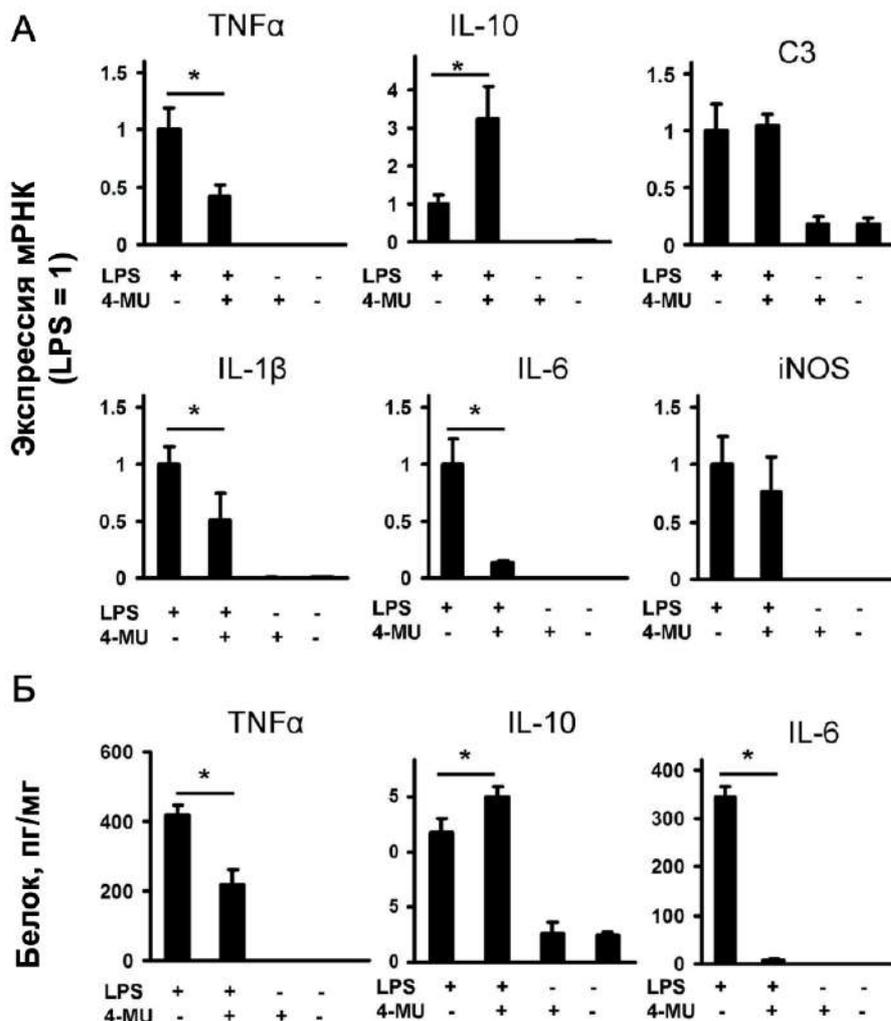


**Рис. 3.30.** Влияние низкомолекулярной (LMW) и высокомолекулярной (HMW) гиалуроновой кислоты на экспрессию COX-2 при стимуляции агонистами TLR3 и TLR4. (А,Б) Астроциты предварительно обрабатывали в течение 0,5 или 48 ч HMW (10, 100 или 450 мкг/мл) и (10, 100 или 450 мкг/мл) отдельно или в комбинации с LPS (100 нг/мл) или PIC (10 мкг/мл) в течение 4 ч. Уровни белка COX-2 оценивали методом вестерн-блоттинга. (Б) Пример является репрезентативным для трех независимых экспериментов. Значения представляют собой среднее  $\pm$  СО из трех независимых экспериментов, проведенных в трех экземплярах. \* $p < 0,05$  по сравнению с PIC- или LPS-стимулированными клетками.

### **3.2.2.5 LPS-индуцированное высвобождение цитокинов и оксилипинов модулируется ингибитором синтеза гиалуроновой кислоты, 4-метилумбеллифером (4-MU)**

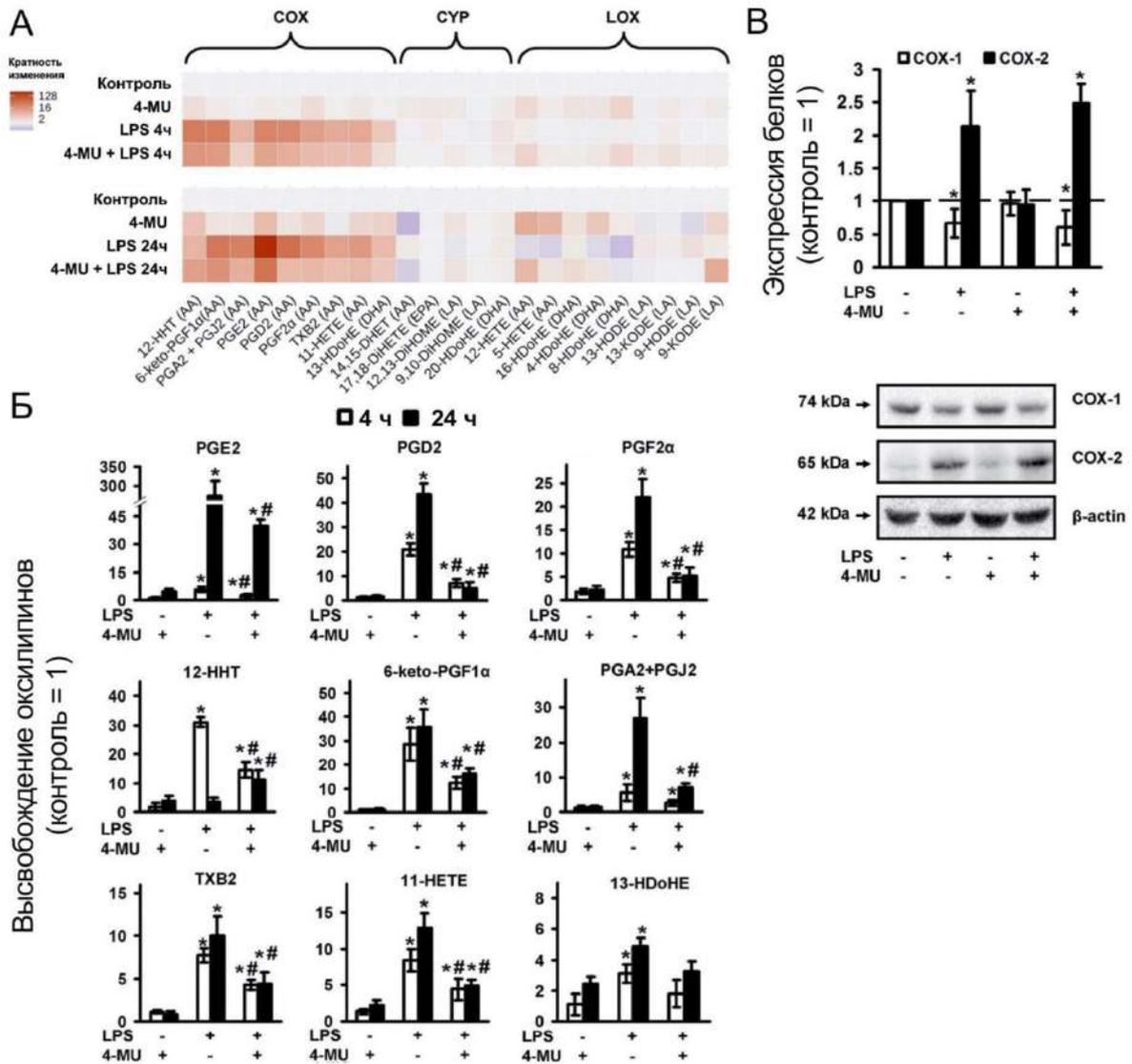
Поскольку было показано, что LPS-индуцированное высвобождение провоспалительных цитокинов и оксилипинов изменяется под действием экзогенно добавленной ГК (Рис. 3.27-3.29), то в качестве следующего шага проверили, как 4-MU может модулировать высвобождение провоспалительных веществ. Это соединение продемонстрировало свою эффективность в разных экспериментах *in vivo* и *in vitro* (см. Литобзор 1.5.5), однако оно не было исследовано в моделях стимуляции воспаления на клетках нервной системы.

Астроциты предварительно обрабатывали 4-MU в течение 30 мин, затем добавляли LPS (100 нг/мл) на 4 ч и оценивали экспрессию мРНК провоспалительных маркеров TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , C3, iNOS, IL-6 и противовоспалительного маркера IL-10 методом qPCR (Рис. 3.31А). 4-MU ингибирует LPS-индуцированную экспрессию мРНК TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, не влияет на экспрессию мРНК C3 и iNOS, и потенцирует экспрессию мРНК IL-10. Уровни экспрессии генов мРНК коррелируют с уровнями белка для TNF $\alpha$ , IL-10 и IL-6 (Рис. 3.31Б). Таким образом, 4-MU обладает не только противовоспалительной активностью (снижает выброс провоспалительных цитокинов), но и потенцирует экспрессию противовоспалительного цитокина IL-10.



**Рис. 3.31.** Влияние 4-MU на LPS-стимулированный клеточный ответ астроцитов. Первичные культуры астроцитов крысы предварительно обрабатывали 4-метилумбеллифероном (4-MU, 400 мкМ) в течение 30 мин, а затем стимулировали липополисахаридом (LPS) (100 нг/мл) в течение 4 ч. (А) уровни мРНК маркеров воспаления (TNFα, IL-10, C3, IL-1β, IL-6 и iNOS) определяли методом количественной ПЦР в реальном времени, LPS = 1. (Б) высвобождение белков TNFα, IL-10 и IL-6 измеряли методом ИФА в образцах супернатанта. Результаты выражены в пг/мг. Значения представляют собой среднее ± СО из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

На следующем этапе было оценено, как обработка клеток 4-MU влияет на профиль оксипинов и экспрессию COX-1 и COX-2 после 4 ч и 24 ч стимуляции LPS (Рис. 3.32). Данные изменения профиля оксипинов представлены в виде тепловой карты, где по горизонтальной оси указаны стимулы, а по вертикальной - относительное количество ( $\log_2$ ) каждого липидного медиатора (Рис. 3.32А).



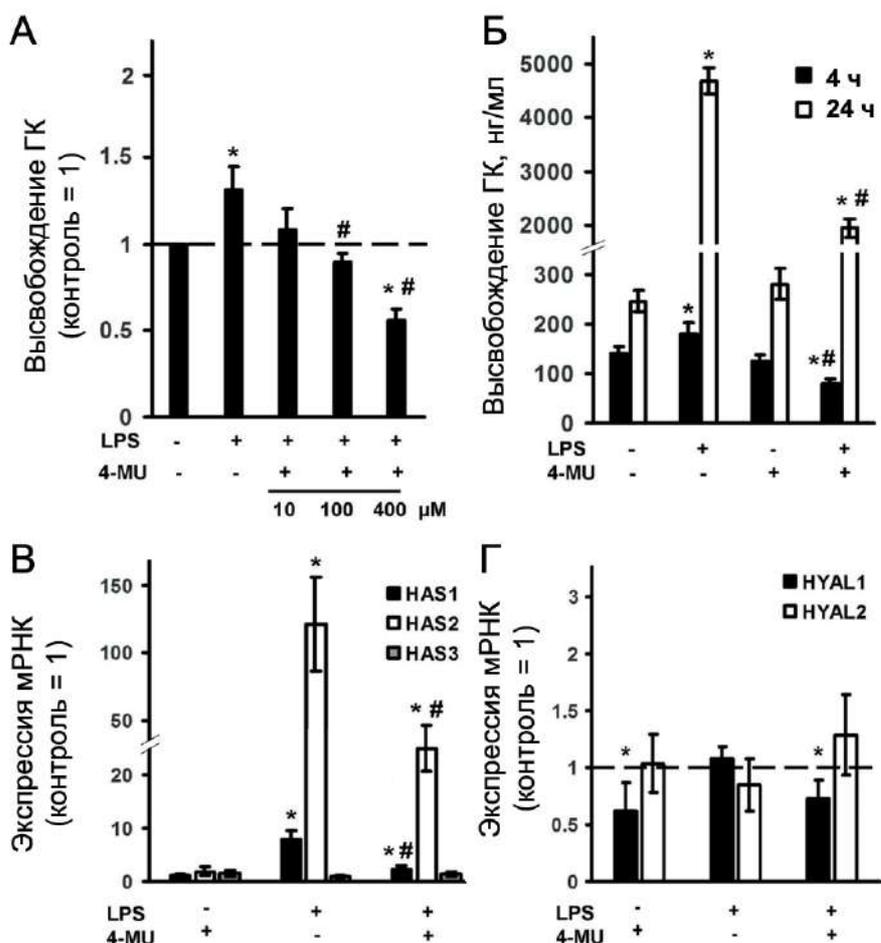
**Рис. 3.32.** Влияние 4-метилумбеллиферона (4-MU) на высвобождение оксипинов и экспрессию циклооксигеназ в LPS-стимулированных астроцитах. Первичные крысиные астроциты предварительно обрабатывали в течение 30 мин 4-MU (400 мкМ), а затем стимулировали LPS (100 нг/мл, 4 или 24 ч.). (А) Тепловая карта показывает относительное количество каждого липидного медиатора по сравнению с контролем. По вертикальной оси указаны стимулы, а по горизонтальной оси - относительное количество ( $\log_2$ ) каждого липидного медиатора. (Б) относительное количество липидных медиаторов, образующихся под действием COX. (В) Уровни белков COX-1 и COX-2. Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, # $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

В клетках, обработанных LPS, наблюдалось наиболее значительное увеличение концентрации метаболитов COX-пути, а именно: метаболитов арахидоновой кислоты (AA) 12-HHT, 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, PGA<sub>2</sub> + PGJ<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TXB<sub>2</sub> и 11-HETE, а также метаболита докозагексаеновой

кислоты (DHA) 13-HDoHE (Рис. 3.32А). 4-MU снижает влияние LPS на синтез этих оксипинов как через 4, так и через 24 часа после стимуляции (Рис. 3.32Б). Полученные данные позволяют заключить, что 4-MU оказывает противовоспалительное действие на LPS-стимулированные астроциты, снижая синтез провоспалительных COX-производных оксипинов. Поэтому было проанализировано влияние 4-MU на изменение экспрессии COX-1 и COX-2 в LPS-стимулированных клетках (Рис. 3.32В). Было показано значительное снижение экспрессии COX-1 и увеличение экспрессии COX-2 в стимулированных LPS клетках. В то же время тестируемая концентрация 4-MU не влияла на LPS-стимулированную экспрессию COX-1 и COX-2. Полученные данные демонстрируют, что влияние 4-MU на TLR4-опосредованный синтез эйкозаноидов в астроцитах не реализуется через механизм подавления экспрессии ферментов семейства циклооксигеназ.

### **3.2.2.6. LPS индуцирует экспрессию ферментов ГК-синтаз и высвобождение ГК, что ингибируется при действии 4-MU**

Известно, что астроциты могут синтезировать ГК [292], и было показано, что ГК может модулировать LPS-опосредованные ответы астроцитов (Рис. 3.27-3.29). Поэтому в следующей серии экспериментов проверили, может ли LPS модулировать высвобождение ГК во внеклеточную среду и, если да, то ингибирует ли 4-MU этот процесс (Рис. 3.33А,Б). Действительно, LPS индуцировал высвобождение ГК после 4 ч обработки, и эффект усиливался через 24 ч (Рис. 3.33Б). Ингибирующий эффект 4-MU зависел от концентрации, он наблюдался даже при 100 мкМ (Рис. 3.33А), и эффект сохранялся в течение 24 ч инкубации с LPS (Рис. 3.33Б). Обратите внимание, что концентрация ГК в нестимулированных клетках не изменялась под действием 4-MU ни через 4, ни через 24 часа инкубации (Рис. 3.33Б). В то же время, 4-MU устранял увеличение ГК как после 4, так и 24 часов стимуляции LPS.



**Рис. 3.33.** Влияние 4-метилумбеллиферона (4-MU) на высвобождение гиалуроновой кислоты и изменение экспрессии мРНК ферментов метаболизма ГК, синтаз ГК (HAS1, HAS2, HAS3), гиалуронидаз (HYAL1 и HYAL2) в LPS-стимулированных астроцитах. (А) первичные культуры астроцитов крысы предварительно обрабатывали 4-MU (10 мкМ, 100 мкМ или 400 мкМ) в течение 30 мин, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл, 4 ч). (Б-Г) астроциты предварительно обрабатывали 4-MU, 400 мкМ в течение 30 мин, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч (Б-Г) или 24 ч (Б). (Б) высвобождение ГК измеряли методом ИФА в образцах супернатанта. Результаты выражены в нг/мл. (В,Г) экспрессия мРНК HAS1, HAS2, HAS3, HYAL1 и HYAL2 определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (qPCR). \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, # $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

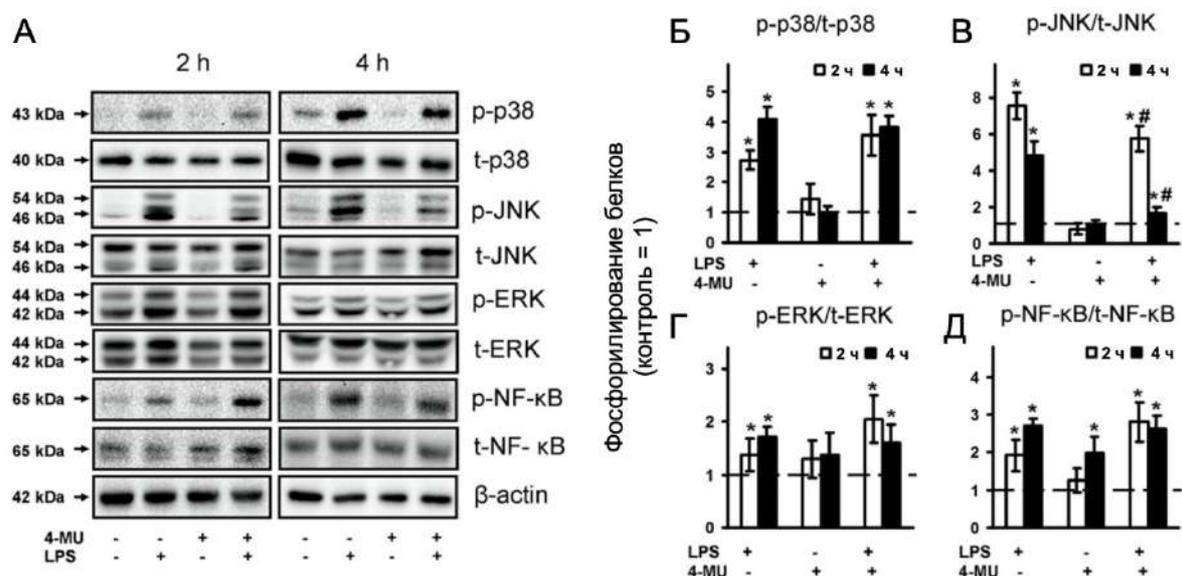
Синтез ГК осуществляется тремя различными ферментами синтазы ГК (HAS1, HAS2 и HAS3) [293]. Деградация ГК осуществляется двумя изоформами гиалуронидаз, HYAL1 и HYAL2 [211]. Было оценено изменение экспрессии этих пяти ферментов после стимуляции астроцитов LPS и чувствительность изменений этих экспрессий к воздействию 4-MU (Рис. 3.33В,Г). После 4 ч обработки LPS наблюдалось умеренное увеличение экспрессии мРНК HAS1 (в 5 раз) и значительное увеличение мРНК HAS2

(в 120 раз) (Рис. 3.33В), в то время как мРНК HAS3 (Рис. 3.33В), HYAL1 и HYAL2 (Рис. 3.33Г) не изменялись. 4-MU ингибирует LPS-индуцированную экспрессию мРНК HAS1 и HAS2 (Рис. 3.33В) и обладает слабым, но значимым ингибированием HYAL1,2, при предобработке клеток 4-MU с последующим добавлением LPS или без стимуляции LPS (Рис. 3.33Г). Вместе взятые, данные на Рис. 3.33 позволяют предположить, что противовоспалительное действие 4-MU на цитокины и оксипирины взаимосвязано с его влиянием на синтез ГК.

### **3.2.2.7 4-MU модулирует TLR-опосредованную активность JNK, но не p38, ERK MAPK и NF-κB**

Чтобы оценить внутриклеточные механизмы действия 4-MU, было исследовано его влияние на фосфорилирование NF-κB, p38, JNK и ERK MAPK (Рис. 3.34). Как и в предыдущих сериях экспериментов, астроциты предварительно обрабатывали в течение 30 мин 4-MU, затем подвергали воздействию LPS (100 нг/мл) и без него в течение 4 ч. Уровни белков p38, p-p38, pJNK, JNK, pERK1/2, ERK1/2, p-NF-κB и NF-κB оценивали методом вестерн-блоттинга (Рис. 3.34А). Чтобы оценить влияние времени обработки на фосфорилирование клетки также стимулировали LPS (Рис. 3.34). LPS активировал фосфорилирование p38 MAPK, эффект усиливался с течением времени (Рис. 3.34Б). Активация сигнальных путей TLR4 вызывала повышение фосфорилирования всех измеряемых белков в течение 4 ч с пиком в 2 ч для JNK (Рис. 3.34Б-Г). LPS-стимулированное увеличение фосфорилирования JNK было сильнее после 2 ч обработки LPS, чем после 4 ч (Рис. 3.34В). Менее значительным было увеличение уровней фосфорилирования ERK (Рис. 3.34Г) и NF-κB (Рис. 3.34Д). Добавление 4-MU без стимуляции не повлияло на уровни фосфорилирования MAPKs (Рис. 3.34А-В). Также увеличивался уровень фосфорилирования NF-κB в клетках, предварительно обработанных 4-MU 4 ч (Рис. 3.34Д), что указывает на комплексное воздействие 4-MU. Заметное снижение уровня фосфорилирования MAPK в клетках, обработанных 4-MU с последующей стимуляцией LPS, было значительным только для JNK, причем эффект проявлялся как через 2, так и через 4 ч стимуляции (Рис. 3.34В). Эти данные позволяют предположить, что некоторые эффекты 4-MU в стимулированных LPS астроцитах могут быть связаны с JNK-опосредованными процессами. Участие JNK MAPK в

противовоспалительном действии 4-MU ранее не было показано, и эти данные получены нами впервые.



**Рис. 3.34.** Сравнение активности NF-kB, p38, JNK и ERK1/2 MAPK в LPS-стимулированных астроцитах, обработанных 4-MU. Астроциты предварительно обрабатывали в течение 30 мин 4-метилумбеллифероном (4-MU, 400 мкМ) и затем стимулировали LPS (100 нг/мл, 4 ч). Уровни белков p38, p-p38, pJNK, JNK, pERK1/2, ERK1/2, p-NF-KB и NF-kB оценивали методом вестерн-блоттинга в указанное время (указано в ч). (А) Репрезентативные вестерн-блоты, демонстрирующие фосфо-p38 (p-p38), фосфо-JNK (p-JNK), фосфо-ERK1/2, фосфо-NF-kB и общий уровень белков p38 (p38), общий JNK (JNK), общий ERK1/2 и общий NF-kB. Пример является репрезентативным для трех независимых экспериментов. (Б-Д) Результаты выражены как кратность изменения по сравнению с необработанными контрольными астроцитами. Значения представляют собой среднее ± СО из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, # $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

Таким образом, было показано, что как LMW, так и HMW ГК, 1) влияют на уровни цитокинов и оксипинов, 2) индуцируют клеточную адаптацию при длительном применении, 3) модулируют сигнальные пути TLR4 и TLR3. Эффекты HMW и LMW ГК проявляются преимущественно в TLR4- и TLR3-опосредованных ответах, соответственно.

Полученные результаты еще раз позволяют подчеркнуть специфичность процессов врожденного иммунитета в астроцитах. Несомненно, что ГК, как в LMW, так и в HMW формах, играет важную роль в сигнальном пути TLR в астроцитах, хотя эта роль не является просто противовоспалительной для HMW ГК или провоспалительной для LMW

ГК. Обработка астроцитов ингибитором синтеза ГК 4-MU может быть эффективной в отношении LPS-опосредованной воспалительной реакции в астроцитах. Воздействие 4-MU привело к снижению синтеза провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-6) и простагландинов, а также увеличению синтеза IL-10, который считается цитокином разрешения. Этот факт позволяет обсуждать действие 4-MU не только как противовоспалительного вещества, но и как стимулятора процессов разрешения.

Эффекты характеризовались снижением выработки ГК клетками, уменьшением LPS-опосредованной экспрессии HAS1 и HAS3 и снижением активации JNK MAPK. В целом, 4-MU является потенциально перспективным веществом, обладающим противовоспалительной и прорезорбтивной активностью при воспалительных процессах в ЦНС.

Ранее было показано, что 4-MU снижает LPS-стимулированный синтез воспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) в фибробластах роговицы [213]. Препарат снижал LPS-индуцированную продукцию цитокинов (IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$ ) в культурах клеток селезенки [219]. Полученные данные согласуются с этими результатами.

Что касается механизмов клеточной сигнализации, эффект 4-MU специфичен и снижает фосфорилирование JNK без ослабления NF- $\kappa$ B, p38 MAPK или ERK. Эти данные согласуются с ранее опубликованными результатами воздействия 4-MU на IL-1-стимулированные хондроциты человека или быка, где не было получено изменений в NF- $\kappa$ B, p38 и ERK MAPK (JNK не измеряли) [294]. Важно отметить, что многие исследования, связанные с измерением фосфорилирования белков, проведены на линиях раковых клеток. Участие 4-MU в ингибировании фосфорилирования ERK было показано на примере клеток злокачественной плевральной мезотелиомы [295] и клеточных линий плоскоклеточной карциномы пищевода [296]. 4-MU подавлял активность NF- $\kappa$ B и снижал уровень фосфо-I $\kappa$ B в клетках рака простаты [297]. 4-MU приводил к значительному увеличению фосфорилирования p38 в клетках хронического миелоидного лейкоза K562 [298]. Отметим, что добавление 4-MU индуцировало каспазозависимый апоптоз, характеризующийся снижением выработки ГК и увеличением фосфорилирования p38 [298]. По всей видимости механизмы действия 4-MU различаются между раковыми и не раковыми клетками.

Молекулярные механизмы противовоспалительного действия 4-MU и взаимосвязь с синтезом ГК до сих пор не очевидны. Существует возможность действия 4-MU сразу по нескольким путям [294]. Действительно, ГК обычно синтезируется HAS1, HAS2 и HAS3 на плазматической мембране с использованием цитозольных субстратов UDP-глюкуроновой кислоты (UDP-GlcUA) и UDP-N-ацетил-глюкозамина (UDP-GlcNAc) [293]. Оба субстрата образуются путем переноса UDP-остатка на глюкуроновую кислоту или N-ацетилглюкозамин с помощью UDP-глюкуронозилтрансферазы (UGT), а доступность субстрата контролирует синтез ГК [211,299,300]. UDP-GlcNAc также является субстратом для O-GlcNAc трансферазы, которая играет центральную роль в контроле многих цитозольных путей, и существует гипотеза, что система метаболизма ГК служит в том числе для контроля приемлемого нормального диапазона цитозольных концентраций UDP-GlcNAc для поддержания нормальных функций клетки [293]. В этой системе 4-MU ковалентно связывается через свою гидроксильную группу в четвертом положении с глюкуроновой кислотой через UGT, образуя 4-MU-глюкуроновую кислоту, которая не является субстратом HAS. Таким образом, 4-MU снижает содержание UDP-GlcUA внутри клеток и ингибирует синтез ГК [293]. Этот эффект 4-MU как улавливателя субстратов был показан ранее [211,299]. Кроме того, обработка 4-MU снижала экспрессию мРНК HAS [213,299] и уменьшала экспрессию мРНК для пирофосфорилазы и дегидрогеназы UDP-глюкозы, которые являются критическими ферментами для синтеза предшественников ГК [301]. Нам удалось найти только одну работу, посвященную взаимодействию астроцитов и 4-MU. Это вещество использовалось в качестве маркера активности UDP-глюкуронозилтрансферазы, измеряемой в клеточных лизатах [302]. Активность глюкуронизации и экспрессия изоформы UGT1A6 UDP-глюкуронозилтрансферазы увеличивались после воздействия LPS на астроциты [302]. Таким образом, следует учитывать множественные механизмы действия 4-MU в астроцитах.

Насколько нам известно, связь между 4-MU и синтезом оксипинов ранее не оценивалась. Существуют данные о регуляции синтеза ГК простагландинами и даже свидетельства того, что COX-2/PGE<sub>2</sub> играют центральную роль в регуляции синтеза ГК в процессе атерогенеза [303]. При активации рецепторов простагландинов (PGI и PGE) в гладкомышечных клетках сосудов человека повышается экспрессия генов

HAS1 и HAS2 [303]. Однако механизм обратной связи влияния ингибиторов синтеза ГК на синтез простагландинов еще не изучен. Полученные данные ставят интересный вопрос относительно механизмов действия препарата, поскольку не наблюдалось изменения экспрессии COX-2 или COX-1, однако 4-MU вызывал значительное ингибирование циклооксигеназного пути синтеза оксипинов. Хотя понимание механизма этого процесса требует дальнейшего изучения, важно, что была охарактеризована интересная мишень возможного терапевтического воздействия на нейровоспаление.

### **3.2.3 Сравнение адаптации клеток к длительному воздействию IL-4, IL-10 и LPS**

При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [248,250].

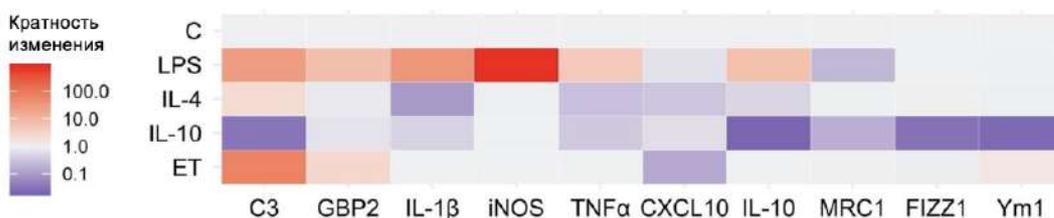
#### **3.2.3.1 Сравнение адаптации клеток к длительному воздействию противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10 и LPS**

Астроциты стимулировали интерлейкинами с противовоспалительными свойствами (IL-4, IL-10) и LPS в течение 24 ч и характеризовали с использованием ранее предложенных маркеров фенотипирования: экспрессия генов IL-10, MRC1, FIZZ1, Ym1 как противовоспалительная адаптация; гены IL-1 $\beta$ , iNOS, TNF $\alpha$ , C3, GBP2, CXCL10 как провоспалительная (классическая) адаптация [154,304] (Рис. 3.35). Дополнительно было проверено, меняет ли адаптация к низкой концентрации LPS (10 нг/мл) экспрессию генов-маркеров (Рис. 3.35А). Такую обработку клеток низкой концентрацией LPS обозначили ET (эндотоксин), чтобы отличить ее стимуляции концентрациями LPS (100 нг/мл) (Рис. 3.35А).

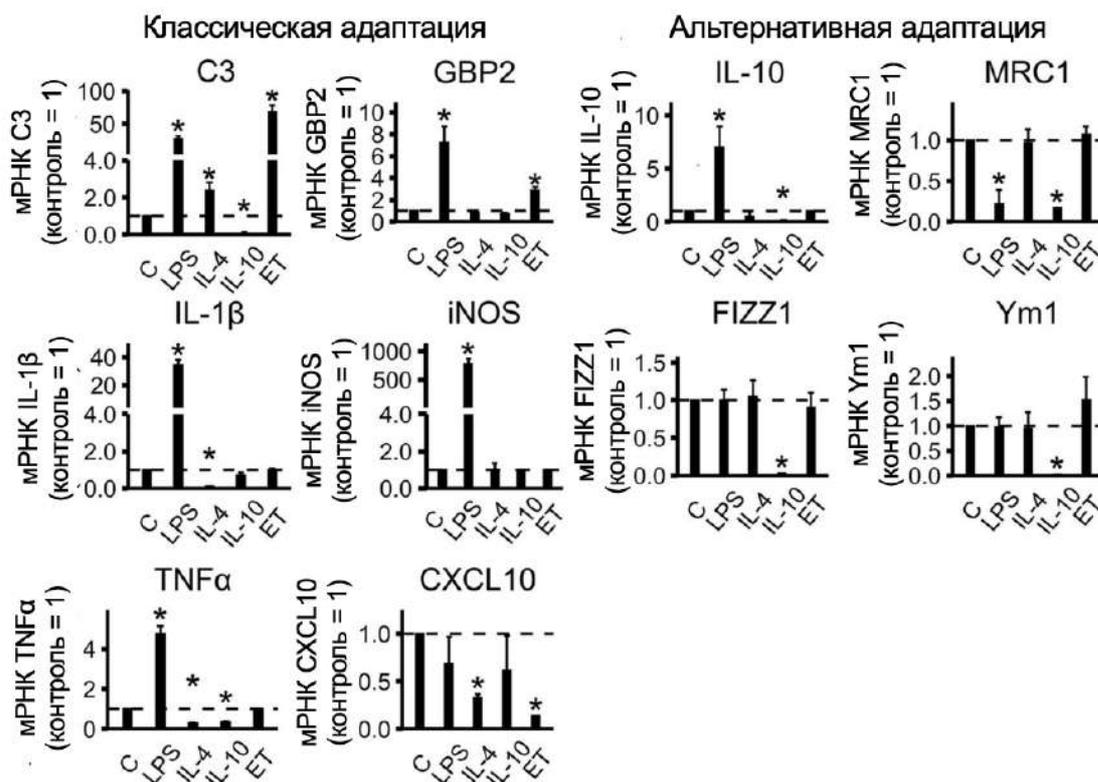
Мы сравнили профили экспрессии маркерных генов в культурах астроцитов крысы после воздействия LPS (100 нг/мл), IL-4 (10 нг/мл) или IL-10 (20 нг/мл) в течение 24 ч (Рис. 3.35), а также проверили, сдвигает ли адаптация к низкой концентрации LPS (ET, 10 нг/мл) ответ астроцитов (Рис. 3.35). После обработки культивируемых астроцитов разными стимулами проводили количественный анализ ПЦР в реальном времени (RT-PCR) для

определения уровней экспрессии мРНК генов, ранее связанных с “классической” или “альтернативной” адаптацией [154,304].

**А**



**Б**



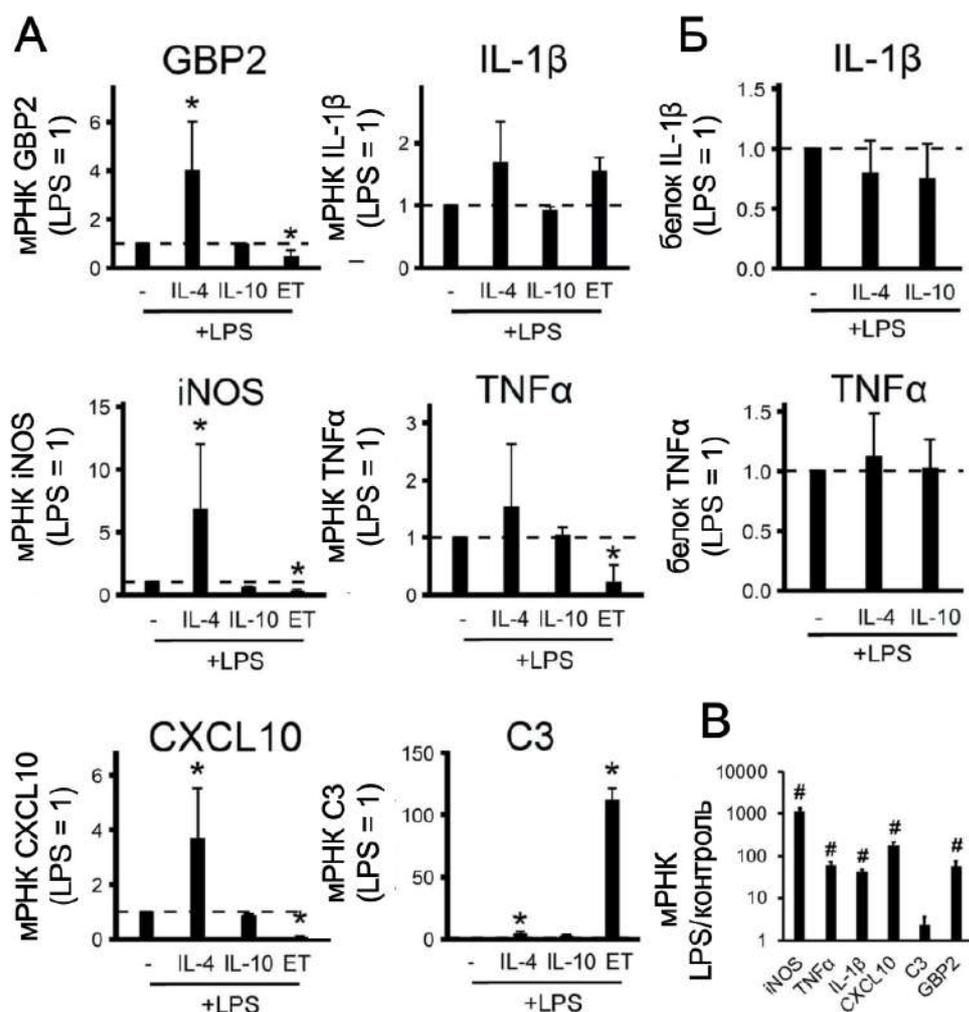
**Рис. 3.35.** Идентификация состояния поляризации астроцитов в первичных культурах астроцитов крысы на основе профилей экспрессии генов. (А) Тепловая карта; (Б) количественный анализ данных экспрессии. Первичные культуры астроцитов крыс обрабатывали LPS (100 нг/мл), IL-4 (10 нг/мл) или IL-10 (20 нг/мл) в течение 24 ч или адаптировали к эндотоксину в модели толерантности (ET, LPS 10 нг/мл, 48 ч). Уровни мРНК маркеров адаптации (C3, GBP2, IL-1β, iNOS, TNFα, CXCL10, IL-10, MRC1, FIZZ1 и Ym1) определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (RT-PCR). Экспрессия генов в необработанных клетках принята за 1. Значения представляют собой среднее ± СО из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками.

Количественный анализ показал, что LPS индуцировал гены, характерные для классической адаптации клеток, в то время как IL-4 и IL-10 индуцировали альтернативную адаптацию (Рис. 3.35Б). Стимуляция LPS

значительно активировала экспрессию большинства провоспалительных генов (С3, GBP2, IL-1 $\beta$ , iNOS, TNF $\alpha$ ) и противовоспалительный ген IL-10, но не влияла на экспрессию генов FIZZ1, Ym1 или провоспалительного гена CXCL10 и даже приводила к снижению гена MRC1, рассматриваемого как маркер альтернативной адаптации (Рис. 3.35Б). Стимулы, активирующие альтернативную адаптацию (IL-4 или IL-10), не оказывали существенного влияния на провоспалительные гены, и даже немного снижали их уровень их экспрессии по сравнению с контролем (Рис. 3.35В). Интересно, что С3, являющийся важным маркером воспаления [305], при длительной обработке IL-4 показывает повышение экспрессии, тогда как обработка IL-10 снижает его экспрессию по сравнению с необработанными клетками. Кроме того, IL-4 не влияет на исследованные маркеры альтернативной адаптации, в то время как обработка IL-10 производит эффект, противоположный эффекту LPS: снижает экспрессию FIZZ1 и Ym1 по сравнению с необработанными клетками, тогда как добавление LPS к необработанным клеткам не влияет на экспрессию генов (Рис. 3.35Б).

Мы показали, что профили экспрессии генов позволяют разделить обработанные астроциты на две группы, которые можно отнести к альтернативным состояниям адаптации (при обработке IL-4, IL-10 и ET) или классическим состояниям адаптации при обработке LPS.

Далее было изучено, как альтернативные состояния адаптации различаются по способности клеток отвечать на острую стимуляцию LPS (100 нг/мл в течение 4 ч) (Рис. 3.36). Ответы оценивали по экспрессии генов-маркеров провоспалительных состояний (Рис. 3.36А) и высвобождению белков IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  (Рис. 3.36Б).



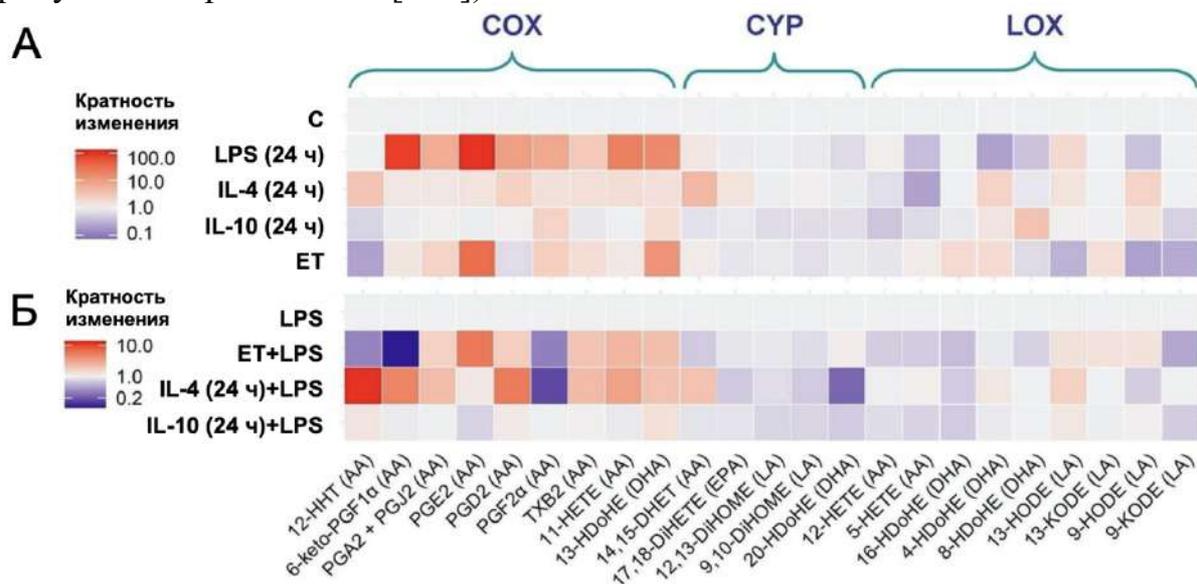
**Рис. 3.36.** Влияние поляризованных астроцитов на воспалительный ответ. Первичные культуры астроцитов крысы предварительно обрабатывали IL-4 (10 нг/мл) или IL-10 (20 нг/мл) в течение 24 ч или адаптировали к эндотоксину в модели толерантности (LPS 10 нг/мл, 48 ч, ET), а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч (уровень экспрессии генов при стимуляции LPS показан пунктирной линией). (А), (В): уровни мРНК были определены с помощью RT-PCR в реальном времени. (Б): высвобождение белков TNFα и IL-1β измеряли методом ИФА в образцах супернатантов (LPS = 1). (В): результаты представлены как Ig, относительно контрольных клеток. Значения представляют собой среднее ± СО из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками, # $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками.

Стимуляция нативных клеток LPS в течение 4 часов вызывала увеличение экспрессии всех исследуемых провоспалительных маркеров, кроме C3 (Рис. 3.36В), поскольку ген C3 относится к категории медленно активируемых генов, экспрессия которых значительно увеличивается после 9 часов стимуляции [305]. Было показано, что обработка клеток IL-4 увеличивала их чувствительность к последующей стимуляции LPS (повышение экспрессии генов GBP2, iNOS, CXCL10, C3) (Рис. 3.36А). Заметим, что клетки, обработанные IL-10, проявляли такие же реакции на

LPS, что и нативные (не стимулированные) клетки (Рис. 3.36А). Обработка клеток в модели ЕТ снижала экспрессию GBP2 iNOS, TNF $\alpha$ , CXCL10, однако значительно увеличила экспрессию гена С3 (Рис. 3.36). Полученные данные показывают, что обработка цитокином IL-4 (но не IL-10) изменяла способность астроцитов активировать сигнальные пути TLR4-опосредованного клеточного ответа при воспалительной стимуляции. Адаптация к ЕТ делает клетки менее чувствительными к острой стимуляции LPS, по сравнению с адаптацией к действию IL-4.

### 3.2.3.2 Профили оксилипинов в астроцитах с различными состояниями адаптации

Чтобы охарактеризовать, как влияет адаптация клеток к различным цитокинам, обладают ли культивируемые астроциты, адаптированные к различным цитокинам или LPS, различными способностями к синтезу оксилипинов, сравнили профили оксилипинов при этих обработках (Рис. 3.37). Наблюдалась четкая разница между исследуемыми фенотипами (Рис. 3.37А). Данные представлены в виде тепловой карты, где по вертикальной оси указаны стимулы, а по горизонтальной - относительное количество каждого липидного медиатора (количественные данные представлены на рисунке S1 приложения [250]).



**Рис. 3.37.** Влияние адаптаций астроцитов на высвобождение оксилипинов. Тепловая карта, отражающая высвобождение оксилипинов. Первичные астроциты крыс обрабатывали IL-4 (10 нг/мл), IL-10 (20 нг/мл) или LPS (100 нг/мл) в течение 24 ч (А) или 4 ч (Б) или адаптировали к эндотоксину в модели толерантности (ЕТ), а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч. По горизонтальной оси указаны стимулы, а по вертикальной оси - относительное количество ( $\log_2$ ) каждого липидного медиатора. Метаболиты были разделены на: Липоксигеназный (LOX), циклооксигеназный (COX) и цитохромный (СYP) пути, участвующие в их синтезе.

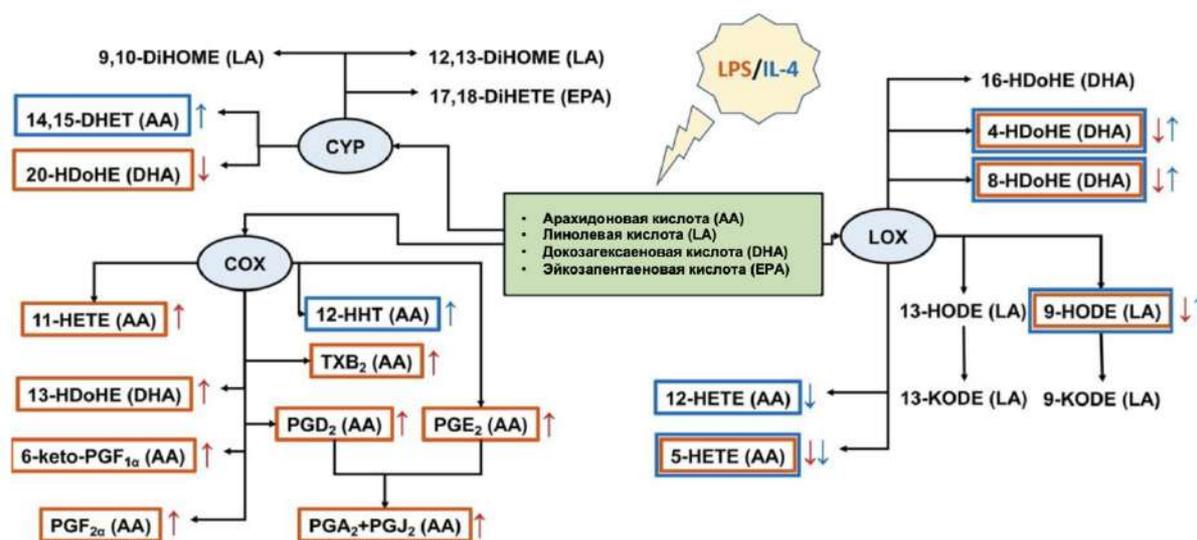
В клетках, адаптированных к LPS, наблюдалось значительное увеличение концентрации эйкозаноидов (т.е. метаболитов арахидоновой кислоты) 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, PGA<sub>2</sub> + PGJ<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TXB<sub>2</sub> и 11-НЕТЕ, а также метаболита докозагексаеновой кислоты (DHA) 13-НДоНЕ (Рис. 3.37А). Наблюдалось снижение метаболитов DHA 20-НДоНЕ, 8-НДоНЕ, 4-НДоНЕ и метаболита АА 5-НЕТЕ (Рис. 3.37А). Клетки, адаптированные к IL-4, демонстрировали другие изменения в профиле: незначительное увеличение 12-ННТ, 14,15-DHET, 4-НДоНЕ, 8-НДоНЕ и 9-NODE, а также снижение 5-НЕТЕ (метаболита АА) (Рис. 3.37А). В клетках, адаптированных к IL-10, не было выявлено изменений в метаболитах, образующихся по COX-пути, но наблюдались незначительные изменения в метаболитах, образующихся по LOX-пути биосинтеза оксилипинов, т.е. увеличение 8-НДоНЕ, 9-NODE и снижение 12-НЕТЕ, 5-НЕТЕ, также наблюдалось снижение CYP-производных метаболитов DHA 12,13-DiНОМЕ, 9,10-DiНОМЕ, 20-НДоНЕ (Рис. 3.37А). Адаптация клеток к ET приводила к увеличению концентрации метаболитов производных COX-пути: PGE<sub>2</sub>, PGA<sub>2</sub>+PGJ<sub>2</sub> и 13-НДоНЕ, и уменьшению 12-ННТ, 8-НДоНЕ, 13-NODE и 9-NODE. Таким образом, при адаптации клеток к различным внешним факторам происходит изменение выбрасываемого профиля оксилипинов.

Различия между состояниями адаптации астроцитов также были обнаружены в их реакции на острую стимуляцию LPS (Рис. 3.37Б). Уровень оксилипинов в клетках, стимулированных LPS без предварительной адаптации, принимался за 1. В клетках, предварительно адаптированных воздействием ET, было отмечено снижение высвобождения PGF<sub>2α</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, 12-ННТ, 14,15-DHET, 12-НЕТЕ и 5-НЕТЕ и повышение уровня PGA<sub>2</sub>+PGJ<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, 11-НЕТЕ и 13-НДоНЕ (количественные данные представлены в приложении [250] на рис. S1). В клетках, подвергнутых предварительной адаптации к воздействию IL-4, также было отмечено снижение высвобождения PGF<sub>2α</sub> 16-НДоНЕ и 20-НДоНЕ, и увеличение 12-ННТ, PGA<sub>2</sub>+PGJ<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, 11-НЕТЕ, 14,15-DHET. В клетках после предварительной адаптации к IL-10 ответ на стимуляцию LPS не наблюдалось изменения в концентрации метаболитов образующиеся по COX-пути по сравнению с LPS-стимулированными клетками без адаптации к IL-10. В то же время наблюдалось снижение концентрации метаболитов, производных DHA - 16-НДоНЕ, 20-НДоНЕ (количественные данные представлены в приложении [250] на рис. S1).

Таким образом, показано, что между “классической” и “альтернативной” адаптацией астроцитов существует значительная разница в профилях оксипинов, что позволяет по-разному отвечать клеткам на острую стимуляцию LPS. В данном исследовании, используя экспрессию генов как различные маркеры клеточной адаптации, предложенные ранее [154,304], было продемонстрировано различие в клеточном ответе астроцитов при активации провоспалительным стимулом LPS и альтернативных стимулах активации, таких как IL-4 и IL-10. И IL-4-, и IL-10-обработанные клетки в большей или меньшей степени могут быть отнесены к альтернативной активации [154]. Хотя существуют особенности между астроцитами из разных источников (например, в экспрессии глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) или виментина) [306,307] и различия между экспрессией некоторых про- или противовоспалительных маркеров в астроцитах, полученных из разных источников и в разных экспериментальных условиях [138,154,308,309], полученные результаты указывают на сходство в адаптивных ответах астроцитов. Хотя и IL-4-, и IL-10-обработанные клетки можно отнести к “альтернативно-активированным” астроцитам по их реактивности, различия в этих фенотипах были заметны в экспрессии всех протестированных генов-маркеров: IL-10, MRC1, FIZZ1 и Ym1.

Мы также сравнили астроциты, обработанные IL-4 и IL-10 в модели ЕТ. Данные об экспрессии маркеров продемонстрировали сходство между состояниями после обработки ЕТ и IL-4 (семь из десяти генов проявили сходство между двумя типами обработки). Однако, несмотря на это, были выявлены значительные различия в экспрессии мРНК тестируемых генов в их реакциях на острую LPS-стимуляцию. Астроциты после адаптации к IL-10 демонстрировали такую же реакцию на LPS, как и не обработанные ранее клетки. Интересно, что наблюдали усиление реакции астроцитов после предобработки IL-4 на LPS-стимулированную экспрессию генов некоторых провоспалительных маркеров. Обработка ЕТ приводила к толерантности при острой стимуляции LPS, то есть к снижению экспрессии мРНК GBP2, iNOS, TNF $\alpha$  и CXCL10. Механизмы таких изменений и функциональное значение подобной транскрипционной адаптации все еще требуют дальнейшего исследования, однако такие различия в реакциях клеток, адаптированных к противовоспалительным стимулам, могут иметь важное значение для функционирования астроцитов в условиях воспаления.

В этой серии экспериментов было показано, что адаптация к LPS (“классическая”) приводит к значительному увеличению количества метаболитов АА образующихся по COX пути метаболизма оксипинов (Рис. 3.38). Кроме того, наблюдалось увеличение 13-HDoHE, производного DHA образующегося через COX-2 путь биосинтеза оксипинов [3]. Можно рассматривать метаболиты пути COX как маркеры классически поляризованных фенотипов. Следует отметить, что одновременное снижение концентрации метаболитов, образующихся через LOX-путь, может отражать конкуренцию за субстраты между различными ветвями метаболизма оксипинов. В качестве маркеров альтернативного поляризованного состояния для IL-4 наблюдали увеличение 14,15-DHET и 9-NODE, 4-HDoHE, 8-HDoHE. 14,15-DHET - стабильный метаболит 14,15-EET, образующийся из АА под действием эпоксигеназ цитохрома P450 [3]. Это вещество повышает жизнеспособность клеток при повреждениях, вызванных окислительным стрессом [310]. 9-NODE может синтезироваться как ферментативным, так и неферментативным путем [27] и считается противовоспалительным веществом [311]. В целом, наблюдается преобладающее участие  $\omega$ -6 ПНЖК и COX-пути для классической и  $\omega$ -3 ПНЖК и LOX-пути для альтернативной адаптации астроцитов.



**Рис. 3.38.** Схема профилей оксипинов для классического (LPS) и альтернативного (IL-4) состояния адаптации астроцитов. Исследуемые оксипины, синтезируемые через метаболические ветви липоксигеназы (LOX), циклооксигеназы (COX) или цитохрома (CYP), отмечены красной рамкой для классической и синей рамкой для альтернативной адаптации. Стрелка соответствующего цвета означает снижение (↓) или повышение (↑) синтеза метаболита.

При ЕТ-адаптации не наблюдалось заметных изменений в синтезе эйкозаноидов, кроме увеличения так называемых циклопентеноновых простагландинов  $PGA_2$  и  $PGJ_2$  (путь АА-СОХ). Профили оксипинов выявили изменения в анализируемых ПНЖК. Снижение содержания 9-НОДЕ, 13-НОДЕ (путь LA-LOX) и 8-НДОHE (DHA, LOX или ферментативный путь) и увеличение 13-НДОHE (путь DHA-СОХ) означает, что этот тип адаптации ближе к классической адаптации астроцитов. Отметим, что специфические профили оксипинов характерны для различных адаптивных состояний астроцитов. Реакция на острый (4 ч) стимул LPS подчеркивает сходство в синтезе оксипинов между классическим и альтернативным состояниями адаптации, т.е. увеличение провоспалительных и уменьшение противовоспалительных оксипинов.

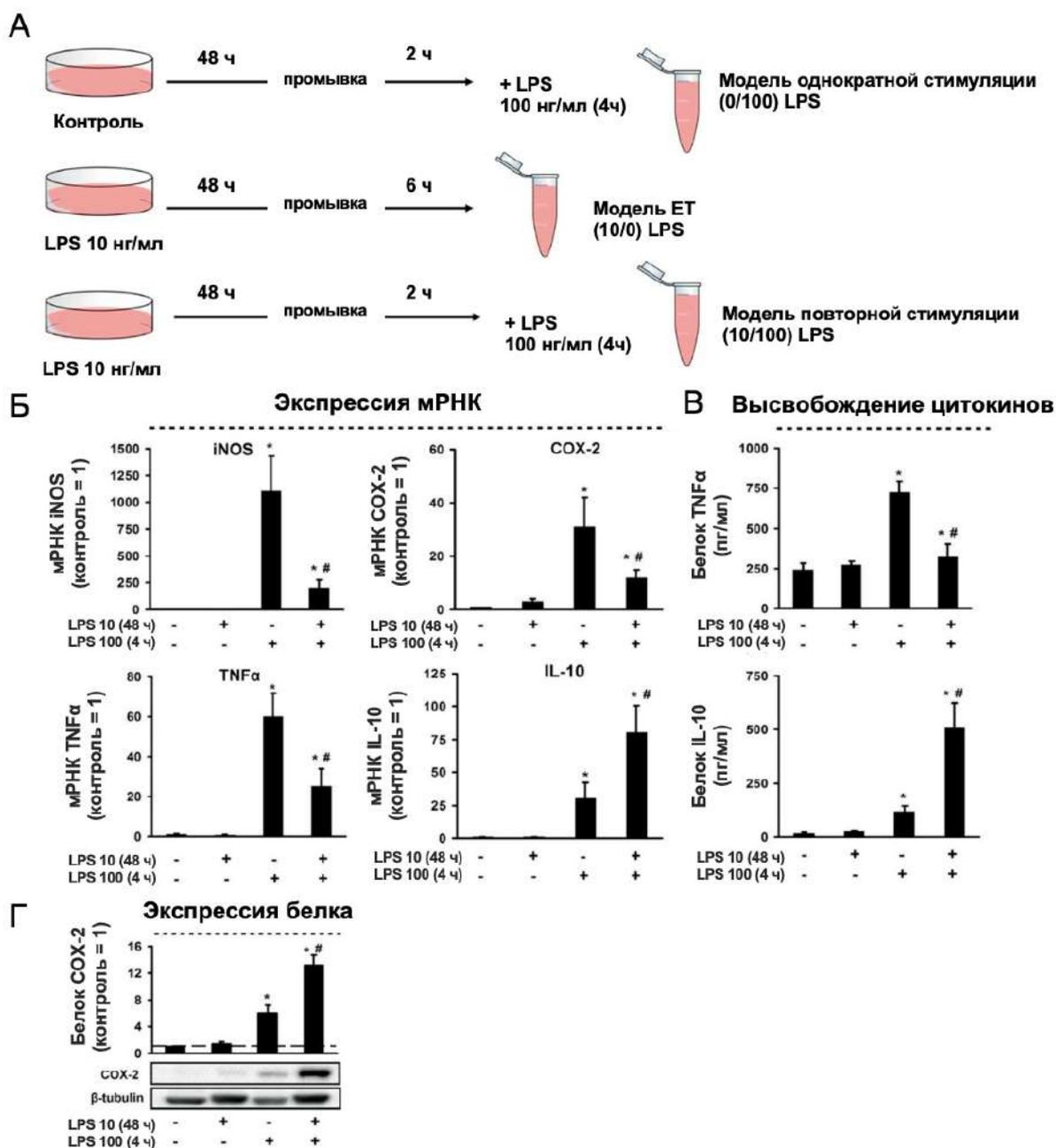
В заключение следует отметить, что длительная стимуляция астроцитов приводит к их адаптации, которая может быть измерена маркерами экспрессии генов или оксипинами. Адаптация к IL-4, но не IL-10, усиливает способность астроцитов активировать сигнальные пути TLR в ответ на LPS, тогда как адаптация к ЕТ делает клетки менее чувствительными к стимуляции. Обнаружение того, что профили оксипинов, связанные с различными состояниями адаптации, можно разделить на провоспалительный или противовоспалительный фенотип, открывает возможность манипулировать ответами клеток на активацию TLR с помощью низкомолекулярных ингибиторов, модуляторов синтеза оксипинов. Наблюдаемое преобладающее участие  $\omega$ -6 ПНЖК и СОХ-ветви для классической (LPS) провоспалительной адаптации и  $\omega$ -3 ПНЖК и LOX-ветви для альтернативной (IL-4) противовоспалительной адаптации указывает на перспективность комбинированного использования ингибиторов СОХ и активаторов LOX для регуляции ответа астроцитов на воспалительный стимул.

### **3.2.3.3 Эндотоксиновая толерантность на астроцитах**

Феномен толерантности к эндотоксину в случае астроцитов практически не изучен. Данные о повторных стимуляциях различными концентрациями LPS указывают на то, что эти клетки могут изменять свою чувствительность при таких воздействиях [225,226]. В работах Beurel и соавторов средние концентрации LPS (100 нг/мл) добавляли к мышинным астроцитам на 24 ч, а затем стимулировали их низкой концентрацией LPS

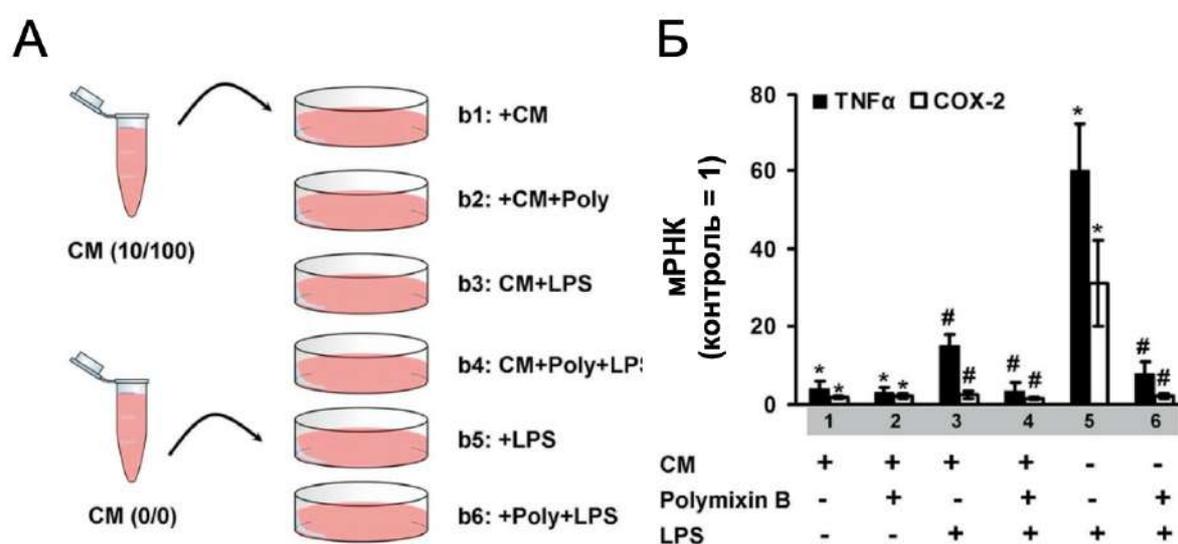
(10 нг/мл) в течение 24 ч [225,226]. Однако в данной модели обработки клеток добавление 100 нг/мл LPS на 24 ч приводит к созданию провоспалительного фенотипа астроцитов [155], что хорошо показано нами ранее (Рис. 3.35-3.38). Эффект толерантности к эндотоксину касается устойчивости обработанных низкой концентрацией клеток к дальнейшему воздействию высокими концентрациями LPS. Для детального изучения феномена адаптации астроцитов к длительному воздействию низких концентраций LPS (10 нг/мл, 48 ч) были исследованы их характеристики, а также способность отвечать на острую стимуляцию LPS (100 нг/мл, 4 ч). Схема эксперимента представлена на Рис. 3.39А. Получена характеристика по маркерам воспаления (TNF $\alpha$ , COX-2 и iNOS) и маркеру защитных процессов при ответе на действие стимула - противовоспалительного цитокина IL-10, а также оценены профили оксипинов в данной модели.

На первом этапе были оценены изменения на уровне мРНК и белка провоспалительного (TNF $\alpha$ ) и противовоспалительного (IL-10) цитокинов (Рис. 3.39 Б-Г). Обнаружено, что низкая концентрация LPS не влияет на экспрессию цитокинов или ферментов на уровне мРНК (Рис. 3.39Б), не влияет на уровень высвобождения TNF $\alpha$  или IL-10 во внеклеточной среде (Рис. 3.39В), не влияет на уровень внутриклеточных белков (Рис. 3.39Г). Существует толерантность к TNF $\alpha$ , iNOS, COX-2 и прайминг для IL-10 на уровне мРНК при вторичной стимуляции (Рис. 3.39Б). Изменения на уровне мРНК сопровождаются аналогичными изменениями в уровнях цитокинов, высвобождаемых в межклеточную среду (Рис. 3.39В). Для внутриклеточной экспрессии COX-2 получен прайминг на уровне белка (Рис. 3.39Г).



**Рис. 3.39.** Изменения про- и противовоспалительных маркеров в клеточной модели толерантности к эндотоксину. (А) общая схема стимуляции. Астроциты стимулировали LPS (100 нг/мл, 4 ч. (“0/100 LPS”)), или астроциты выращивали в среде LPS (10 нг/мл) в течение 46 ч, промывали и выдерживали в свежей среде в течение дополнительных 2 ч (10/0), а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч (10/100). (Б) экспрессия мРНК указанных генов в астроцитах, обработанных LPS (10 нг/мл и 100 нг/мл) в течение 48 ч и 4 ч, соответственно. (В) высвобождение белков TNFα и IL-10 измерялось методом ИФА в образцах супернатанта. (Г) вестерн-блот анализ экспрессии белка COX-2. Значения представляют собой среднее ± СО из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, # $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

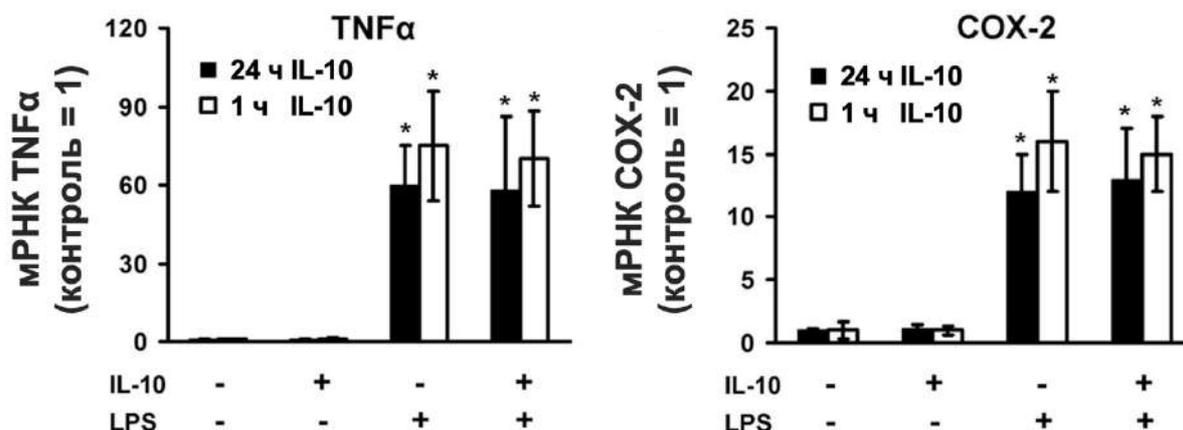
Чтобы оценить возможность того, что клетки в модели толерантности к эндотоксину способны модулировать ответы нативных (необработанных) клеток, была использована схема обработки, показанная на Рис. 3.40А. Отбирали среду из клеточных культур в модели толерантности к эндотоксину (СМ), LPS в среде блокировался полимиксином Б и полученная смесь добавлялась к нативным клеткам. Чувствительность этих клеток к дальнейшей стимуляции LPS оценивали по экспрессии мРНК TNF $\alpha$  и COX-2 (Рис. 3.40Б). Было обнаружено, что клеточная среда, полученная в модели толерантности к эндотоксину, делает другие клетки нечувствительными к действию LPS (Рис. 3.40Б). Это позволяет предположить наличие в среде компонентов, которые модулируют чувствительность нативных клеток.



**Рис. 3.40.** Влияние кондиционированной среды в модели ЕТ на LPS-стимулированную экспрессию TNF $\alpha$  и COX-2. (А) схема обработки кондиционированной средой (СМ). Астроциты выращивали в среде СМ, разбавляли 1:1 свежей DMEM и затем стимулировали LPS (100 нг/мл) отдельно или в комбинации с полимиксином В (Poly, 50 мкг/мл). (Б) Экспрессия мРНК указанных генов. Значения представляют собой среднее  $\pm$  СО из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, # $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

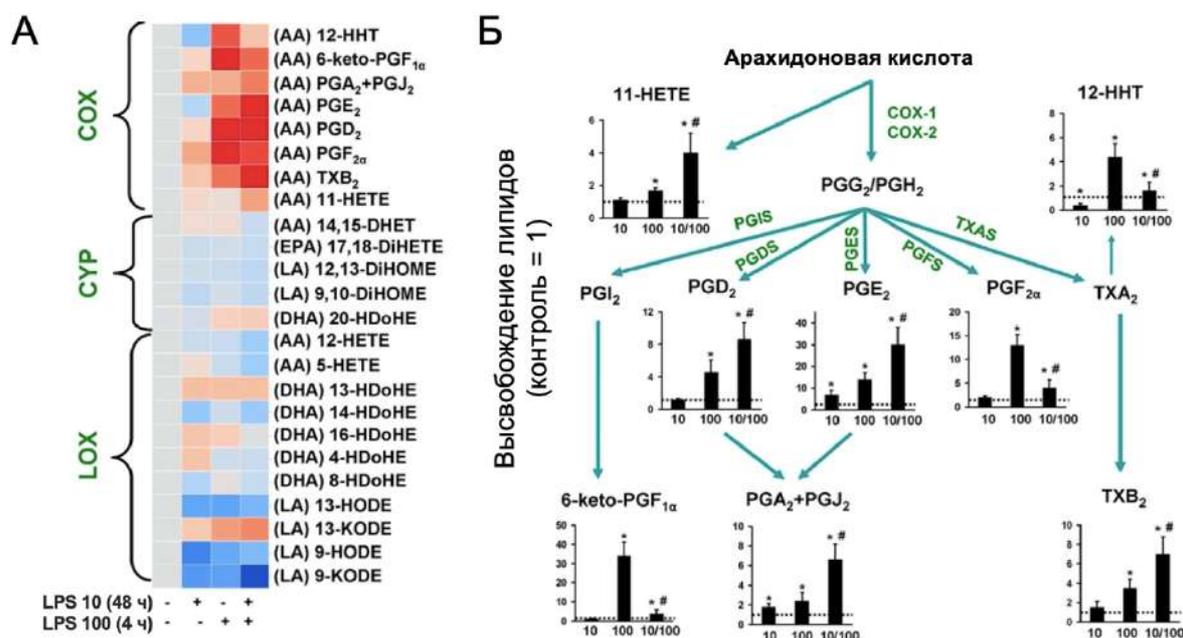
Как уже упоминалось, цитокин IL-10 связан с развитием противовоспалительных процессов в головном мозге [312], поэтому повышение уровня IL-10 в данной модели (Рис. 3.39В) позволяет предположить его участие в механизмах клеточной толерантности в экспериментах с кондиционированной средой (Рис. 3.40Б). Было оценено

изменение экспрессии мРНК TNF $\alpha$  и COX-2 при краткосрочной (1 ч) и долгосрочной (24 ч) обработке клеток IL-10 перед стимуляцией LPS (Рис. 3.41). LPS вызывает увеличение экспрессии TNF $\alpha$  (более чем в 60 раз) и COX-2 (более чем в 12 раз). Что касается добавленного IL-10, то при обеих временных экспозициях не было получено различий в ответах клеток на действие LPS.



**Рис. 3.41.** Влияние краткосрочной и долгосрочной инкубации астроцитов с IL-10 на LPS-опосредованный клеточный ответ. Астроциты предварительно обрабатывали IL-10 (20 нг/мл) в течение 1 ч (белые столбы) или 24 ч (черные столбы), а затем стимулировали LPS (100 нг/мл, 4 ч.). Уровни мРНК определяли с помощью RT-PCR в реальном времени. Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками.

Мы также оценили изменение синтеза оксилипинов в модели толерантности к эндотоксину. Астроциты обрабатывали 10 нг/мл LPS в течение 48 ч, 100 нг/мл LPS в течение 4 ч или обеими концентрациями (LPS 10 + LPS 100) (Рис. 3.42). Все виды обработки LPS оказывали практически одинаковое влияние на оксилипины, образующиеся в ходе LOX- или CYP-путей биосинтеза для всех субстратов (арахидоновая, докозагексаеновая, линолевая кислоты) (Рис. 3.42А). Значительные изменения произошли в метаболизме оксилипинов, образующихся через COX-путь (Рис. 3.42Б). Количество оксилипинов во внеклеточной среде изменилось в 2-3 раза (Нис. 3.42Б). Прайминг происходил в следующих соединениях: 11-НЕТЕ, PGD<sub>2</sub> и PGE<sub>2</sub>, PGA<sub>2</sub> + PGJ<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>. Толерантность наблюдалась в случае 12-ННТ, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  и 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> . Синтез этих веществ был практически остановлен.



**Рис. 3.42.** Высвобождение оксилипинов в клеточной модели толерантности к эндотоксину. Астроциты обрабатывали LPS (10 нг/мл) в течение 48 ч, затем клетки промывали и стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч. (А) Тепловая карта показывает относительное количество каждого липидного медиатора по сравнению с контролем. По горизонтальной оси указаны стимулы, а по вертикальной оси - относительное количество (log<sub>2</sub>) каждого липидного медиатора. (Б) 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 4 ч. \*p<0,05 по сравнению с нативными клетками, #p<0,05 по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

Отметим сходство астроцитов с макрофагами в данной модели толерантности к эндотоксину: 1) толерантность для провоспалительных генов; 2) прайминг экспрессии и высвобождения противовоспалительного цитокина IL-10. Важный результат исследования заключается в том, что по видимому воспалительный ответ не является специфической функцией клеток гемопоэтического происхождения, а скорее представляет собой общие процессы адаптации системы врожденного иммунитета, как в иммунных, так и в неиммунных типах клеток.

Ранее было показано, что IL-10 снижает провоспалительный профиль LPS-активированных астроцитов при добавлении через 1 ч после стимуляции [227]. Было показано, что обработка IL-10 (через 1 ч или 24 ч) перед добавлением стимула не влияет на экспрессию маркеров воспаления. Это интересное явление. Молекулярные механизмы такой зависимости сигнального пути TLR4 от времени добавления IL-10 требуют дальнейшего изучения. Возможно, важна последовательность активации сигнальных путей, т.е. добавление IL-10 к TLR-активированным или LPS к IL-10-

активированным путям. Действительно, хотя экспрессия IL-10 и рецептора IL-10 (IL-10R1) на астроцитах хорошо показана [313], в большинстве исследований IL-10 добавляли одновременно или после стимуляции LPS [227,313]. Было показано, что секреция IL-10 индуцируется LPS в зависимости от времени, в то время как IL-10R1 конститутивно экспрессируется в астроцитах и снижается под действием IL-10 в культурах, обработанных LPS, поэтому был предложен механизм обратной связи для IL-10 [313]. Исходя из полученных данных, можно предположить, что для проявления эффектов IL-10 в LPS-индуцированном ответе астроцитов необходимы какие-то другие внутриклеточные участники. В любом случае, полученные данные позволяют предположить, что IL-10 вряд ли является агентом, индуцирующим толерантность нативных клеток при добавлении внеклеточной среды от клеток, обработанных в модели толерантности к эндотоксину.

Оксилипины могут быть другими предполагаемыми веществами для передачи информации от толерантных клеток к нативным, поскольку этот класс веществ включает как провоспалительные соединения, так и вещества “разрешения воспаления”, которые отвечают за восстановление системы после воздействия провоспалительного стимула [123]. Хотя экспрессию COX-2 долгое время использовали в качестве классического маркера воспаления, изменения в синтезе оксилипинов обычно оценивали по 1-2 соединениям, что не отражает их функционал в регуляции. Очевидно, что экспериментальная парадигма должна быть перенесена с тестирования одного вещества на характеристику влияния смесей оксилипинов. Полученные данные о профилях оксилипинов в клеточной модели толерантности к эндотоксину в астроцитах показывают, что прайминг происходит при использовании следующих соединений: 11-НЕТЕ, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, циклопентеноновые простагландины (PGA<sub>2</sub> и PGJ<sub>2</sub>), TXB<sub>2</sub>. Толерантность наблюдается к 12-ННТ, PGF<sub>2α</sub> и 6-keto-PGF<sub>1α</sub>. Поскольку все эти оксилипины имеют рецепторы в астроцитах, микроглии и нейронах [224], такие значительные изменения в количестве оксилипинов могут привести к значительным изменениям в ответах окружающих клеток. Насколько нам известно, это первое сообщение об изменении соотношения оксилипинов в модели толерантности к эндотоксину.

### 3.2.4 Изменение профиля оксипинов выбрасываемых астроцитами снижает нейротоксичность

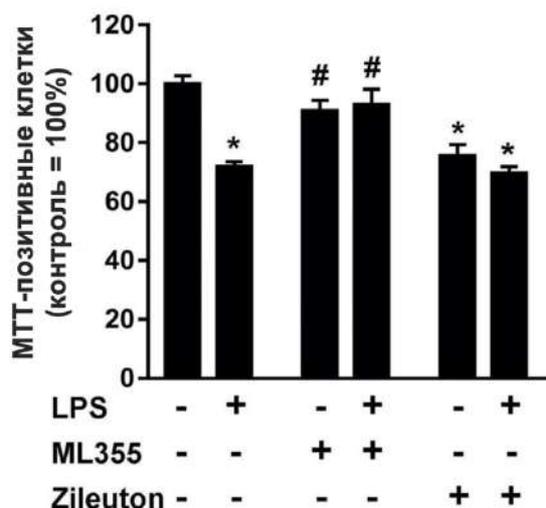
Активация клеток, вызванная провоспалительным стимулом, вызывает одновременное высвобождение различных типов оксипинов (Рис. 3.37). Поэтому в экспериментах на уровне клеток или организма результирующий ответ может проявляться как комбинация взаимных эффектов отдельных оксипинов. Ранее было показано, что супернатанты астроцитов, реагируя на воспалительные стимулы, вызывают гибель нейронов [138]. В серии экспериментов была проверена гипотеза о том, что токсические эффекты активации астроцитов могут быть связаны с оксипинами. Для этого сравнили липидные фракции из нативных и LPS-стимулированных первичных обогащенных культур астроцитов в отношении их нейротоксической активности в первичной культуре нейронов коры головного мозга. При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [314].

Чтобы оценить возможность модуляции нейротоксической активности фракций, были протестированы два вещества, ML355 и Зилеутон, которые добавляли к астроцитам до стимуляции LPS. ML355 и Зилеутон принадлежат к классу ингибиторов LOX-опосредованного синтеза оксипинов. Нейропротекторные эффекты активации LOX-пути биосинтеза оксипинов обсуждались давно [315,316], но точные механизмы все еще исследуются, в основном из-за неопределенного мнения относительно роли окислительного стресса в этих эффектах [317]. Ингибиторы LOX-пути синтеза оксипинов обладают противовоспалительными свойствами. Например, было обнаружено, что зилеутон снижает повреждение мозга и уменьшает экспрессию воспалительных цитокинов в ЦНС [318,319]. Поэтому были оценены изменения профиля оксипинов в астроцитах после обработки клеток ML355 и Зилеутона, указывающих на дальнейшее проявление нейротоксической активности липидных фракций.

### 3.2.4.1 Ингибитор 12-LOX подавляет нейротоксичность липидной фракции LPS-стимулированных астроцитов

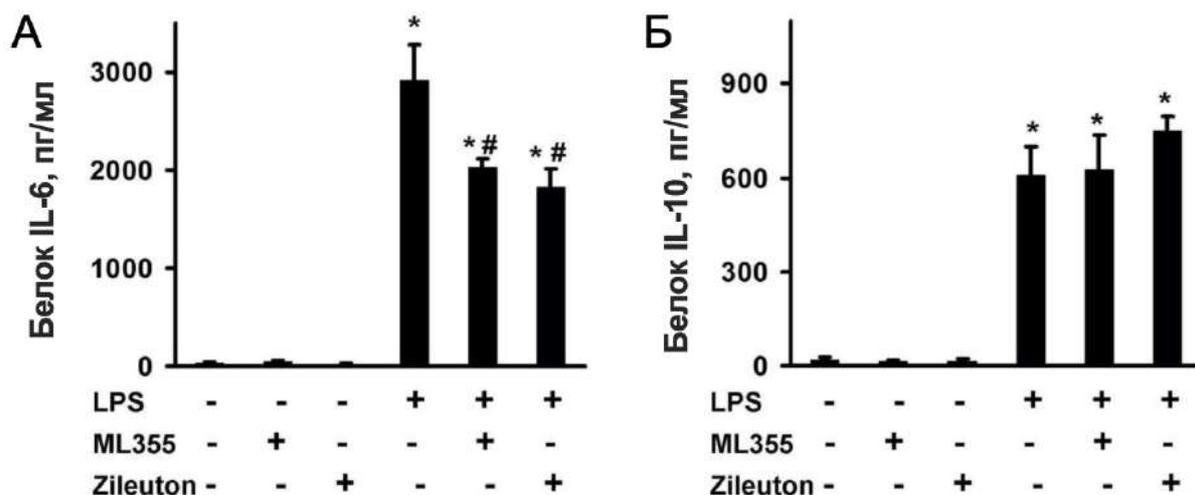
Чтобы оценить вклад оксилипинов в наблюдаемые токсические эффекты, астроциты были подвергнуты стимуляции LPS (100 нг/мл, 24 часа), после чего липидную фракцию выделяли из супернатанта. Полученные фракции добавляли к культуре нейронов в конечной концентрации 1% от общего объема культуральной среды. Затем проводился МТТ-тест и полученные результаты сравнивались с показателями контрольной культуры, в которой нейроны инкубировали с 1% растворителем для выделения липидов (Рис. 3.43).

Липидные фракции из обработанных LPS астроцитов обладали нейротоксической активностью и вызывали снижение жизнеспособности первичной культуры нейронов коры головного мозга крысы на  $28 \pm 1,5\%$  ( $p < 0,001$ ) (Рис. 3.43, левая пара столбов). Для модуляции добавляли ML355 или zileuton к культурам астроцитов на 30 мин, затем инкубировали клетки с LPS и без него в течение 24 ч. Липидные фракции после обработки zileутоном были токсичными, как из нативных, так и из обработанных LPS астроцитов (Рис. 3.43). Фракции астроцитов, обработанных zileутоном или zileутоном + 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 оксилипинов с помощью ML355 устраняет токсический эффект липидной фракции.



**Рис. 3.43.** Липидные фракции из обработанных LPS астроцитов изменяют жизнеспособность нейронов, которой можно управлять с помощью обработки астроцитов ML355 и зилеутона. Первичную культуру нейронов коры головного мозга крысы инкубировали в течение 48 ч с липидными фракциями, которые были приготовлены из внеклеточной среды астроцитов, активированных в течение 24 ч только LPS (100 нг/мл) или с зилеутоном (10 мкМ) или ML355 (ML 10 мкМ). Жизнеспособность клеток измеряли с помощью МТТ-теста. N = 12; \*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.

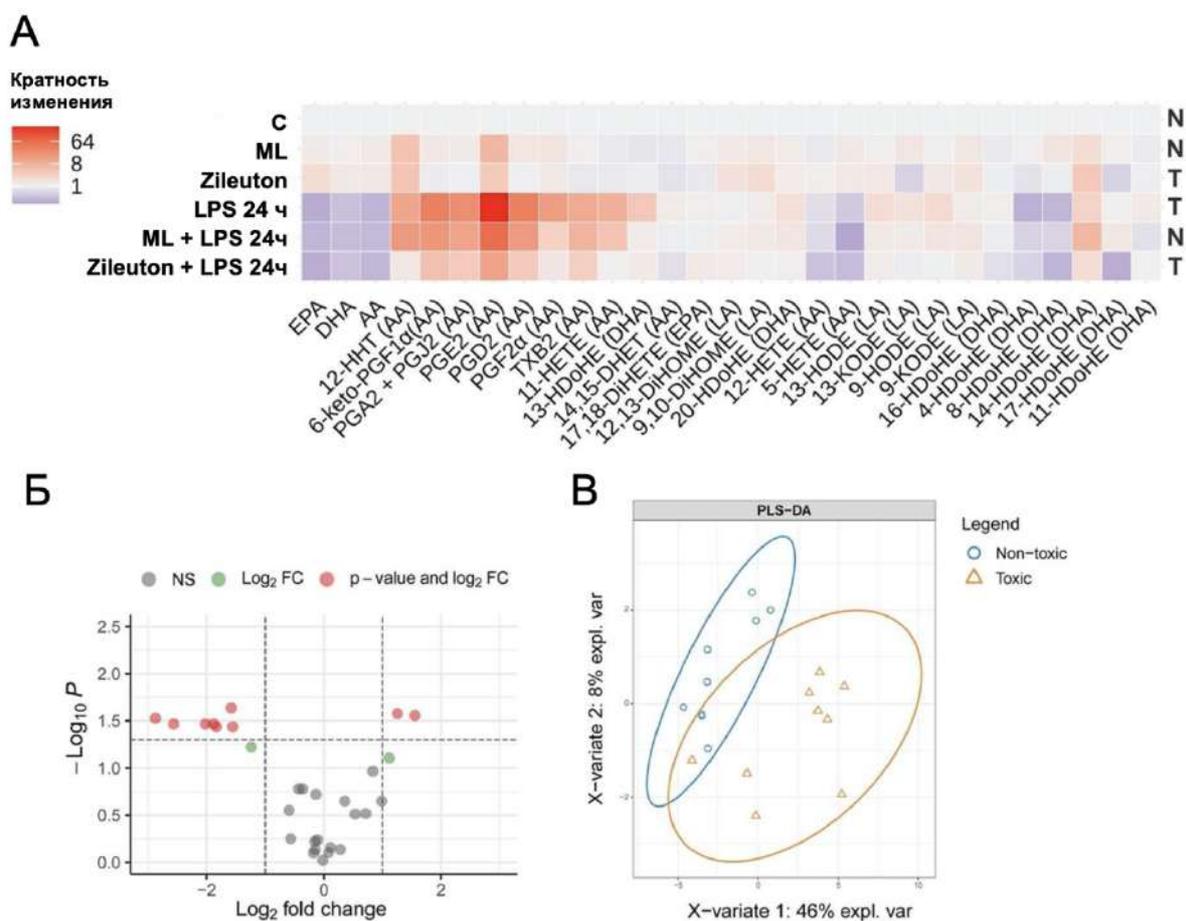
Чтобы сравнить влияние ML355 и зилеутона на синтез цитокинов в астроцитах при стимуляции LPS, было проанализировано высвобождение белков IL-6 и IL-10 при соответствующих обработках (Рис. 3.44). Не было обнаружено различий между исследуемыми агентами, ML355 и зилеутоном, оба снизили уровень высвобождения IL-6 стимулированного LPS (Рис. 3.44А). Исследуемые вещества не влияли на высвобождение IL-10 из LPS-стимулированных астроцитов (Рис. 3.44Б).



**Рис. 3.44** Сравнение эффектов ML355 и Зилеутона на LPS-индуцированное высвобождение IL-6 и IL-10 в астроцитах. Первичные культуры астроцитов крысы предварительно обрабатывали Зилеутоном (Zileuton, 10 мкМ) или ML355 (10 мкМ) в течение 30 мин, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 24 ч. Изменение количества белков IL-6 (А) и IL-10 (Б) измеряли методом ИФА в образцах супернатанта. Результаты выражены в пг/мл. Значения представляют собой среднее  $\pm$  СО из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками; # $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

### 3.2.4.2 Различия в нейротоксичности липидных фракций отражаются в их профилях оксилипинов

Чтобы определить разницу между фракциями липидов, анализировали их профиль методом ВЭЖХ-МС/МС и сравнили профили оксилипинов из астроцитов, обработанных LPS, ML355 и Зилеутоном или их комбинациями в течение 24 ч (Рис. 3.45А). Идентифицировали 29 соединений. Данные представлены в виде тепловой карты, на которой по вертикальной оси указаны стимулы, а по горизонтальной - относительное количество ( $\log_2$ ) каждого липидного медиатора (Рис. 3.45А) (количественные данные представлены в приложении А, таблица А.2).



**Рис. 3.45.** ML355 и зилеутон изменяют профили оксипинов LPS-стимулированных астроцитов. Первичные культуры астроцитов крысы предварительно обрабатывали зилеутоном (10 мкМ) или ML355 (10 мкМ) в течение 30 мин, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 24 ч. (А) Тепловая карта показывает относительное количество каждого липидного медиатора по сравнению с контролем. По вертикальной оси указаны стимулы, а по горизонтальной - относительное количество каждого липидного медиатора ( $\log_2$ ), N- нетоксичная фракция и Т-токсичная фракция. (Б) На вулканной диаграмме показаны значительно изменившиеся соединения при сравнении N и T фракций (изменившиеся соединения с  $p < 0,05$  отмечены красным). (В) Модель частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA) различает токсичные (Т) и нетоксичные (N) фракции нейронов.

Мы разделили липидные фракции, согласно данным, представленным на Рис. 3.45, на "токсичные" (Т - LPS, зилеутон, зилеутон + LPS) и "нетоксичные" (N - контроль, ML355, LPS + ML355). Для оценки различий между нетоксичными и токсичными группами, провели попарное сравнение концентраций метаболитов. Результаты проиллюстрированы с помощью вулканной диаграммы с поправкой Хольма-Бонферрони (Рис. 3.45Б). Выделено два метаболита, концентрация которых была значительно увеличена (4-HDoHE, 8-HDoHE), и семь метаболитов, концентрация

которых значительно снижена (13-HDoHE, PGE<sub>2</sub>, PGA<sub>2</sub> + PGJ<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 11-НЕТЕ, 6-keto-PGF<sub>1α</sub>) (Таблица 3.4).

**Таблица 3.4.** Log2 кратности изменения для девяти метаболитов, p<0,05 (с поправкой на множественное тестирование).

Метаболит	13- HDoHE	4- HDoHE	8- HDoHE	PGE <sub>2</sub>	PGA <sub>2</sub> + PGJ <sub>2</sub>	PGD <sub>2</sub>	PGF <sub>2α</sub>	11- НЕТЕ	6-keto- PGF <sub>1α</sub>
log2 кратности изменений	-1,58	1,25	1,56	-2,87	-1,88	-2,02	-2,56	-1,55	-1,84

Чтобы проверить, можно ли различать токсичные и нетоксичные фракции на основе концентрации оксипинов, провели частичный дискриминантный анализ по методу наименьших квадратов (PLS-DA). Проекция, соответствующая первым двум компонентам представлены на Рис. 3.45В. Исследуемые группы были разделены с незначительным перекрытием. Для каждого метаболита был оценен параметр VIP. Этот параметр отражает объясненную вариацию между классами в каждой из проекций. Три метаболита (13-HDoHE, 4-HDoHE и 17-HDoHE) со значениями VIP >1.5, представлены в Таблице 3.5. Таким образом, с помощью PLS-DA были выявлены три оксипина (являющиеся производными ДНА) в качестве потенциальных субстанций обеспечивающих нейропротекторный сигнал от липидных фракций астроцитов для нейронов.

**Таблица 3.5.** Оценки важности переменных в прогнозе (VIP) для трех метаболитов

Соединение	13-HDoHE*	4-HDoHE*	17-HDoHE
VIP-баллы	1,623524	1,542072	1,588623

\* p<0,05 (с поправкой на множественное тестирование).

Межклеточная сигнализация в ответ на провоспалительные стимулы активно изучается. Взаимодействие глии и нейронов является ключевым для понимания различных дисфункций ЦНС, включая нейродегенеративные заболевания, поскольку воспаление является важным фактором в развитии этих патологий. Как правило, активация астроцитов способствует выживанию нейронов ЦНС [320]. Однако провоспалительные, активированные астроциты вызывают апоптоз нейронов через высвобождение токсического сигнала [138]. Наше

исследование указывает на участие оксипинонов в этом процессе. Было обнаружено, что (1) липидные фракции, полученные из внеклеточной среды LPS-стимулированных первичных культур обогащенных астроцитов, обладают нейротоксическими свойствами; (2) их действие можно ослабить путем обработки астроцитов ингибитором 12-LOX (ML355), но не ингибитором 5-LOX (зилеутон); и ML355, и зилеутон вызывают снижение LPS-стимулированного высвобождения IL-6, но не IL-10, в культурах, обогащенных астроцитами, что указывает на активность этих веществ при воздействии на астроциты; и (5) сравнение профилей оксипинонов из нейротоксичных и нетоксичных липидных фракций выявляет группу производных ДНА, которые могут отражать нетоксичные свойства липидных фракций.

Полученные данные о том, что липидные фракции, полученные из внеклеточной среды LPS-стимулированных астроцитов, обладают нейротоксической активностью, согласуются с ранее опубликованными данными, в которых был показан токсический растворимый сигнал от так называемых “A1 поляризованных” астроцитов [138]. Авторы предполагают, что соединения, влияющие на этот сигнальный путь, могут стать основой для создания новых лекарственных препаратов с большим потенциалом в лечении различных хронических неврологических заболеваний [138]. Было предположено, что токсические эффекты, по крайней мере частично, могут быть связаны с липидной фракцией, высвобождаемой стимулированными астроцитами. Полученные экспериментальные данные согласуются с этим предположением.

Для оценки возможности уменьшения уровня нейротоксичности с помощью регулирования оксипинонов, производимых активированными астроцитами, были протестированы ингибиторы LOX-пути биосинтеза оксипинонов. Ранее нейропротекторные свойства ингибиторов LOX изучались в экспериментах, в ходе которых ингибиторы добавляли непосредственно к нейронам [315,316]. Нами были протестированы два ингибитора: ML355 (блокирует 12-LOX) и зилеутон (блокирует 5-LOX) [321,322]. ML355 - селективный ингибитор с благоприятными свойствами абсорбции, распределения, метаболизма и выведения (ADME) [323]. Данных о влиянии ML355 на астроциты не представлено. Ранее данное вещество было предложено для использования в антитромботической терапии и лечении диабета [321,323]. Полученные данные позволяют предположить, что данное вещество также может потенциально

использоваться для уменьшения уровня нейротоксичности, вызванной астроцитами при воспалительных процессах. На данный момент сложно сказать, является ли этот эффект уникальным свойством ML355 или другие ингибиторы фермента 12-LOX также могут проявлять подобное действие. Другой протестированный препарат, зилеутон, представляет собой селективный ингибитор 5-липоксигеназы, ключевого фермента биосинтеза лейкотриенов, для которого показано терапевтическое действие при патологиях ЦНС, таких как болезнь Альцгеймера и инсульт [318,319]. Полученные данные о модуляции цитокинов зилеутоном соответствовали ранее опубликованной работе [324], где в экспериментах с астроцитами человека было показано, что 5-LOX-ингибитор зилеутон и 5-, 12- и 15-LOX-ингибитор 2-TEDC значительно снижают экспрессию многочисленных провоспалительных цитокинов. Таким образом, оба протестированных ингибитора активны в LPS-стимулированной культуре астроцитов, но их воздействие на высвобождаемые оксипирины отличается с учетом нейропротекторных особенностей профилей оксипиринов.

В настоящее время механизмы действия ингибиторов не очевидны. Например, 14-НDoHE, метаболит DHA, может быть произведен ферментом 15-LOX в нейтрофилах [12] или 12-LOX в тромбоцитах [13]. Если приписать НDoHE активности ферментов семейства LOX в астроцитах, то остается вопрос, почему добавление ингибиторов LOX индуцирует высвобождение LOX-опосредованных метаболитов. Наблюдаемые различия могут отражать косвенное действие ML355 и зилеутона, поскольку было использовано длительное время обработки клеток; следовательно, могли проявиться различные механизмы обратной связи. Механизмы модуляции синтеза оксипиринов ML355 и зилеутоном на клеточном уровне представляются более сложными [322,325]. Полученные данные не позволяют дискриминировать молекулярные механизмы действия ингибиторов LOX в астроцитах, но открывают возможность манипулировать нейротоксическими эффектами LPS-обработанных астроцитов.

Остается вопрос, каков желаемый профиль оксипиринов с точки зрения снижения нейротоксичности и нейровоспаления? В настоящее время мало известно о сложной природе метаболизма оксипиринов на клеточном уровне. Действительно, провоспалительные сигналы вызывают активацию различных фосфолипаз A2, а высвободившиеся ПНЖК распределяются между различными ветвями метаболизма (COX, LOX, P450) [3]. Кроме

того, существует неферментативный путь окисления ПНЖК, который зависит от окислительно-восстановительного статуса клеток [28]. Подход, который использовали для сравнения различных липидных фракций с точки зрения их нейротоксичности позволил установить, что 10 соединений отличаются между нетоксичной и токсичной фракциями - 13-HDoHE, 4-HDoHE, 8-HDoHE, PGE<sub>2</sub>, PGA<sub>2</sub> + PGJ<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 11-НЕТЕ, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> и 17-HDoHE. Среди них была снижена концентрация группы веществ, которые обычно относят к COX-ветви метаболизма оксипинов (13-HDoHE, PGE<sub>2</sub>, PGA<sub>2</sub>+PGJ<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 11-НЕТЕ и 6-keto-PGF<sub>1α</sub>).

Если попытаться прогнозировать воздействие смеси оксипинов на основе имеющихся данных о единичных соединениях, то проблемой будет недостаток литературных данных. Даже для такого широко известного соединения, как PGE<sub>2</sub>, данные противоречивы. Отмечается бифункциональный эффект PGE<sub>2</sub> на воспалительные процессы, например, высокие концентрации PGE<sub>2</sub> (5-25 мкМ) вызывают апоптоз в культивируемых клетках гиппокампа крысы [326], в то время как низкие концентрации PGE<sub>2</sub> (от 0,01 до 10 нМ) защищают дофаминергические нейроны от LPS-индуцированной нейротоксичности в первичных нейроглиальных культурах крысы [327]. Было показано, что микроглия в смешанной культуре обуславливала этот эффект [327], что указывает на не прямое действие PGE<sub>2</sub>. Полученные данные показывают, что оксипины, добавленные в культуры нейронов в "нативных" концентрациях, выделенных непосредственно из среды обработанных культур, обогащенных астроцитами, способны оказывать эффекты в клеточных культурах. Можно отметить, что, по-видимому, PGE<sub>2</sub> и PGD<sub>2</sub> обладают нейротоксическим действием, поскольку их концентрации снижены в смесях с нейропротекторными свойствами.

Во фракции были обнаружены производные АА и ДНА, обладающие нейропротекторными свойствами. Концентрации веществ 17-HDoHE, 4-HDoHE и 8-HDoHE были повышены. Все они являются производными ДНА и могут быть отнесены к соединениям, обуславливающим эффекты нейропротекторной фракции оксипинов. Это логичное предположение по нескольким причинам. В мозге крыс было выявлено пять основных оксипинов, метаболитов, производных ДНА: 17-HDoHE, 14-HDoHE, 11-HDoHE, 7-HDoHE и 4-HdoHE [328]. Известно, что вещества 4-HDoHE, 14-HDoHE и 17-HDoHE принадлежат к группе специализированных, решающих медиаторов (СПМ), они также являются предшественниками

других СПМ [123,329]. Кроме того, они ранее были предложены в качестве маркеров активации путей биосинтеза СПМ [330]: например, 17-HDoHE для образования RvD, а протектин D1 и 14-HDoHE для биосинтеза маресина 1 [329]. Маресин, RvD и протектин D1 способствуют снятию воспаления, нейропротекции и функциональному неврологическому восстановлению после травмы мозга [329,331]. Таким образом, защитные свойства липидных фракций, обогащенных производными DHA, не кажутся необычными.

В целом, полученные данные подтверждают результаты предыдущих исследований, согласно которым астроциты, активированные провоспалительными стимулами, высвобождают медиаторы, которые оказывают нейротоксическое действие. Впервые было показано, что эти нейротоксические эффекты опосредуются, по крайней мере частично, через смеси оксипинов. Каждый оксипин синтезируется отдельно в небольших количествах, но их эффекты могут быть аддитивными. Регулирование состава смеси оксипинов приводит к изменениям в клеточных ответах. Была продемонстрирована возможность такой модуляции с помощью ингибитора синтеза оксипинов ML355. Использование селективных ингибиторов синтеза оксипинов позволяет модулировать смесь оксипинов и тем самым уменьшать нейровоспаление.

### **3.2.5 Антивоспалительные свойства лигандов ядерных рецепторов PPAR**

Лиганды пероксисомных пролифератор-активируемых рецепторов (PPAR) занимают особое место среди веществ, которые могут регулировать баланс между различными оксипинами и, таким образом, сдвигать воспалительные процессы в сторону разрешения (см. Литобзор 1.5.7). Применение синтетических лигандов PPAR для регуляции воспалительных процессов предполагает наличие знаний о механизмах взаимодействия между эндогенными и синтетическими лигандами, которых пока недостаточно.

В данной работе были отобраны наиболее часто используемые лиганды для каждого подтипа PPAR, которые имеют наиболее перспективный терапевтический потенциал [199,228,233,235–239]. Эти специфические лиганды включают в себя пары агонист/антагонист: PPAR $\alpha$  (фенофибрат/GW6471); PPAR $\beta$  (GW501516/GSK0660); PPAR $\gamma$

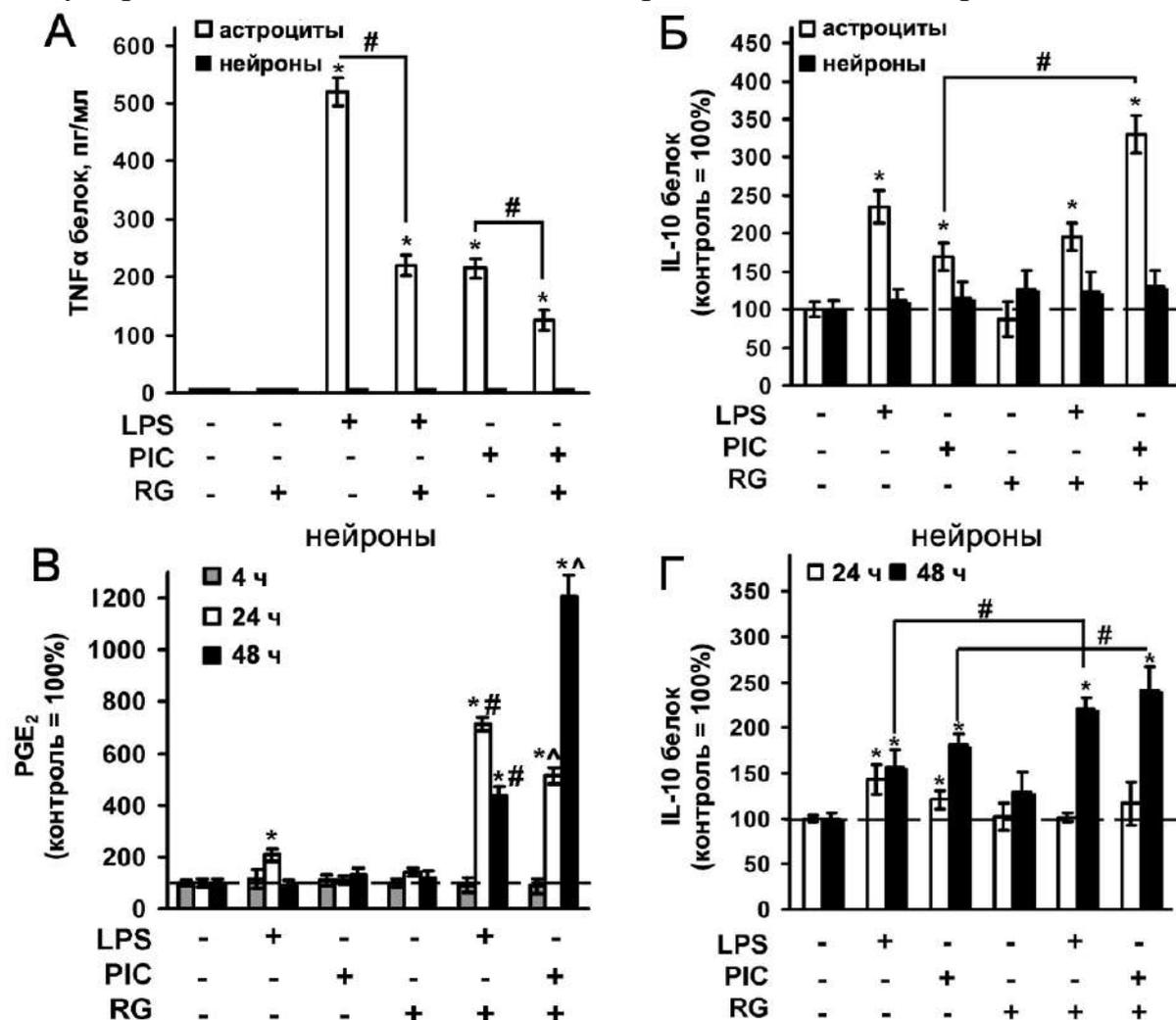
(росиглитазон/GW9662). Основанием для такого выбора послужило большое количество свидетельств о наличии независимых эффектов антагонистов на уровне клеток [199,228,235]. Предполагаемые эффекты могут быть обусловлены особенностями взаимодействия эндогенных лигандов (ПНЖК, оксипирины) и экзогенных лигандов PPAR, участвующих в формировании клеточного ответа на внешний стимул. Сравнение лигандов проводилось по их способности модулировать LPS-стимулированный клеточный ответ астроцитов на уровне: (1) синтеза оксипиринов; (2) высвобождение цитокинов (TNF $\alpha$  и IL-10) и (3) фосфорилирования белков p38, JNK, ERK MAPK. При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [252, 332].

### **3.2.5.1 Агонист PPAR $\gamma$ розиглитазон как модулятор сигнальных путей TLR4 и TLR3 в первичных нейронах и астроцитах крыс**

TLR4 и TLR3 опосредованное высвобождение TNF $\alpha$  астроцитами уже было четко показано [116,333,334]. Некоторые литературные данные, полученные на уровне ткани, указывают на то, что нейроны также могут экспрессировать TNF $\alpha$  (как на уровне мРНК, так и на уровне белка) [335,336], однако данные об экспрессии TNF $\alpha$  на клеточном уровне все еще отсутствуют. Поэтому концентрацию TNF $\alpha$  в клеточных супернатантах измерили через 4 часа после стимуляции культур нейронов и астроцитов с помощью агонистов TLR3 и TLR4 (Рис. 3.46А). И PIC, и LPS вызывали высвобождение TNF $\alpha$  в астроцитах, но не в нейронах. Показано, что TNF $\alpha$  достигает максимальной концентрации через 2-4 часа после воспалительного стимула и затем удаляется из внеклеточного пространства через определенное время в зависимости от типа клеток [337]. Поскольку в культурах нейронов TNF $\alpha$  не обнаружили в исследуемые временные промежутки, то маловероятно, что нейроны вырабатывают TNF $\alpha$  в течение более длительного времени после стимуляции TLR. В связи с этим, анализ высвобождения TNF $\alpha$  при более длительных периоды после активации TLR не проводился.

Обработка клеток RG снижала TLR-индуцированное высвобождение TNF $\alpha$  в астроцитах, стимулированных агонистами TLR4 и TLR3 (Рис. 3.46А). Высвобождения TNF $\alpha$  в нативных клетках не обнаружено, в то

время как добавление LPS или PIC к астроцитам увеличивало уровень TNF $\alpha$  до 500 и 220 пг/мл, соответственно (Рис. 3.46А). RG значительно снижал синтез TNF $\alpha$ , сдвигая уровни до 212 и 120 пг/мл, соответственно (Рис. 3.46А). В целом, эти данные показывают, что лечение LPS и PIC индуцировало высвобождение TNF $\alpha$  астроцитами, но не нейронами.



**Рис. 3.46.** Влияние росиглитазона (RG) на LPS- и PIC-стимулированное высвобождение TNF $\alpha$ , IL-10 и PGE<sub>2</sub> в культурах нейронов и астроцитов. (А,Б) Астроциты (белые столбы) и нейроны (черные столбы) предварительно обрабатывали в течение 30 минут розиглитазоном (RG, 10 мкМ) и затем стимулировали в течение 4 ч с липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) или поли:IC (PIC, 10 мкг/мл). Концентрацию TNF $\alpha$ , IL-10 и PGE<sub>2</sub> измеряли методом ИФА в образцах супернатантов. (В, Г) Нейроны предварительно обрабатывали в течение 0,5 ч розиглитазоном (RG, 10 мкМ) и затем выдерживали в течение 4ч, 24 ч или 48 ч с липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) или поли:IC (PIC, 10 мкг/мл). Значения представляют собой среднее  $\pm$  СО из трех независимых экспериментов, проведенных в трех экземплярах. \*  $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, #  $p < 0,05$  по сравнению с указанными столбами.

Было показано, что экспрессия IL-10 в астроцитах, вызванная воздействием LPS, способствует выживанию нейронов после повреждения

спинного мозга [338]. Данные о стимулировании астроцитов при помощи PIC и влиянии обоих агонистов TLR на нейроны отсутствуют. В связи с этим была измерена концентрация IL-10 в супернатанте после 4 часов воздействия на клетки агонистами TLR3 и TLR4 и проведено сравнение культур нейронов и астроцитов (Рис. 3.46Б). И PIC, и LPS вызвали высвобождение IL-10 в астроцитах (до двух раз), но не в нейронах. Важно отметить, что RG существенно усилил вызываемое стимуляцией PIC высвобождение IL-10 (Рис. 3.46Б). Высвобождение IL-10 после стимуляции TLR имело продолжительный характер, поэтому были измерены уровни IL-10 через 24 и 48 часов после стимуляции нейронов LPS и PIC (Рис. 3.46Г). Действительно, оба агониста TLR стимулировали высвобождение IL-10 через 48 часов, а RG усиливал действие PIC и LPS в 2.5 раза. Можно предположить, что одним из механизмов защитного действия росиглитазона в активированных клетках мозга является повышение уровня IL-10 – важного цитокина, участвующего в разрешении воспаления.

Известно, что RG влияет на высвобождение PGE<sub>2</sub> в астроцитах [116,231], однако его роль в регуляции выработки PGE<sub>2</sub> нейронами ранее не изучалась. Было исследовано влияние RG на высвобождение PGE<sub>2</sub> через 4, 24 и 48 часов после воздействия LPS и PIC (Рис. 3.46В). Значительные концентрации PGE<sub>2</sub> в клеточном супернатанте были обнаружены через 4 и 24 часа после воздействия LPS, но не PIC. Добавление только PIC не приводило к увеличению синтеза PGE<sub>2</sub> в исследуемых промежутках времени (Рис. 3.46В). Добавление RG за 0,5 часа до стимуляции TLR снижало LPS-индуцированное высвобождение PGE<sub>2</sub> в момент времени 4 часа, но значительно усиливало высвобождение PGE<sub>2</sub> в моменты времени 24 и 48 часов как при стимуляции LPS, так и при стимуляции PIC (Рис. 3.46В). Концентрация PGE<sub>2</sub> (пг/мл) составляла 204 ± 37 (RG + LPS) и 567 ± 39 (RG + LPS) через 48 ч.

Таким образом, нейроны не производят TNF $\alpha$  в ответ на внешние стимулы (TLR3 агонист PIC; TLR4 агонист LPS), но высвобождают IL-10 после продолжительной (более 24 часов) инкубации с этими TLR агонистами.

IL-10 - ключевой противовоспалительный цитокин, подавляющий индукцию провоспалительных цитокинов, таких как TNF $\alpha$  и IL-6 [312]. Он считается одним из наиболее важных цитокинов в фазе разрешения воспаления [122,339]. Тот факт, что обнаружено присутствие IL-10 в культуральной среде нейронов через 24-48 часов после стимуляции (эти

временные промежутки относят к фазе разрешения воспаления), соответствует идее о важной роли IL-10 в этом процессе.

Большинство исследований эффектов росиглитазона в ЦНС направлены на изучение его нейропротекторного действия в различных моделях. Курсы терапии с RG показывают нейропротекторные эффекты в мозге и сетчатке [340]. Также, другая исследовательская группа [341] с использованием модели глобальной церебральной ишемии у крыс с быстрой локальной инъекцией RG в повреждённые участки обнаружила, что RG снижает уровень воспаления и препятствует гибели нейронов. Однако, молекулярные механизмы действия росиглитазона на нейроны до сих пор остаются неизвестными. Наше исследование показывает, что воздействие RG влияет на опосредованное TLR высвобождение PGE<sub>2</sub> и IL-10 в нейронах. Экспрессия TNF $\alpha$  как на уровне мРНК, так и на уровне белка была ранее показана в коре головного мозга крыс, и ее увеличение способствует проникновению воспалительных клеток в места повреждения, что способствует повреждению тканей при ишемии головного мозга [336].

Полученные результаты показывают, что выработку TNF $\alpha$  могут осуществлять не нейроны, а другие клетки ЦНС. Была обнаружена значительная экспрессия TNF $\alpha$  в культурах астроглии, обработанных агонистами TLR3 и TLR4. Эти данные согласуются с результатами других исследований [116,333,334]. Согласно полученным результатам, предварительное инкубирование с росиглитазоном приводит к снижению секреции TNF $\alpha$  во внеклеточную среду в LPS- или PIC-активированных культурах астроцитов. Этот эффект может быть интерпретирован как противовоспалительный и нейропротекторный.

Полученные данные указывают на значительное повышение выработки PGE<sub>2</sub> в нейронах, подвергшихся воздействию LPS и PIC, предварительно обработанных RG. Индукция ферментативной активности COX-2 обычно рассматривается как один из неблагоприятных факторов в ходе нейровоспаления. Этот вывод основан на экспериментах, показывающих, что фармакологическая блокировка активности COX-2 снижает уровень PGE<sub>2</sub>, обеспечивая нейропротекцию [342,343]. Однако, некоторые исследования противоречат этому заключению. Например, было обнаружено, что PGE<sub>2</sub> оказывает нейропротекторный эффект [344]. В другом исследовании было показано, что PGE<sub>2</sub> защищает нейроны от апоптоза, вызванного LPS, через регуляцию образования активных форм кислорода [345]. Интересно, что концентрации PGE<sub>2</sub>, наблюдаемые в

данном исследовании, значительно превышали данные, полученные в исследуемой модели (при совместном воздействии RG и LPS или PIC уровень PGE<sub>2</sub> достигал 567 пг/мл). Повышение уровня PGE<sub>2</sub> при воздействии росиглитазона в астроцитах, стимулированных LPS, ранее объяснялось потенциальной ролью росиглитазона как противовоспалительного агента [231]. Таким образом, повышение уровня PGE<sub>2</sub> под воздействием RG может быть связано как с нейропротекторными, так и с нейротоксическими процессами, что требует дальнейшего изучения.

### **3.2.5.2 Сравнение лигандов PPAR $\alpha$ : агонист фенофибрат (Fen), антагонист GW6471 (GW6)**

Лиганды PPAR добавляли за 30 мин до стимуляции LPS (100 нг/мл, 4 часа) и измеряли профили оксилипинов в культуральной среде с помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа. В ходе исследования было протестировано действие различных агонистов, используя пары соединений, агонисты и антагонисты подтипов PPAR. Также проанализировали изменения клеточного ответа при их совместном использовании.

На первом этапе исследования была изучена активация PPAR $\alpha$  и выделено 28 соединений, классифицированных по их метаболическим путям: циклооксигеназный (COX), цитохром P450 монооксигеназный (CYP), липоксигеназный (LOX) пути, а также детектировали ПНЖК - AA, DHA, EPA. Результаты представлены в виде тепловой карты, на которой по вертикальной оси расположены стимулы, на горизонтальной - относительные количества каждого соединения (количественные данные представлены в работе [332] на Рис. S1 приложения).

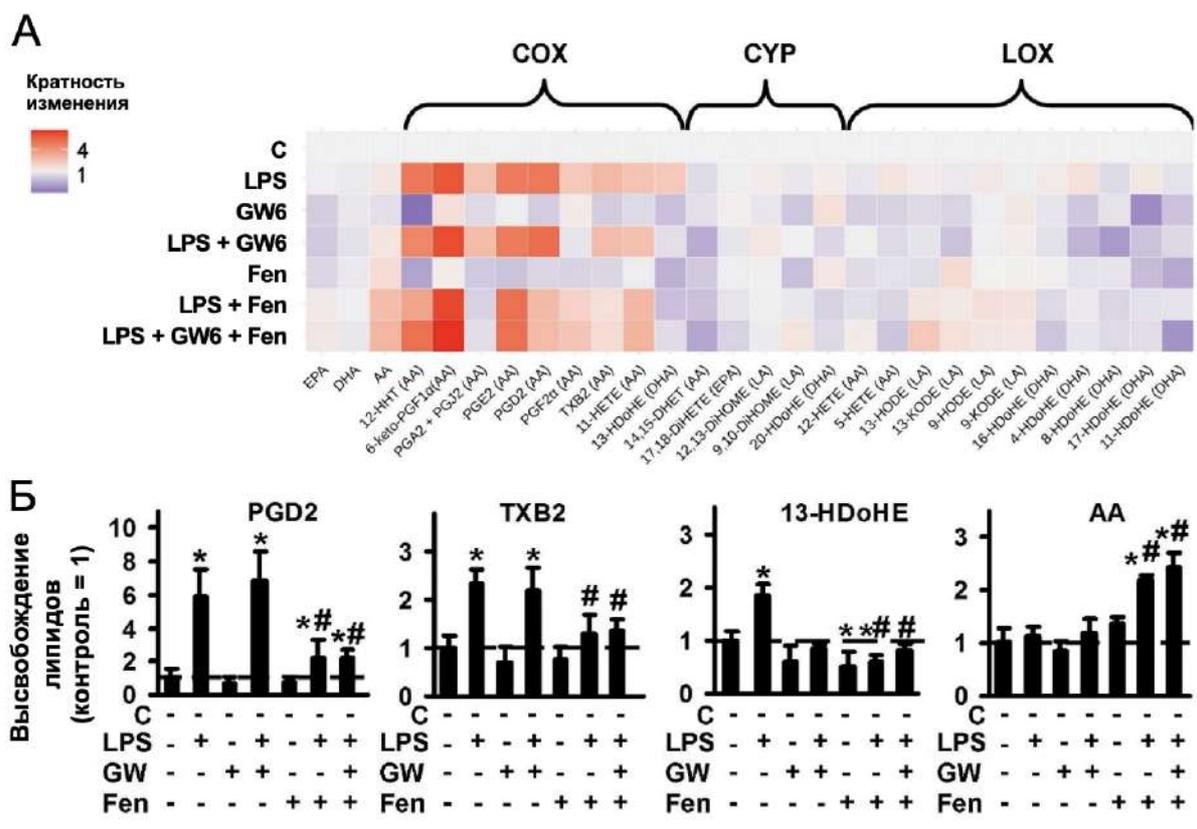


Рис. 3.47. Влияние агониста PPAR $\alpha$  фенофибрата и антагониста GW6471 на высвобождение оксипинов в LPS-стимулированных астроцитах. Первичные крысиные астроциты предварительно обрабатывали в течение 30 мин GW6471 (GW6, 5 мкМ) или фенофибрата (Fen, 50 мкМ) или в комбинации, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч. (А) Тепловая карта показывает относительное количество каждого липидного медиатора по сравнению с контролем. По вертикальной оси указаны стимулы, а по горизонтальной оси - относительное количество ( $\log_2$ ) каждого липидного медиатора. (Б) Относительное количество липидных медиаторов. Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$ , по сравнению с нативными клетками, #  $p < 0,05$ , по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

Агонист PPAR $\alpha$  фенофибрат снижает стимулированный LPS синтез веществ образующихся по COX-пути биосинтеза оксипинов: 12-NHT, PGD<sub>2</sub>, PGA<sub>2</sub> + PGJ<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, 13-HDoHE. Фенофибрат также увеличивает высвобождение внеклеточной AA. Антагонист PPAR $\alpha$  GW6471 обладает собственной активностью через ингибирование CYP-метаболизируемых веществ, 14,15-DHET, 20-HDoHE. GW6471 не модулирует производные, образующиеся через COX-путь биосинтеза или высвобождение AA. Репрезентативные данные для обработок представлены на Рис. 3.47Б.

Агонист PPAR $\alpha$  фенофибрат подавляет LPS-стимулированное высвобождение оксипинов, образующихся через COX-путь биосинтеза

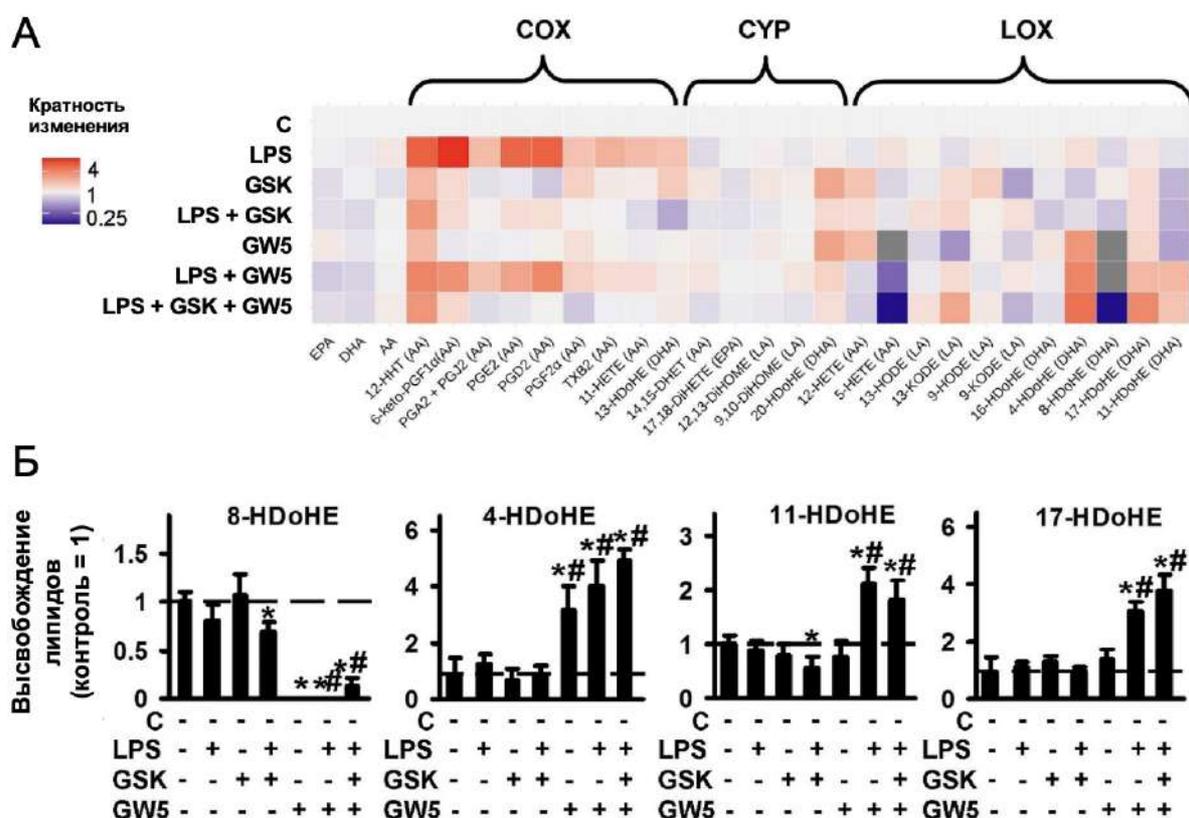
(12-ННТ, PGD<sub>2</sub>, PGA<sub>2</sub> + PGJ<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, 13-НДоНЕ). Фенофибрат увеличивает высвобождение внеклеточной АА. Антагонист PPAR $\alpha$  GW6471 проявляет собственную активность через ингибирование метаболизируемых СYP оксипиринов (14,15-DHET, 20-НДоНЕ), но не влияет на высвобождение АА или синтез производных, образованных через COX путь биосинтеза оксипиринов (Рис. 3.47В). Примечательно, что при обработках, где оба лиганда PPAR $\alpha$  были добавлены одновременно, отсутствует действие классических пар агонист-антагонист (Рис. 3.47Б, количественные данные приведены на Рис. S1 приложения [332]). Хотя можно предположить, что фенофибрат является противовоспалительным модулятором благодаря своей активности, как ингибитора LPS-опосредованного синтеза простагландинов, эффект, похоже, не был реализован через PPAR $\alpha$ , так как антагонист GW6471 не отменял его.

### **3.2.5.3 Сравнение лигандов PPAR $\beta$ : агонист GW501516 (GW5), антагонист GSK0660 (GSK)**

В ходе исследования вовлеченности PPAR $\beta$  в синтез оксипиринов при активации астроцитов LPS использовались агонист GW501516 и соединение GSK0660, обычно рассматриваемое как антагонист PPAR $\beta$ , но также считающееся обратным агонистом PPAR $\beta$  [346]. Результаты представлены на тепловой карте (Рис. 3.48А). (количественные данные представлены в работе [332] на Рис. S2 приложения).

Оба лиганда PPAR $\beta$  ингибируют LPS-стимулированный синтез оксипиринов через COX-путь, причем GSK0660 является более сильным ингибитором, чем GW501516, в зависимости от используемых концентраций (Рис. 3.48А). Ингибируются: 12-ННТ; 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , PGA<sub>2</sub> + PGJ<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , TXB<sub>2</sub>, 11-НЕТЕ, 13-НДоНЕ. Примечательно, что добавление GSK0660 приводит к увеличению синтеза 13-НДоНЕ, 12-ННТ и PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , что может указывать на возможность синтеза этих веществ через другие метаболические пути [3,347,348]. Такие результаты позволяют рассматривать лиганд PPAR $\beta$ , GSK0660, как обратный агонист, а не антагонист, в данной клеточной модели. Помимо воздействия на COX-путь, GW501516, снижает уровень оксипиринов, связанных с LOX-путем биосинтеза: 5-НЕТЕ, 8-НДоНЕ, и значительно увеличивает синтез производных ДНА: 4-НДоНЕ, 11-НДоНЕ, 17-НДоНЕ (Рис. 3.38Б). Последние три вещества считаются важными медиаторами разрешения воспаления [14,15], в то время как 5-НЕТЕ и 8-НДоНЕ обладают

провоспалительными свойствами [16,17]. Примечательно, что соединения 4-HDoHE, 8-HDoHE, 11-HDoHE, 13-HDoHE и 17-HDoHE являются производными DHA, в то время как оба протестированных лиганда PPAR $\beta$  не влияют на концентрацию внеклеточных ПНЖК, в том числе DHA (количественные данные приведены в работе [332] на Рис. S2 приложения). В целом, полученные результаты показывают, что лиганды PPAR $\beta$  могут снижать синтез простагландинов, вызванный стимуляцией LPS, причем агонист GW501516 помимо этого проявляет себя как сильный индуктор веществ, способствующих разрешению воспаления.



**Рис. 3.48.** Влияние агониста PPAR $\beta$  GW501516 и антагониста GSK0660 на высвобождение оксилипинов в LPS-стимулированных астроцитах. Первичные крысиные астроциты предварительно обрабатывали в течение 30 мин GSK0660 (GSK, 5 мкМ) или GW501516 (GW5, 25 мкМ) или в комбинации, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч. (А) Тепловая карта показывает относительное количество каждого липидного медиатора по сравнению с контролем. По вертикальной оси указаны стимулы, а по горизонтальной оси - относительное количество ( $\log_2$ ) каждого липидного медиатора. (Б) Относительное количество отдельных оксилипинов. Значения представляют собой среднее  $\pm$  СО из трех независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$ , по сравнению с нативными клетками, #  $p < 0,05$ , по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

### 3.2.5.4 Сравнение лигандов PPAR $\gamma$ : агонист розиглитазон (RG) и антагонист GW9662 (GW9)

Для исследования участия PPAR $\gamma$  в синтезе оксипинов в астроцитах был использован агонист розиглитазон и его классический антагонист GW9662 [349]. Данные представлены в виде тепловой карты (Рис. 3.49А). Количественные данные приведены в работе [332] на Рис. S3 приложения. Оба лиганда PPAR $\gamma$  демонстрируют влияние на синтез оксипинов в нативных астроцитах. Розиглитазон увеличивает LPS-стимулированный синтез оксипинов из АА через COX-путь. Этот эффект снижался при добавлении GW9662 (Рис. 3.49Б). Розиглитазон также увеличивает концентрацию внеклеточных ПНЖК, АА и ЕРА, но не DHA, как в нативных, так и в LPS-стимулированных клетках (Рис. 3.49Б). Этот эффект не отменяется GW9662 (Рис. 3.49Б). Одновременное добавление обоих лигандов PPAR $\gamma$  увеличивает опосредованный LPS синтез 5-НЕТЕ и 4-НДОHE (количественные данные приведены в работе [332] на Рис. S3 приложения).

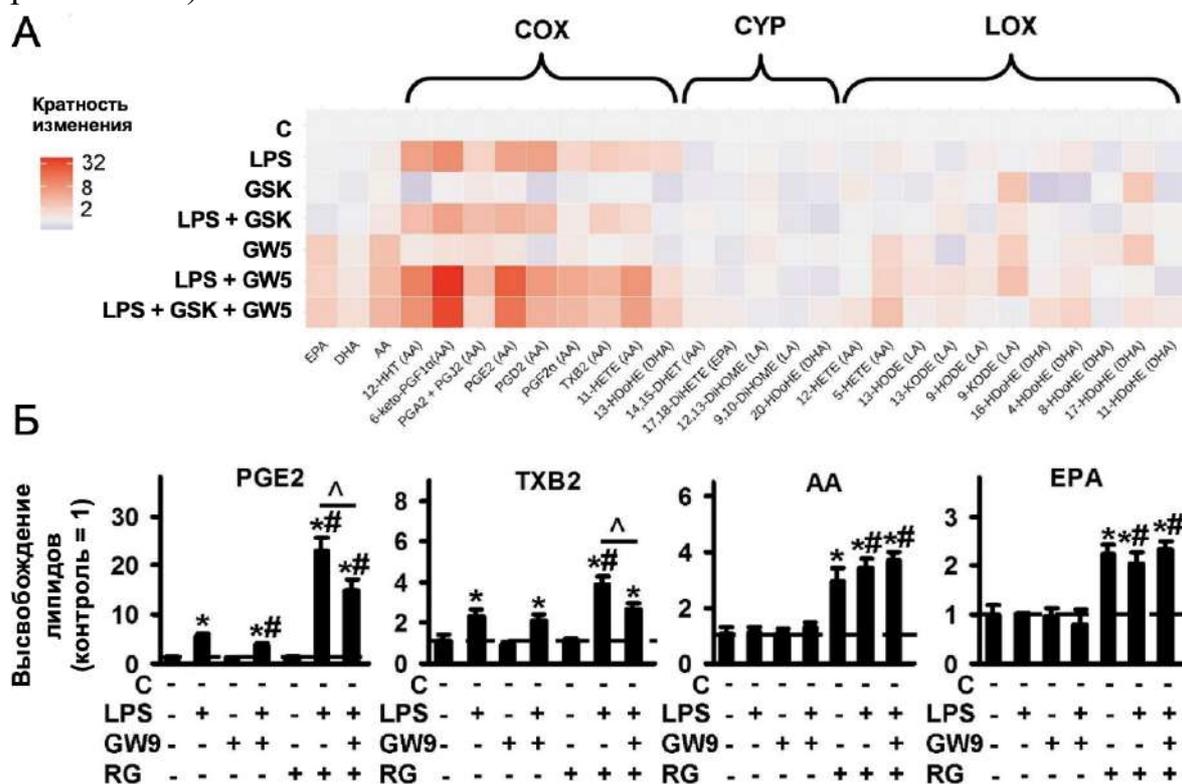
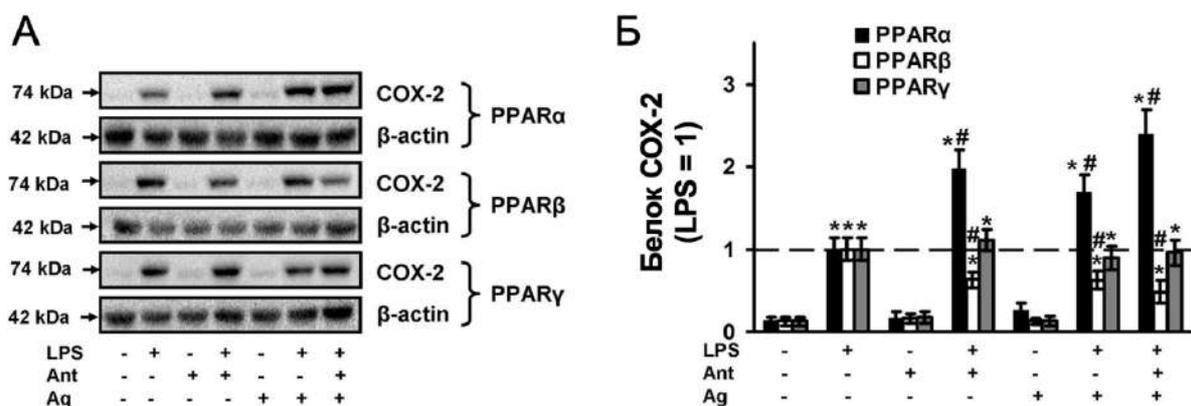


Рис. 3.49. Влияние агониста PPAR $\gamma$  розиглитазона и антагониста GW9662 на высвобождение оксипинов в LPS-стимулированных астроцитах. Первичные крысиние астроциты предварительно обрабатывали в течение 30 мин GW9662 (GW9, 5 мкМ) или розиглитазоном (RG, 20 мкМ) или в комбинации, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч. (А) Тепловая карта показывает относительное количество каждого липидного медиатора по сравнению с контролем. По вертикальной оси указаны стимулы, а по горизонтальной оси - относительное количество ( $\log_2$ ) каждого липидного медиатора. Метаболиты были разделены на: Липоксигеназный (LOX), циклооксигеназный (COX) и цитохромный (CYP) пути, участвующие в их синтезе. (Б) Относительное количество липидных медиаторов. Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, # $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками, ^ $p < 0,05$  по сравнению с указанным лечением.

### 3.2.5.5 Лиганды PPAR как модуляторы экспрессии COX-2

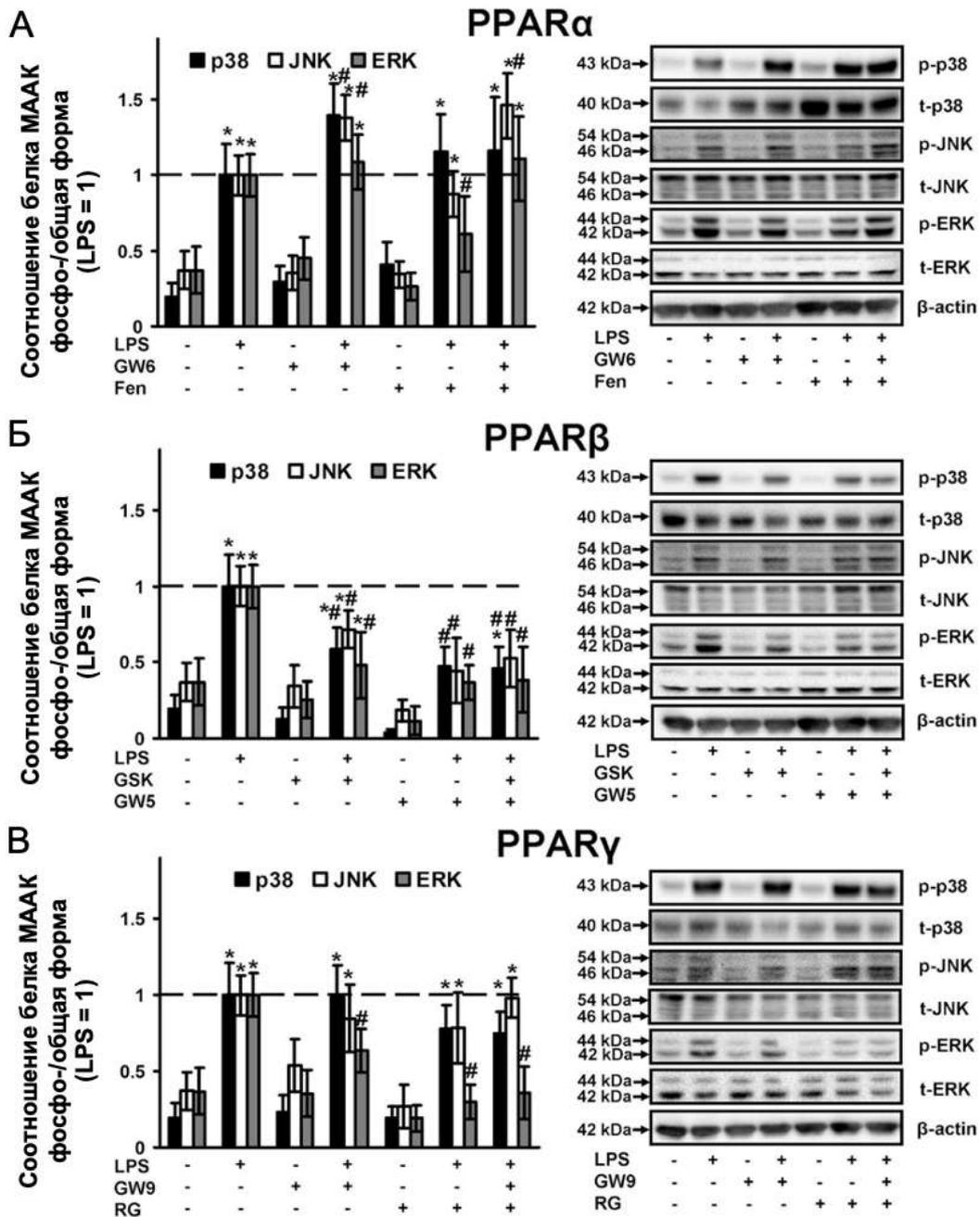
Профили оксипиринов указывают на то, что все испытанные лиганды рецепторов PPAR регулируют синтез COX-производных ПНЖК в LPS-стимулированных астроцитах. Ранее было продемонстрировано, что фермент COX-2 играет главную роль в LPS-опосредованном синтезе оксипиринов в астроцитах (Рис. 3.8–3.9) [350]. По этой причине было проанализировано влияние протестированных лигандов PPAR на экспрессию COX-2 на уровне белка (Рис. 3.50). Обнаружено, что эти вещества не воздействуют на уровень белка COX-2 в нативных клетках, однако лиганды PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  регулируют LPS-стимулированную экспрессию COX-2 (Рис. 3.50). И агонист, и антагонист PPAR $\alpha$  (фенофибрат и GW6471 соответственно) увеличивают уровень белка вдвое. В то же время лиганды PPAR $\beta$  (агонист GW501516 и антагонист GSK0660), напротив, подавляют LPS-стимулированную экспрессию COX (Рис. 3.50), что может объяснять их ингибирующее действие на синтез простагландинов.



**Рис. 3.50.** Влияние лигандов PPAR на экспрессию COX-2 при стимуляции LPS. Астроциты предварительно обрабатывали агонистом PPAR $\alpha$  фенофибратом (50 мкМ), антагонистом PPAR $\alpha$  GW 6471 (5 мкМ), агонистом PPAR $\beta$  GW501516 (25 мкМ), антагонистом PPAR $\beta$ : GSK0660 (5 мкМ), агонист PPAR $\gamma$  росиглитазон (20 мкМ), антагонист PPAR $\gamma$  GW9662 (5 мкМ) в течение 30 мин, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч. Уровни белка COX-2 оценивали методом вестерн-блоттинга и нормировали на контроль нагрузки  $\beta$ -актин. (А) Репрезентативные вестерн-блоты, демонстрирующие уровни белка COX-2. (Б) Результаты представлены как кратность изменения по сравнению с астроцитами, обработанными LPS. Пример является репрезентативным для трех независимых экспериментов. Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. \* $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, # $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

### 3.2.5.6 Лиганды PPAR как модуляторы p38, JNK, ERK1/2 митоген-активируемых протеин киназ (МАРК)

Три основных группы регулируемых каскадов МАРК, активация которых влияет на экспрессию генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровне, хорошо изучены: p38, JNK, ERK1/2 МАРК [351]. Эти киназы являются составляющей частью TLR-опосредованной сигнализации и их влияние на астроциты в настоящее время активно исследуется [116,117]. Ингибиторы МАРК рассматривают как возможные противовоспалительные препараты при патологиях ЦНС [351]. По этой причине сравнили действие лигандов PPAR на активность этих киназ в нативных и LPS-стимулированных астроцитах. Воздействие на клетки LPS активировало все 3 исследуемые МАРК (Рис. 3.51). Обработка нативных клеток агонистом PPAR $\alpha$ , фенофибратом, снижает активность ERK, в то же время слегка увеличивая активность p38 и ERK в LPS-стимулированных астроцитах (Рис. 3.51А). Антагонист рецепторов PPAR $\alpha$ , GW6471 никак не влияет на состояние нативных клеток, однако усиливает активность p38, JNK и ERK в присутствии LPS (Рис. 3.51А). Оба лиганда PPAR $\beta$  не влияют на активность киназ в нативных клетках, однако значительно снижают активность p38, JNK и в LPS-стимулированных клетках (Рис. 3.51Б). Оба лиганда PPAR $\gamma$  ингибируют только LPS-стимулированную активность ERK, не влияя при этом на p38 или JNK (Рис. 3.51В). В целом, эти данные показывают, что лиганды PPAR $\beta$  наиболее эффективны в подавлении воспалительных процессов по сравнению с лигандами других форм PPAR.

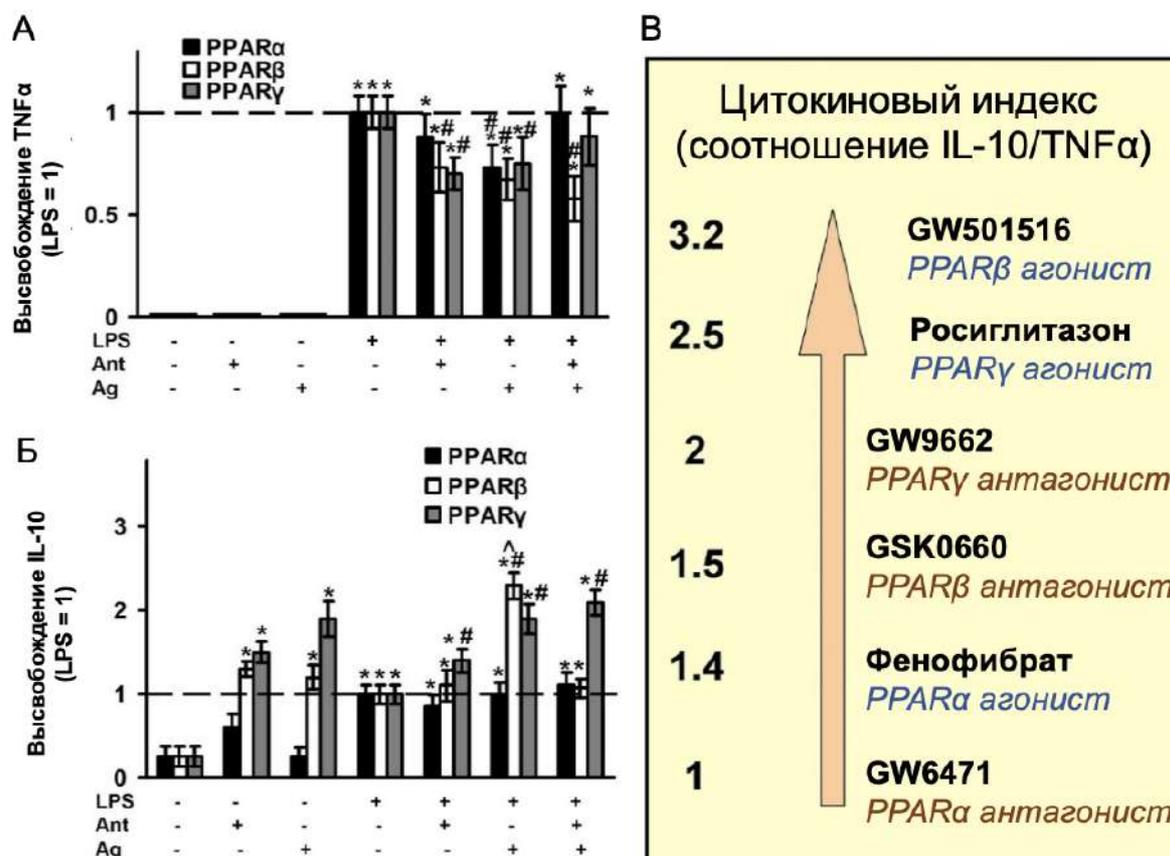


**Рис. 3.51.** Влияние лигандов PPAR на активность p38, JNK и ERK1/2 MAPK в LPS-стимулированных астроцитах. Астроциты предварительно обрабатывали агонистом PPAR $\alpha$  фенофибратом (50 мкМ), антагонистом PPAR $\alpha$  GW 6471 (5 мкМ), агонистом PPAR $\beta$  GW501516 (25 мкМ), антагонистом PPAR $\beta$ : GSK0660 (5 мкМ), агонист PPAR $\gamma$  росиглитазон (20 мкМ), антагонист PPAR $\gamma$  GW9662 (5 мкМ) в течение 30 мин, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч. Уровни белков p38, p-p38, pJNK, JNK, pERK1/2 и ERK1/2 оценивали методом вестерн-блоттинга. Репрезентативные результаты выражены как кратность изменения относительно LPS-стимулированных клеток. Вестерн-блоты для лигандов (А) PPAR $\alpha$ , (Б) PPAR $\beta$ , (В) PPAR $\gamma$ , демонстрирующие изменение активности MAPK. Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, #  $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

### 3.2.5.7. Влияние лигандов PPAR на цитокины-маркеры воспаления

Для оценки эффективности исследованных лигандов в отношении синтеза цитокинов в качестве маркера воспаления в астроцитах был выбран TNF $\alpha$ , а в качестве маркера противовоспалительных процессов – IL-10 [333,339]. Концентрации данных цитокинов, образующихся при воздействии LPS, определялись одновременно с оксипипинами в клеточном супернатанте. Без добавления LPS не обнаружено влияние протестированных веществ на синтез TNF $\alpha$  (Рис. 3.52А). LPS стимулирует высвобождение TNF $\alpha$  в концентрации около 400 пг/мл за 4 часа стимуляции (Рис. 3.52А). Агонисты всех трех типов рецепторов (PPAR $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ), а также антагонисты PPAR $\beta$  и PPAR $\gamma$  ингибировали LPS-стимулированное высвобождение TNF $\alpha$ . Совместное добавление тестируемых веществ в качестве пар агонистов и антагонистов, отменяло только эффект агониста PPAR $\alpha$ . IL-10 считается противовоспалительным цитокином и даже называется цитокином разрешения воспаления [339]. Уровень IL-10 в нативных астроцитах составляет около 25 пг/мл. LPS индуцировал синтез IL-10 в три раза (принято за 1 на Рис. 3.52Б). Испытываемые пары лигандов PPAR $\beta$  и PPAR $\gamma$  увеличивали высвобождение IL-10 в нативных клетках даже больше, чем LPS. Полученные данные позволяют предположить, что данные вещества могут быть отнесены к защитным, способным повышать уровень противовоспалительных цитокинов, что в свою очередь может защищать клетки от воздействия воспалительных агентов. Эффекты сохранялись при добавлении LPS (Рис. 3.52Б). Более того, стимуляция LPS даже индуцировала эффект агониста PPAR $\beta$  (Рис. 3.52Б). Уровень IL-10 после совместного воздействия стимула (LPS) и агониста PPAR $\beta$  снижался в присутствии антагониста PPAR $\beta$  (Рис. 3.52Б), что позволяет предположить участие PPAR $\beta$  в этом эффекте. Тестируемые вещества из пары PPAR $\alpha$  не влияли на уровень IL-10, как в нативных, так и в LPS-стимулированных клетках (Рис. 3.52Б). Вещество можно считать тем лучшим "разрешающим стимулом", чем больше оно подавляет стимулированное LPS высвобождение провоспалительного цитокина (TNF $\alpha$ ) и активирует высвобождение противовоспалительного цитокина (IL-10). Поэтому был рассчитан индекс цитокинов (IL-10/TNF $\alpha$ ) (Рис. 3.52Б). Лучшим веществом по этому критерию является GW501516, агонист PPAR $\beta$ . Тестируемые вещества расположились в следующем порядке (Рис. 3.52Б): GW501516 > росиглитазон > GW9662 > GSK0660 > фенофибрат > GW6471. Следует отметить, что хотя между парами подтипов

PPAR, агонист-антагонист нет строгой взаимосвязи, пары веществ лигандов PPAR $\alpha$  обладают более слабым противовоспалительным эффектом в отношении синтеза цитокинов в применяемой клеточной модели. В то же время, PPAR $\beta$  и PPAR $\gamma$  можно рассматривать как вещества, которые способствуют воспалительному процессу через противовоспалительные и разрешающие процессы.



**Рис. 3.52.** Влияние лигандов PPAR на воспалительный ответ. Первичные культуры астроцитов крыс предварительно обрабатывали агонистом PPAR $\alpha$  фенофибратом (50 мкМ), антагонистом PPAR $\alpha$  GW 6471 (5 мкМ), агонистом PPAR $\beta$  GW501516 (25 мкМ), антагонистом PPAR $\beta$ : GSK0660 (5 мкМ), агонист PPAR $\gamma$  росиглитазон (20 мкМ), антагонист PPAR $\gamma$  GW9662 (5 мкМ) в течение 30 мин, затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч. Высвобождение белков TNF $\alpha$  (А) и IL-10 (Б) измеряли методом ИФА в образцах супернатанта. Значения представляют собой среднее  $\pm$  CO из трех независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$  по сравнению с нативными клетками, #  $p < 0,05$  по сравнению с LPS-стимулированными клетками, ^  $p < 0,05$  по сравнению с клетками, обработанными агонистами. (В) Цитокиновый индекс как соотношение IL-10 и TNF $\alpha$  позволяет выстроить ряд для исследуемых веществ относительно их противовоспалительных и разрешающих свойств.

Все протестированные вещества, кроме росиглитазона, могут быть определены как противовоспалительные, поскольку они ингибируют LPS-

опосредованный синтез оксипинов через COX пути. В порядке убывания активности вещества можно расположить следующим образом: GSK0660 (антагонист PPAR $\beta$ ) > GW501516 (агонист PPAR $\beta$ ) > GW9662 (антагонист PPAR $\gamma$ ) >> фенофибрат (агонист PPAR $\alpha$ ) > GW6471 (антагонист PPAR $\alpha$ ). Более того, агонист PPAR $\beta$ , GW501516, увеличивал синтез 4-HDoHE, 11-HDoHE и 17-HDoHE, производных DHA, что указывает на то, что они являются веществами, способствующими разрешению воспаления [14,15].

Ранее была показана активация синтеза PGE<sub>2</sub> росиглитазоном [231]. Однако остаются сомнения в том, можно ли отнести этот эффект к побочному действию росиглитазона. Эти сомнения связаны с тем, что не определена роль простагландинов как исключительно провоспалительных веществ. Например, было обнаружено, что PGE<sub>2</sub> может защищать нейроны от апоптоза, вызванного LPS, посредством модуляции образования АФК [345]. Было продемонстрировано, что с помощью различных лигандов рецепторов PPAR можно управлять метаболизмом оксипинов.

В ответ на провоспалительные стимулы синтез цитокинов является важным этапом в развитии клеточного воспалительного ответа. Астроциты, как и микроглия, отвечают на воспалительные стимулы (LPS, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) продукцией про- и противовоспалительных цитокинов как *in vitro*, так и *in vivo* [141,352]. Полученные данные согласуются с литературой: агонист PPAR $\alpha$  фенофибрат [353] и агонист PPAR $\gamma$  росиглитазон [354] ингибировали LPS-индуцированное высвобождение TNF $\alpha$  в астроцитах. Агонист PPAR $\beta$ , GW501516, снижал вызванное LPS высвобождение мРНК TNF $\alpha$  в смешанных культурах клеток мозга [346]. Развитие концепции разрешения воспаления обращает наше внимание на решение проблемы подавления синтеза провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-6 и др.) и стимуляции синтеза цитокинов разрешения воспаления (IL-10, IL-4 и др.). Поэтому было предложено использовать индекс IL-10/TNF $\alpha$  для оценки тестируемых веществ. Согласно этому индексу, испытываемые лиганды расположились в следующем порядке: GW501516 (PPAR $\beta$ ) > росиглитазон (PPAR $\gamma$ ) > GW9662 (PPAR $\gamma$ ) > GSK0660 (PPAR $\beta$ ) > фенофибрат (PPAR $\alpha$ ) > GW6471 (PPAR $\alpha$ ). Хороший показатель для росиглитазона указывает на положительную роль в регуляции воспаления. Отметим, что были получены четкие эффекты "агонист-антагонист" на высвобождение TNF $\alpha$  для PPAR $\alpha$ , на высвобождение IL-10 для PPAR $\beta$ . Это означает, что в клеточной модели, обработанной LPS, виден суммарный результат нескольких различных механизмов, модулируемых лигандами PPAR. Где-то вещества

действуют как антагонисты или обратные агонисты. Где-то, возможно, вещества не действуют как лиганды PPAR (как уже было показано, например, для росиглитазона [355]). Для оценки молекулярных механизмов этих процессов необходимы дальнейшие исследования.

Хотя не представлено данных, касающихся сравнения всех лигандов различных подтипов PPAR, тем не менее, есть определенные данные, касающиеся участия лигандов PPAR в модуляции врожденных иммунных ответов в других типах клеток. В отношении клеток макрофагального происхождения (RAW 264.7) все три антагониста подтипа PPAR (GW5417; GSK0660; GW9662) увеличивали синтез TNF $\alpha$  к 12 ч в LPS-стимулированных клетках [356]. Было обнаружено, что GSK0660 и GW9662 ингибировали синтез TNF $\alpha$  на 6 ч в LPS-стимулированных астроцитах. При этом не обнаружено реальных эффектов пары агонист-антагонист для трех подтипов PPAR в исследованной клеточной модельной системе. Также было показано, что длительное применение (три дня) антагониста PPAR $\gamma$ , GW9662, подавляло стимулированное LPS высвобождение TNF $\alpha$  или IL-10 через 48 ч после стимуляции LPS в культивируемых моноцитах человека [357]. Аналогичные данные были получены при длительном применении GW9662 на адипоцитах [358]. Поэтому в будущих исследованиях механизмов действия лигандов PPAR следует учитывать не только типы клеток, но и время обработки клеток.

Активация TLR сигнальных путей проходит с вовлечением каскадов MAPK [351]. Имеется множество исследований, описывающих связи между лигандами PPAR и активностью p38, JNK, ERK MAPK (см., например, обзор [234]). Однако механизмы таких связей варьируются в зависимости от типа клеток, стимула и времени воздействия. Также существует ряд исследований, рассматривающих негеномные механизмы фосфорилирования этих киназ, которые могут быть задействованы в механизмах действия лигандов [234]. Ингибиторы MAPK рассматриваются в качестве потенциальных противовоспалительных агентов при нарушениях в мозге [351]. Учитывая повышенную активность этих киназ в активированных астроцитах и их регулируемую роль в синтезе провоспалительных цитокинов, они являются потенциальными целями для новых терапевтических агентов [351]. В этом контексте и в комбинации с полученными нами данными, лиганды рецептора PPAR $\beta$  показывают себя наиболее перспективными по сравнению с другими испытанными соединениями.

### **3.3 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, были изучены профили оксипинов в биологических образцах пациентов с неврологическими заболеваниями, раком молочной железы и глаукомой. В ходе работы оценивалось, может ли профиль оксипинов отражать наличие заболевания, его стадию и давать новую информацию о его патогенезе.

#### **3.3.1 Профили оксипинов в плазме пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова**

При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [371].

Болезнь Вильсона (болезнь Вильсона-Коновалова (БВК)) — редкое аутосомно-рецессивное метаболическое расстройство, возникающее в результате мутаций в гене медь-транспортирующей АТФ-азы Р-типа АТР7В [359], однако влияние эпигенетики, окружающей среды, возраста и половых факторов на фенотип БВК осложняет диагностику и клинические проявления.

Действительно, указанный фермент отвечает за транспорт меди в желчь из гепатоцитов, способствуя ее присоединению к апоцерулоплазмину с образованием церулоплазмينا — основного белка, транспортирующего медь в кровь. Мутации приводят к накоплению меди в пораженных тканях [360,361], что вызывает биохимические отклонения, за которыми следует проявление экстрапирамидных симптомов, сопровождающихся нарушением функций других органов [360,361]. Распространенность БВК в мире составляет 1 на 30 000 человек; она встречается еще чаще в популяциях с высокой частотой кровного родства [362]. Проявления БВК разнообразны и, помимо заболеваний печени, могут включать неврологические и/или психиатрические симптомы, а также нарушения в крови или почках. Существует гипотеза, что различные генетические и/или экологические факторы могут влиять на фенотипы БВК [362,363]. Помимо различных мутаций АТР7В [359], на вариабельность проявлений БВК могут влиять такие генетические варианты, такие как

аполипопротеин Е (APOE), прионный белок человека (PRNP), 5,10-метилентетрагидрофолат редуктаза (MTHFR), антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL1RN), пероксисомальная каталаза и другие гены [363]. Влияние эпигенетики, окружающей среды, возраста и факторов, связанных с полом, на фенотип БВК еще больше усложняет диагностику [361]. Четкие корреляции между фенотипами при БВК до сих пор неясны. Данные, полученные из образцов печени и крови пациентов с БВК, показали специфические наборы измененных генов, которые были обогащены генами, участвующими в липидном обмене и воспалительных ответах [364]. Такие изменения могут по-разному проявляться на уровне организма в целом и быть причиной наблюдаемых различий в проявлениях заболевания. Это привлекло внимание к изучению болезни на уровне анализа изменений низкомолекулярных компонентов крови. Высокопроизводительные методы, такие как метаболомное профилирование, могут выявить новые аспекты патогенеза заболевания и биологии проявления БВК [365, 366], а значит, привести к появлению новых терапевтических подходов. Понимание биологии патогенеза БВК и совершенствование методов диагностики является актуальной проблемой, поставленной перед научным сообществом [367].

Косвенные данные указывали на возможность изменения профиля оксипинов при БВК. Роль окислительного стресса в патогенезе БВК [368] и польза диетических  $\omega$ -3 ПНЖК в животной модели БВК [369] позволяли предположить, что оксипины могут быть вовлечены в клинические проявления БВК. Более того, количество некоторых связанных с липидами ядерных рецепторов, таких как ретиноидный X-рецептор (RXR), PPAR $\alpha$  и ядерный фактор гепатоцитов 4-альфа (HNF4A), обычно снижено при БВК [370, 371]. Несмотря на эти факты, роль системы врожденного иммунитета и оксипинов как ее составляющих при многих заболеваниях оставалась недооцененной. Поэтому совместно с научным центром неврологии нами было проведено сравнение профиля оксипинов в плазме пациентов с различными клиническими проявлениями БВК и здоровыми людьми с целью оценки изменений профиля оксипинов при этом заболевании.

### **Клиническая характеристика**

В исследовании приняли участие 39 пациентов с БВК и группа из 16 здоровых контролей. Антропометрические, демографические и биохимические параметры крови обследованных лиц представлены в

таблице 3.6. В целом, у 25 пациентов была акинетико-ригидная форма, у 10 — дрожательная форма и у 4 — другие формы БВК. Было проведено биохимическое профилирование крови пациентов с БВК; данные по концентрации церулоплазмينا и Cu в сыворотке представлены в таблице 3.6.

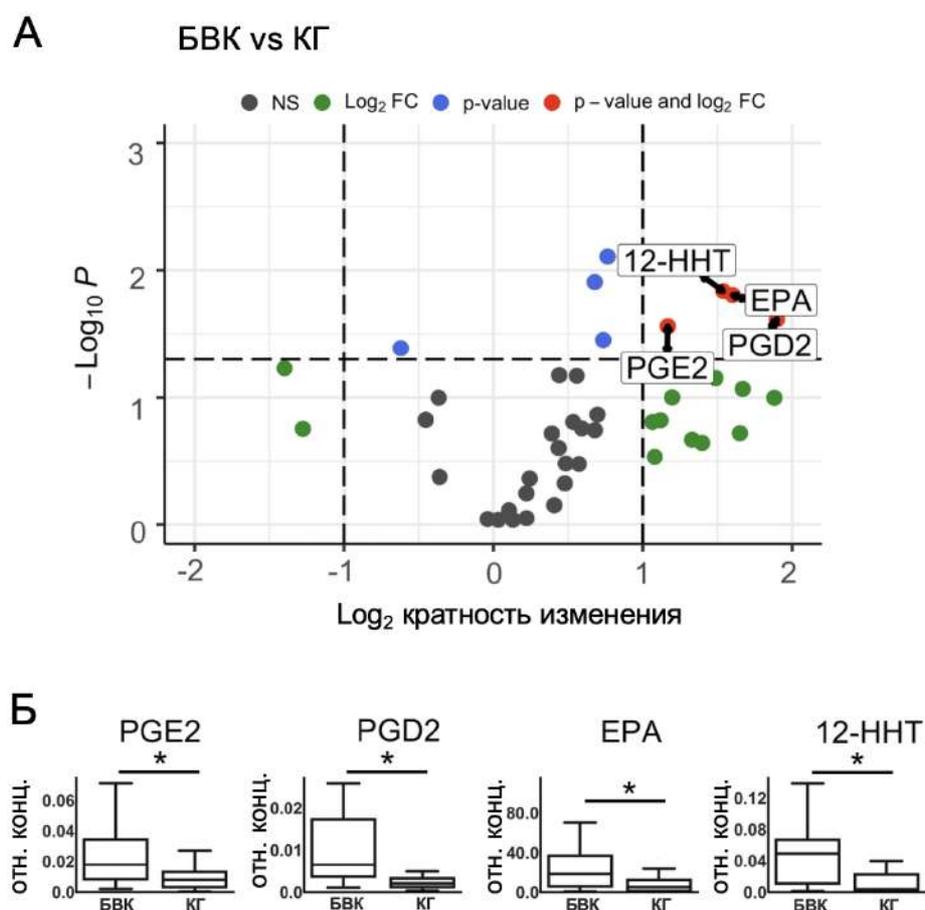
**Таблица 3.6.** Демографические параметры пациентов, характеристики заболевания и принимаемые препараты.

<b>Пациенты с болезнью Вильсона-Коновалова</b>						
Пол	Ж (n=22)			М (n=17)		
	среднее	СО	n	среднее	СО	n
Возраст	35,68	13,17		32,18	12,36	
концентрация Cu в сыворотке, мкМ	8,50	4,30		9,62	4,36	
шкала Шваба, %	80,95	18,41		67,5	22,36	
Лейпцигская шкала	7,32	2,19		6,42	2,57	
Церулоплазмин, мг/дл	9,61	7,20		12,78	8,02	
Рост, см	169,95	5,55		180,80	7,44	
Длительность заболевания, года	13,86	11,34		9,81	9,32	
Длительность лечения, года	12,86	11,25		8,21	8,75	
Вес, кг	61,20	13,27		75,67	12,21	
Форма БВК (акинетико-ригидная/дрожательная/другая)			14/6/2			11/4/2
Нефропатия			5			8
Портальная гипертензия			5			11
Психосоматические проявления			8			6
<b>Контрольная группа</b>						
	Ж (11)			М (5)		
	среднее	СО		среднее	СО	
<b>Возраст</b>	37,88	15,96		49,2	12,19	

### Метаболомное профилирование

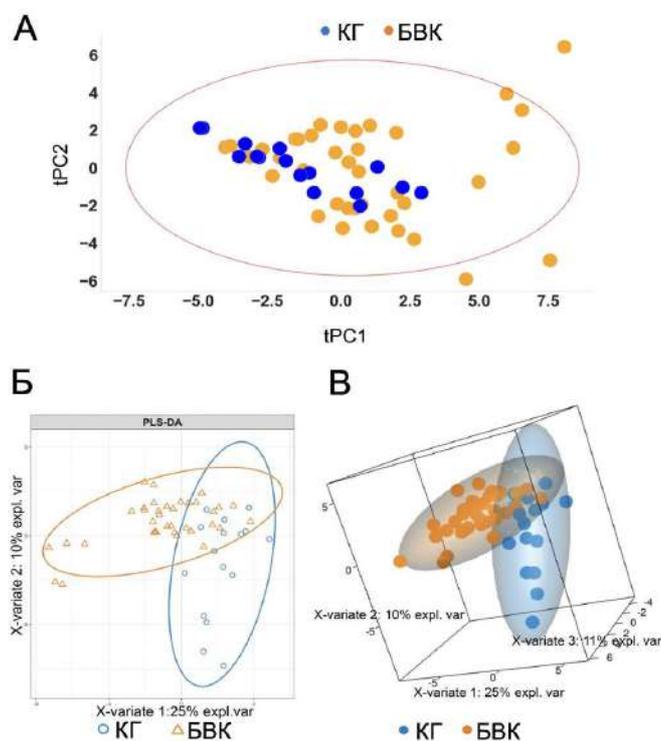
Мы обнаружили в общей сложности 43 метаболита в плазме крови человека (Приложение Б, Таблица Б.1). Метаболиты принадлежали к различным классам липидов: 3 ПНЖК (АА, ДНА и ЕРА), 19 производных АА, одно производное DGLA, 7 производных ДНА, 3 производные ЕРА, 7 производных LA и 3 соединения, не относящиеся к ПНЖК (ОЕА, АЕА, Lyso-PAF).

Для оценки отдельных метаболитов, различающихся в группах БВК и КГ, были проведены попарные сравнения концентраций метаболитов с поправкой на возраст и пол. Результаты проиллюстрированы с помощью вулканной диаграммы с поправкой Хольма-Бонферрони (Рис. 3.53А). Четыре метаболита, концентрация которых значительно изменилась, обозначены красным цветом (12-ННТ, ЕРА, PGE<sub>2</sub> и PGD<sub>2</sub>). Гистограммы относительных концентраций указанных соединений представлены на Рис. 3.53Б.



**Рис. 3.53.** (А) Вулканная диаграмма, показывающая значительно изменившиеся соединения. Ось X указывает на кратность изменение в  $\log_2$  раза для пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова (БВК) по сравнению с КГ (здоровый контроль). Ось Y показывает  $-\log_{10}$  p-значений (скорректированных). Отсечение для p-значений указано на основе поправки Бонферрони. Красными точками отмечены соединения, которые изменились более чем в два раза и имели  $p < 0,05$ . (Б) Относительные концентрации отдельных метаболитов, которые значительно изменились у пациентов с БВК по сравнению с КГ. Попарное сравнение скорректированных средних проводилось с учетом возраста и пола пациентов. \* $p < 0,05$  (с поправкой на множественное тестирование).

Для анализа данных использовали нормализованные концентрации метаболитов. Наличие выбросов выявляли проведением анализа главных компонент (PCA), чтобы предотвратить их влияние на модель. Тест Хотеллинга T2 показал наличие трех выбросов в группе здорового контроля. Для дальнейшего анализа были использованы 52 образца, которые находились внутри красных границ эллипса 95% доверительного интервала (Рис. 3.54А). Для проверки того, можно ли различать пациентов с БВК и КГ на основе концентрации оксипинов, был проведен частичный дискриминантный анализ по методу наименьших квадратов (PLS-DA). Модель оценивали с помощью перекрестной валидации на основе значений общей ошибки, сбалансированного коэффициента ошибок (BER) и площади под кривой (AUC) (см. Приложение Б, Таблица Б.2). Оптимальное число компонентов составило три. Проекция на первые две компоненты представлены на Рис. 3.54Б, а на первые три компоненты - на Рис. 3.54В. Исследуемые группы были разделены с небольшим перекрытием. Для каждого метаболита оценивался показатель VIP. Значение этого параметра учитывает объясненную вариацию между классами в каждой проекции. Семь метаболитов: 12-ННТ, ЕРА, 14,15-DHET, 9-HODE, ОЕА, PGE<sub>2</sub> и 9-KODE, со значениями VIP > 1,5 показаны в Таблице 3.7.



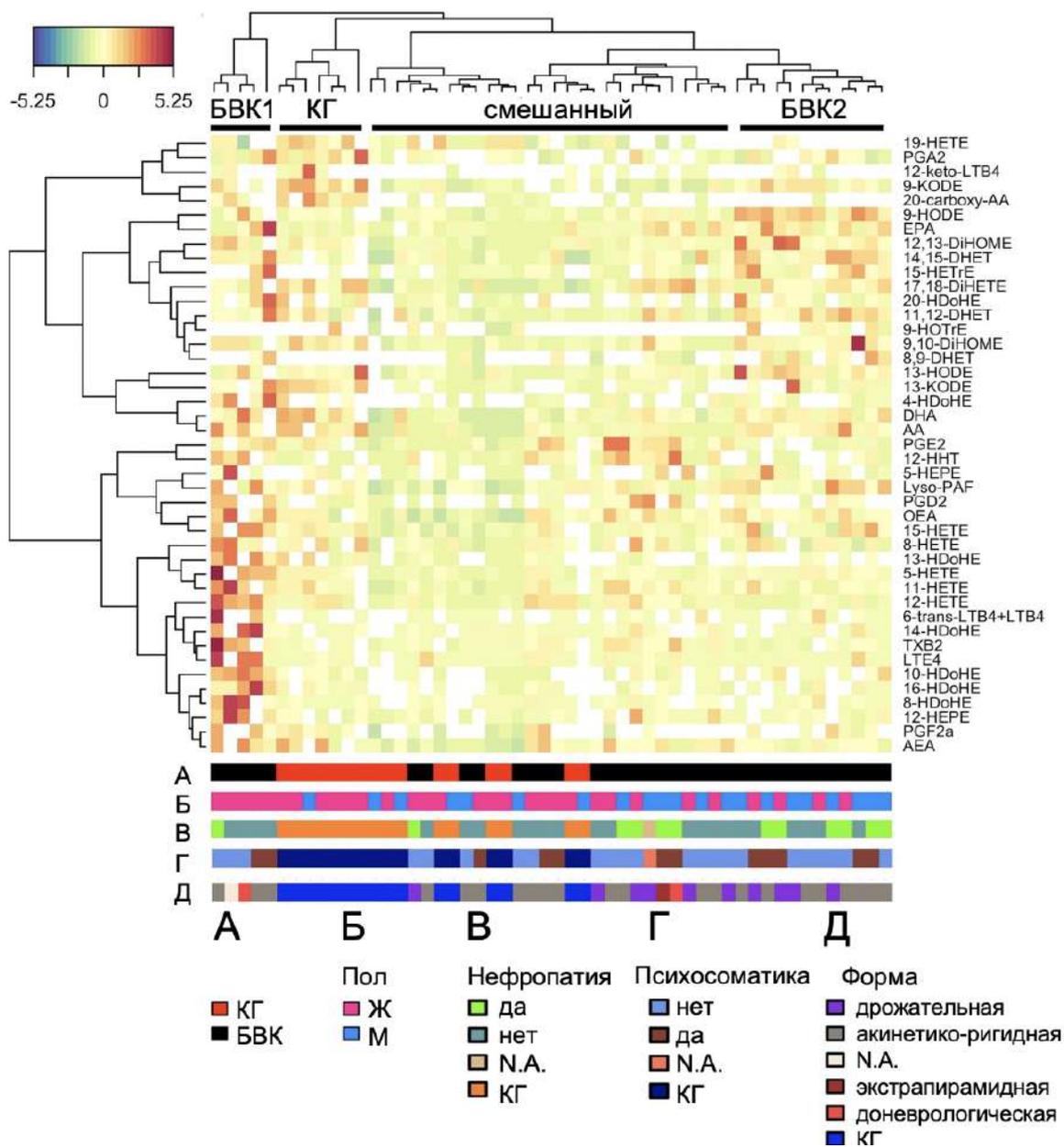
**Рис. 3.54.** (А) Анализ главных компонент (PCA), проведенный для проверки выбросов. 95% доверительный интервал Хотеллинга T2 обозначен в виде эллипса. (Б) Модель частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA), различающая контрольную группу (КГ) и пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова (БВК). Объясненная дисперсия каждого компонента указана в скобках на соответствующей оси. (В) Модель PLS2-DA, представленная в 3-D, показывающая разделение между пациентами с БВК и КГ.

**Таблица 3.7.** Показатели важности переменных в прогнозе (VIP) приведены для 7 метаболитов. VIP >1.5.

Соединение	12-ННТ*	ЕРА*	14,15-DHET	9-NODE	ОЕА	PGE <sub>2</sub> *	9-KODE
VIP	1,899456	1,741633	1,739218	1,624940	1,617023	1,594828	1,837164

\* p<0,05 (с поправкой на множественное тестирование).

Поскольку оксипирины представляют различные ветви метаболических путей (см. Литобзор, раздел 1.1), были оценены возможные взаимосвязи между соединениями, рассчитав матрицу парных ассоциаций, используя данные, полученные с помощью PLS-DA. Кластерная карта изображений (СІМ), основанная на иерархической кластеризации как строк, так и столбцов, построена с использованием алгоритма кластеризации по евклидову расстоянию и полной связи (Рис. 3.55). На рисунке каждая запись матрицы окрашена в соответствии с ассоциацией между концентрацией метаболитов и состоянием болезни (X и Y-переменные в модели). Красный цвет указывает на положительную корреляцию, тогда как желтый/зеленый - на слабую корреляцию. Дендрограммы показаны слева (для метаболитов) и сверху (для пациентов). Цветная полоса А указывает, относится ли пациент к БВК (черная) или КГ (красная). Пациенты с БВК могут быть разделены на три группы: не отличающиеся от здоровых доноров (смесь), с обогащением соединениями НДоНЕ и НЕТЕ, и с обогащением DiНЕТЕ, DiНОМЕ (Рис. 3.55). Дополнительно аннотировали обогащение модулей, используя клинические характеристики пациентов. Цветные полосы в нижней части Рис. 3.55 указывают на клиническую и антропометрическую аннотацию пациентов. Всего на СІМ представлено пять полос, обозначающих: (А) пациенты КГ/БВК; (Б) пол; (В) состояние нефропатии; (Г) психосоматический статус; (Д) форма заболевания.



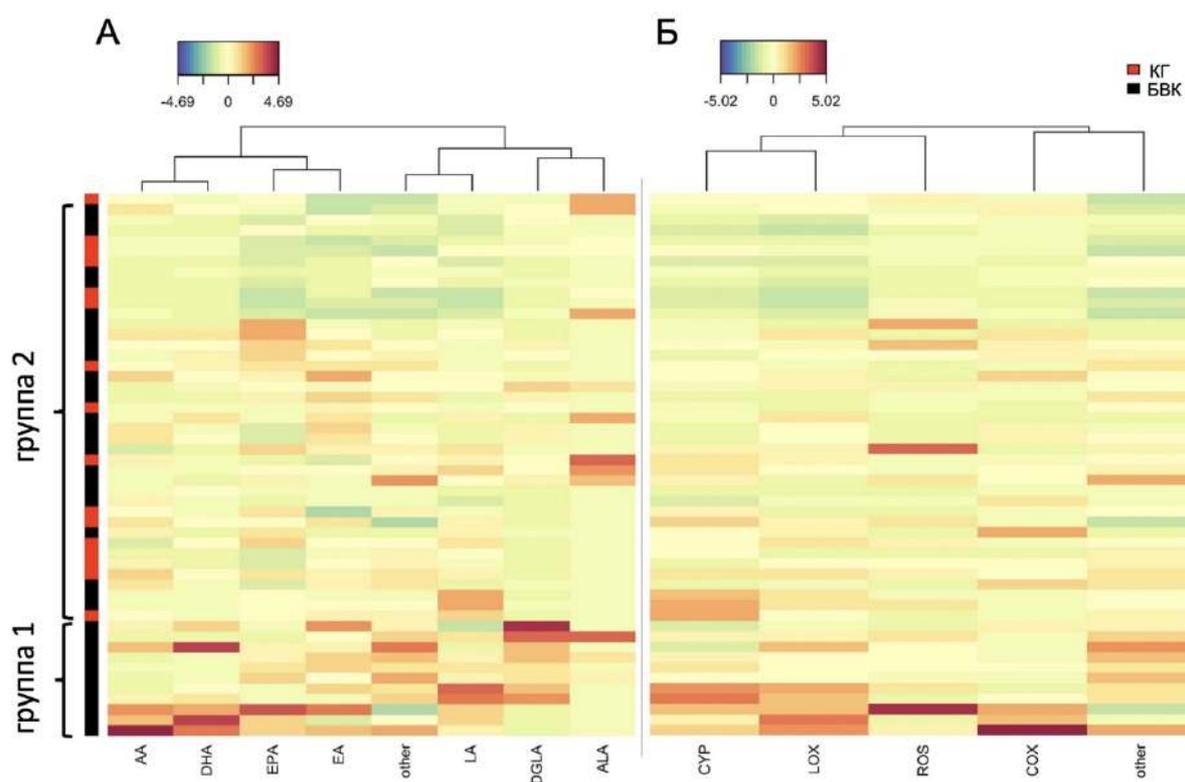
**Рис. 3.55.** Кластеризованная карта изображений была создана с использованием евклидова расстояния и алгоритма полной кластеризации связей. На рисунке каждая запись матрицы окрашена в соответствии с ее значением; строки представляют метаболиты, столбцы - субъектов. Дендрограммы показаны с левой стороны (для пациентов) и сверху (для метаболитов). Цветные полосы внизу рисунка обозначают: (А) принадлежность испытуемых к группе болезни Вильсона-Коновалова (БВК) или к группе здорового контроля (КГ); (Б) распределение по полу: мужчины (М) или женщины (Ж); (В) статус нефропатии: нет, да, КГ или данные отсутствуют (N. A.); (Г) психосоматический статус: нет, да, КГ или N.A.; (Д) форма заболевания: дрожательная, акинетико-ригидная, экстрапирамидная или доневрологическая.

Все пациенты с БВК, объединенные в группу с левой стороны, оказались женщинами (Рис. 3.55). Были проверены ассоциации с

концентрацией Си в сыворотке, тяжестью дисфункции двигательной системы по шкале Шваба, возрастом и возрастом дебюта испытуемых. Четкой кластеризации по указанным параметрам не было (см. Приложение Б, Рис. Б.1).

Для проверки наличия различий в отдельных метаболитах между выделенными группами провели анализ ковариации (ANCOVA) для сравнения скорректированных средних между группами с учетом вариабельности возраста и пола пациентов. Чтобы определить, какие группы различаются, применялись попарные сравнения скорректированных средних с последующей поправкой Бонферрони на множественное тестирование. У пациентов модуля БВК1 показатели 10-HDoHE, 11-HEHE, 12-HEPE, 12-HEHE, 13-HDoHE, 15-HEHE, 16-HDoHE, 5-HEHE и ОЕА значительно отличались от КГ (см. Приложение Б, Рис. Б.2). У пациентов из модуля БВК2 10-HDoHE, 9-HDoHE и АА значительно отличались от КГ. Микс-модуль не отличался от КГ (см. Приложение Б, Рис. Б.2).

Различия в отдельных ветвях метаболизма часто являются специфической чертой биологических процессов [3,14-16]. Далее концентрации соединений суммировали в соответствии с их предшественниками ПНЖК (АА, ДНА, ЕРА, АЛА, DGLA, ЕА, ЕРА) (Рис. 3.56А) или через метаболические пути, в результате которых они были получены (циклооксигеназа (COX), цитохром Р450 монооксигеназа (CYP), липоксигеназа (LOX) или неферментативное окисление (ROS)) (Рис. 3.56Б). Следует отметить, что в обоих случаях суммировали только производные, свободные кислоты были сгруппированы в блок "другие". Используемая классификация соединений соответствовала [3]. Затем была проведена кластеризация для соединений, сгруппированных по кислотам (Рис. 3.56А) и ферментативным путям (Рис. 3.56Б).



**Рис. 3.56.** Кластеризованная карта изображений была выполнена с использованием алгоритма кластеризации по евклидову расстоянию и полной связи. Все производные полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) были суммированы в соответствии с их (А) исходным субстратом биохимических путей или (Б) ферментным происхождением путей. На рисунке каждая запись матрицы окрашена в соответствии с ее значением, строки представляют субъектов, столбцы - метаболиты. Дендрограммы показаны сверху (для метаболитов). Цветная полоса в левой части рисунка показывает, является ли субъект из группы БВК (черный) или КГ (красный).

Размер кластера, отмеченного на Рис. 3.55, увеличился. Он был обогащен метаболитами AA, DHA, EPA, LA и DGLA, что указывает на соответствующие изменения их концентраций. Следует отметить, что корреляция между изменениями суммарного количества метаболитов путей CYP и LOX была выше, чем корреляция для COX пути. Однако эта кластеризация не объяснялась клиническими и демографическими параметрами, и причина такого обособления пока не ясна. Пациенты могли быть разделены на два кластера независимо от стратегии группировки (кислоты-предшественники или ферменты), что аналогично результатам, представленным на Рис. 3.55. Нижний кластер пациентов был связан с общим повышенным содержанием оксилипинов. С другой стороны, второй кластер пациентов не показал такой ассоциации.

После анализа сгруппированных SIM подгруппу пациентов определили как группу 1. Пациенты из этой группы имели значительно

отличающиеся концентрации метаболитов LOX (говоря о ферментативных путях) и значительные изменения в концентрации производных AA, DGLA, DHA и свободных жирных кислот (Рис. П1 приложения).

Роль окислительного стресса в патогенезе БВК в настоящее время изучается, и предполагается, что пероксисомы вовлечены в патофизиологию БВК [372]. Окисленные метаболиты LA (HODE/KODE) традиционно классифицируются как маркеры окислительного стресса [26,28]. Интересным результатом работы является обнаруженное увеличение содержания ОЕА и ЕРА, веществ, которые снижают окислительный стресс [373,374]. Окислительный стресс часто рассматривают как общее нарушение при различных патологиях, что может предполагать сходство в окисленных формах липидов. Однако вариации в профилях оксипинов, полученных при различных заболеваниях, не подтверждают эту точку зрения (см. Литобзор, п.1.3.1., 1.3.2.). Полученные данные указывают на компенсаторные механизмы, которые могут быть задействованы при БВК.

Повышение уровня 12-ННТ, PGE<sub>2</sub> и PGD<sub>2</sub> предполагает участие воспалительных процессов в патогенезе БВК. Ранее на животной модели БВК показали увеличение экспрессии COX, основного фермента синтеза этих веществ [369]. Кроме того, диета с  $\omega$ -3 ПНЖК подавляла острый гепатит, увеличивала выживаемость крыс и приводила к снижению экспрессии COX [369]. Полученные данные, показывающие увеличение 12-ННТ, PGE<sub>2</sub> и PGD<sub>2</sub>, согласуются с этим наблюдением, поскольку известно, что эти производные  $\omega$ -6 являются маркерами воспаления, которые могут быть снижены при добавлении в рацион  $\omega$ -3 ПНЖК [375].

Важно отметить, что повышение уровня некоторых оксипинов может привести к активации PPAR [376]. Три подтипа PPAR (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$ ) являются активными регуляторами на пересечении путей липидного обмена и воспаления [229]. Недавние исследования показали, что PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  связаны со стеатозом и нарушением антиоксидантной системы в печени пациентов с БВК [377]. В соответствии с этими данными, анализ транскриптома печени в мышинной модели болезни Вильсона-Коновалова при нокауте гена *Atp7b*, переносящего медь, АТФазы Р-типа, выявил сигнальный путь PPAR как путь-мишень, реагирующий на повышенную концентрацию меди [378].

Данные о механизмах изменения различных типов PPAR в присутствии избытка их лигандов на уровне организма немногочисленны.

Полученные данные позволяют предположить, что повышенное количество лигандов PPAR в крови больных БВК может быть связано с каким-то регуляторным компенсаторным механизмом, связанным с системой PPAR, а также выделяют этот сигнальный путь для дальнейшего рассмотрения на предмет его участия в клинических проявлениях БВК. Действительно, среди исследованных веществ агонистами PPAR $\alpha$  были определены ОЕА [379], ЕРА [376] и 14,15-DHET [380]. 9-HODE является эндогенным активатором и лигандом PPAR $\gamma$  [381]. В этом контексте остается вопрос о роли PGD $_2$  и PGE $_2$ . Помимо действия через специфические G-белок-связанные рецепторы, эти простагландины в ходе воспалительной реакции преобразуются в простагландины 15d-PGJ $_2$  и PGA $_2$ , соответственно. Образуются соединения с противовоспалительными свойствами, которые активируют PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  [382]. В настоящее время остается открытым вопрос, является ли повышение содержания агонистов PPAR в плазме крови пациентов с БВК защитным механизмом, ослабляющим тяжесть клинического течения заболевания или, наоборот, усугубляющим симптомы. Нам не удалось найти данных о применении синтетических агонистов PPAR в моделях БВК. Вполне вероятно, что фибраты и тиазолидиндионы могут быть использованы в качестве потенциальных терапевтических средств при БВК. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения молекулярных механизмов, посредством которых агонисты PPAR могут оказывать свое действие в патогенезе БВК.

Кроме PPAR, нельзя исключить участие оксипинонов в регуляции активности других ядерных рецепторов, поскольку известно, что у больных БВК или в животных моделях изменяется активность ядерных рецепторов, связанных с обменом липидов [370,371]. Снижение связывания ядерных рецепторов FXR, RXR, HNF4 $\alpha$  и LXR-1 и снижение экспрессии мРНК генов-мишеней ядерных рецепторов [370] и дисрегуляция гетеродимеров LXR/RXR [371] также могут быть компенсированы увеличением концентрации липидных агонистов. Полученные данные согласуются с этими результатами, но для понимания механизмов необходимы дальнейшие исследования.

Важным результатом работы является разделение пациентов на группы относительно профилей оксипинонов. Пациенты из разных групп имели значительно отличающиеся концентрации метаболитов LOX и имели значительные изменения в концентрации производных AA, DGLA и DHA и свободных жирных кислот. Пока не ясно, какой параметр лежит в основе

такого разделения, поскольку не обнаружена корреляции с полом и возрастом. Разделение на группы может отражать различные состояния системы врожденного иммунитета. Наряду с различными цитокинами, оксипирины входят в систему врожденного иммунитета, являясь провоспалительными веществами, а также медиаторами разрешения воспаления [366]. На особенности врожденного иммунитета в значительной мере влияет окружающая среда [383]. Факторы окружающей среды, включая диету, физические нагрузки, стресс и токсины, оказывают глубокое влияние на фенотипы заболеваний, и БВК входит в их число [363]. Стоит предположить, что наблюдаемое разделение пациентов по профилю оксипиринов отражает фенотипический ответ на факторы окружающей среды и, следовательно, текущее состояние врожденной иммунной системы. Этот аспект требует дальнейшего изучения метаболитов, которые, характерны для БВК.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об изменении профилей оксипиринов плазмы у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова, 8 соединений изменялись при заболевании, в том числе маркеры воспаления ( $\text{PGE}_2$ , 12-ННТ,  $\text{PGD}_2$ ) и группу, которую относят к окислительному стрессу, а также лигандам  $\text{PPAR}\alpha$  (9-НОДЕ, 9-КОДЕ, ОЕА, ЕРА, 14,15-ДНЕТ). Полученные данные открывают новые возможные терапевтические мишени и стратегии вмешательства для лечения БВК.

### **3.3.2 Профили оксипиринов во внутриглазной жидкости пациентов с первичной открытоугольной глаукомой**

При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [384]. Глаукома является широко распространенным нейродегенеративным глазным заболеванием, которым страдают более 70 миллионов человек во всем мире. В большинстве случаев она характеризуется преходящим или устойчивым повышением внутриглазного давления (ВГД), приводящим к апоптотической гибели ганглиозных клеток сетчатки (ГКС), потере слоя нервных волокон сетчатки и экскавации головки зрительного нерва. На ранних стадиях заболевание часто протекает бессимптомно, поскольку дефекты поля зрения вначале развиваются на его периферии. Однако

прогрессирование оптической нейропатии при отсутствии соответствующего лечения может привести к ухудшению центрального зрения и в конечном итоге к слепоте [385].

В настоящее время глаукома рассматривается как многофакторное заболевание с широким спектром этиологии и сложным патогенезом. В нормальных условиях ВГД поддерживается за счет тонкого баланса между секрецией внутриглазной жидкости (ВГЖ) цилиарным телом и его оттоком через трабекулярную сетку (ТС) в канал Шлемма, а также через увеосклеральный путь. При открытоугольной глаукоме отток ВГЖ затруднен, что приводит к повышению ВГД до 20-30 мм рт. ст. [386]. Развитие первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) связано с нарушением функционирования ТС и/или аберрациями структурных и биомеханических особенностей корнеосклеральной мембраны. На нее влияют метаболические, генетические и экологические условия, а также близорукость и старение [385]. Было предложено несколько возможных факторов, способствующих повреждению ГКС и нарушению регенерации при ПОУГ, а именно: механический стресс, эксайтотоксичность, дисфункция митохондрий, дисрегуляция сосудов, ишемия сетчатки и окислительный стресс (см. обзор [387]). Последние данные подчеркивают патогенную роль воспаления, вызванного некоторыми из этих факторов. Так, ишемия/реперфузия и окислительный стресс способствуют экспрессии ряда воспалительных молекул, включая оксид азота, эндотелин-1, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), С-реактивный белок, матриксные металлопротеиназы и различные цитокины. Воспалительные реакции, вызываемые этими молекулами, особенно на фоне возрастного снижения гематоретинального барьера, могут способствовать гибели ГКС [388].

Все больше данных указывают на роль липидных медиаторов воспаления при глаукоме, в частности арахидоновой кислоты (АА) и ее производных простагландинов (PG). Ранее было продемонстрировано, что основные типы сигнальных липидов, такие как ПНЖК, оксипирины и производные фосфолипидов, секретируются в нормальной ВГЖ, и их структура значительно изменяется при различных глазных заболеваниях, включая те, которые поражают сетчатку [389-391]. Ингибирование фермента COX-2, метаболизирующего АА, повышает выживаемость ГКС [392]. С другой стороны, PG, которые могут синтезироваться из АА этим ферментом, оказывают выраженный эффект снижения ВГД, воздействуя на различные протаноидные рецепторы, вызывая тем самым расслабление ТС

[393]. Кроме того, они влияют на увеосклеральный путь, увеличивая внутриглазные пространства в цилиарном теле, через ремоделирование внеклеточного матрикса путем повышения биосинтеза матриксных металлопротеиназ [394]. Наиболее выраженная гипотензивная активность проявляется в случае  $PGF_{2\alpha}$ , аналоги которого в настоящее время одобрены в качестве препаратов первой линии для лечения глаукомы наряду с ингибиторами карбоновой ангидразы, бета-блокаторами, альфа-агонистами и парасимпатомиметиками (см. обзор [395]).

Имеются сведения и об участии некоторых других оксипинонов в патогенезе глаукомы. Например, было обнаружено, что сывороточные уровни производных линолевой кислоты HODE и производных арахидоновой кислоты (HETE) - повышены у пациентов с ПОУГ [396].

Насколько нам известно, комплексный анализ связанных с ПОУГ изменений в сигнальных липидах ВГЖ ранее не проводился. Поэтому был проведен такой анализ для оценки изменений в сигнальных липидах, секретируемых во ВГЖ пациентов с ПОУГ на разных стадиях заболевания и в условиях повышенного ВГД. Сбор образцов ВГЖ и СЖ пациентов с глаукомой проводился в национальном медицинском исследовательском центре глазных болезней имени Гельмгольца.

Следует отметить, что основные паттерны оксипинонов ВГЖ продемонстрировали сходство с паттернами слезной жидкости (СЖ) [389], что позволяет предположить, что последняя может быть использована в качестве источника биомаркеров при различных глазных заболеваниях. Это особенно актуально, поскольку, в отличие от ВГЖ, СЖ может быть собрана с помощью неинвазивной процедуры. В ряде работ сообщается о характерных изменениях биохимических свойств слезной жидкости при глаукоме, как с фармакологическим лечением, так и без него [397,398]. Учитывая эти данные, в текущем исследовании также был проведен липидомный анализ СЖ, полученной от тех же пациентов с ПОУГ.

### **Характеристика экспериментальных групп**

В исследовании приняли участие в общей сложности 24 пациента с ПОУГ и 14 пациентов с катарактой без истории глаукомы, которые использовались в качестве контроля. Подробные демографические характеристики и сопутствующие заболевания участников представлены в Таблице 3.8. Количество и возраст пациентов в подгруппах ПОУГ,

зависящих от стадии заболевания, были в целом сходными, что позволило провести обоснованное сравнение.

**Таблица 3.8.** Характеристика контрольной группы и группы ПОУГ.

Параметр	Конт роль групп па	Стадии ПОУГ (ВГД)				ПОУГ (общие данные)	
		IIA $\leq 21$ мм.рт.ст	IIB 22–28 мм.рт.ст	IIIB 22–28 мм.рт.ст	IIIC $\geq 29$ мм.рт.ст		
Число субъектов	14	3	7	8	6	24	
Средний возраст $\pm$ СО <sup>1</sup> , года	65,64 $\pm$ 13,77	67,0 $\pm$ 2,65	68,86 $\pm$ 4,18	71,62 $\pm$ 6,8	63,33 $\pm$ 6,65	68,17 $\pm$ 9,35	
Пол, %	Муж.	21,43	0,0	14,29	50,0	33,33	29,17
	Жен.	78,57	100,0	85,71	50,0	66,67	70,83
ВГД $\pm$ СО, мм.рт.ст.	14,9 $\pm$ 1,8	17,7 $\pm$ 1,7	24,7 $\pm$ 2,1	25,5 $\pm$ 1,8	33,5 $\pm$ 3,4	26,3 $\pm$ 1,9	
Чашка/диск	0,54 $\pm$ 0,12	0,73 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,09	0,85 $\pm$ 0,06	0,79 $\pm$ 0,06	
Рефр., %	Миопия	42,86	33,33	42,86	12,5	16,67	25,00
Сопутствующие заболевания, %	АГ <sup>2</sup>	42,86	66,67	42,86	50,0	50,0	50,00
	ИБС <sup>3</sup>	14,29	33,33	28,57	75,0	0	37,50
	СД <sup>4</sup>	7,14	0	28,57	0	16,67	12,50
Лечение, %	PG аналоги	0	0	0	62,5	50,0	33,33
	$\beta$ -блокаторы	0	100	57,14	37,5	33,33	37,50
	ИКА <sup>5</sup>	0	100	71,43	50,0	66,67	54,16
	$\alpha$ -агонисты	0	0	42,86	12,5	33,33	25,00

<sup>1</sup>СО - стандартное отклонение; <sup>2</sup>АГ - артериальная гипертензия; <sup>3</sup>ИБС - ишемическая болезнь сердца; <sup>4</sup>СД - сахарный диабет; <sup>5</sup>ИКА - ингибитор карбоновой ангидразы.

### Профиль сигнальных липидов, секретируемых во ВГЖ

Содержание сигнальных липидов во ВГЖ как контрольных лиц, так и пациентов с ПОУГ оценивалось методом ВЭЖХ-МС/МС. Всего было идентифицировано 22 соединения (Таблица 3.9).

**Таблица 3.9.** Номенклатура липидных соединений, обнаруженных в ВГЖ.

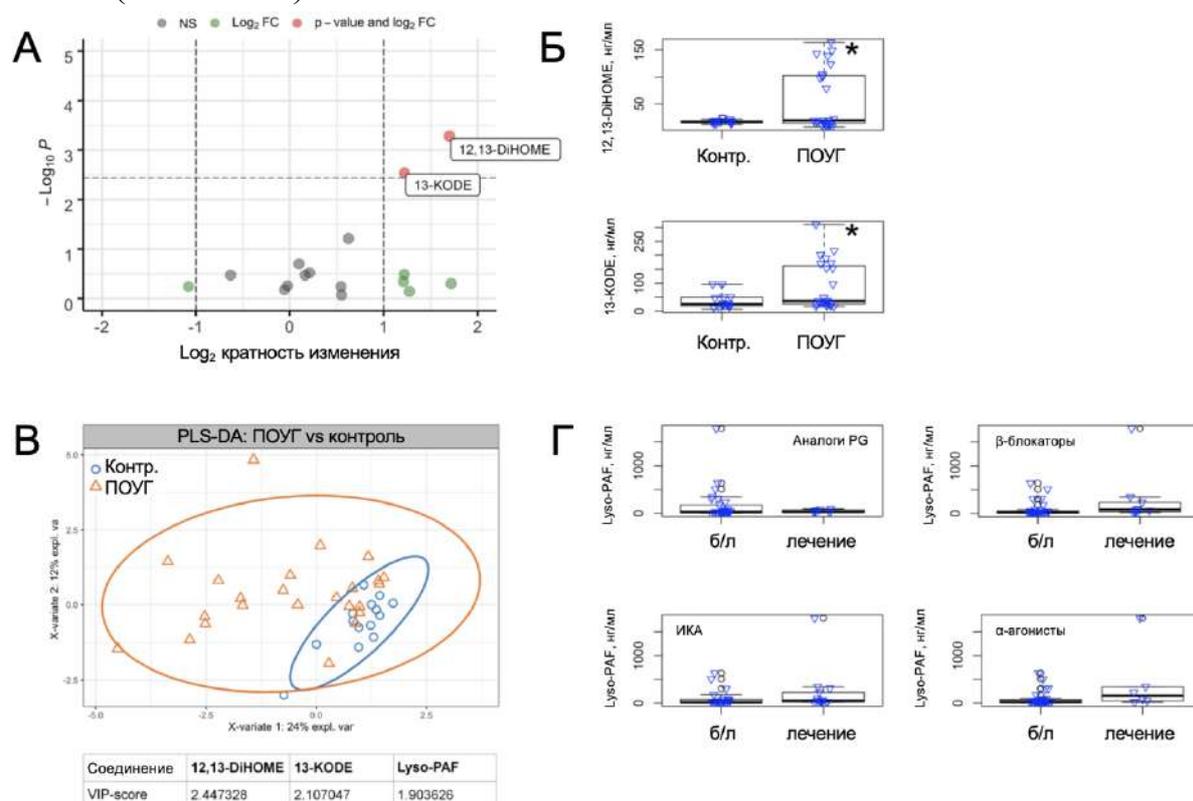
#	Наименование	Прекурсор	Сигнальный путь
<b>ПНЖК</b>			
1	АА	Фосфолипиды	PLA2

2	DHA	пища, EPA	-
3	EPA	пища, ALA	-
<b>Оксилипины</b>			
4	LTB4	AA	LOX
5	20-carboxy-LTB4	AA	LOX
6	19-HETE	AA	LOX
7	20-HETE	AA	LOX
8	PGA2	AA	COX
9	PGJ2	AA	COX
10	TXB3	AA	COX
11	9-HODE	LA	LOX
12	9-KODE	LA	LOX
13	13-HODE	LA	LOX
14	13-KODE	LA	LOX
15	9,10-DiHOME	LA	CYP
16	9,10-EpOME	LA	CYP
17	12,13-DiHOME	LA	CYP
18	12,13-EpOME	LA	CYP
19	9-HOTrE	ALA	LOX
20	13-HOTrE	ALA	LOX
<b>Производные фосфолипидов</b>			
21	Lyso-PAF	Фосфолипиды	PLA2
22	OEA	Фосфолипиды	NAPE-PLD

### **Связанные с ПОУГ изменения в сигнальных липидах ВГЖ**

Для сравнения липидов ВГЖ группы пациентов с ПОУГ и контрольной группы были проведены попарные сравнения концентрации каждого из выявленных соединений с поправкой на возраст и пол, используя ANCOVA (Рис. 3.57). Как видно из полученной вулканной диаграммы с поправкой Хольма-Бонферрони, разницу между группами обеспечивали только два LA-производных оксилипинов, 12,13-DiHOME и 13-KODE (Рис. 3.57А), которые продемонстрировали значительное увеличение при глаукоме (Рис. 3.57Б). Поскольку t-тест рассматривает каждую переменную отдельно, данные были дополнительно пересчитаны с помощью частичного дискриминантного анализа методом наименьших квадратов (PLS-DA). Для выявления значимых различий было использовано значение отсечения 1,5 для рассчитанных оценок важности переменных в проекции (VIP). Примечательно, что оценки с помощью PLS-DA выявили те же оксилипины 12,13-DiHOME и 13-KODE, дополненные

фосфолипидным производным lyso-PAF, который также был повышен при ПОУГ (Рис. 3.57В).



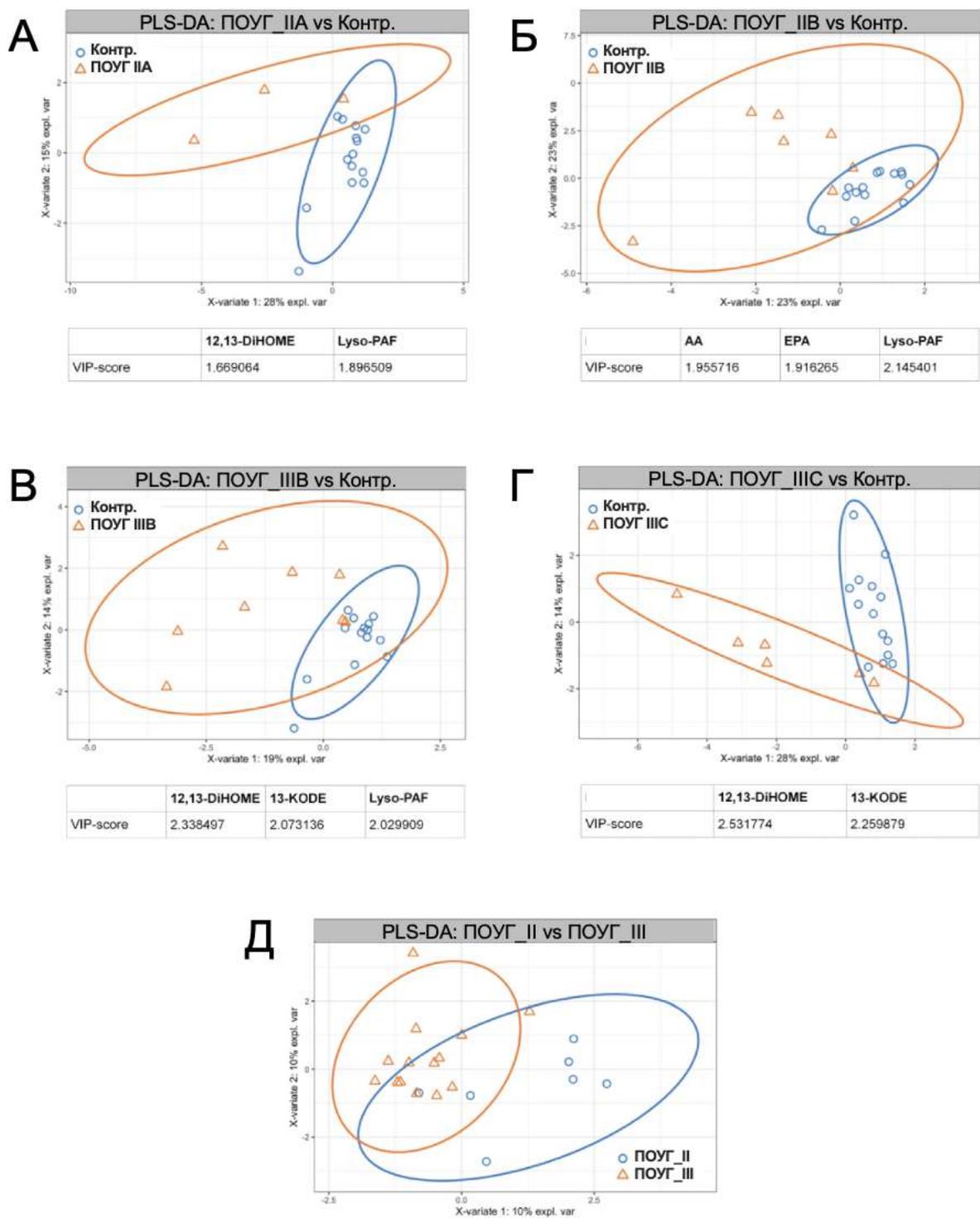
**Рис. 3.57.** Изменения в содержании сигнальных липидов во ВГЖ в общей когорте пациентов с ПОУГ. (А) На вулканной диаграмме представлены соединения, дискриминирующие общую группу пациентов с ПОУГ и контрольную группу (Контр.). Ось X показывает изменение концентрации идентифицированных соединений с поправкой на возраст и пол у пациентов с ПОУГ по сравнению с контрольной группой. По оси Y указаны р-значения  $-\log_{10}$  с отсечкой, рассчитанной в соответствии с поправкой Бонферрони. Значительно изменившиеся соединения ( $p < 0,05$ ) обозначены красным цветом. (Б) графики, демонстрирующие концентрации метаболитов, демонстрирующих значительные изменения у пациентов с ПОУГ по сравнению с Контр. \* $p < 0,05$  (с поправкой на множественное тестирование). (В) результаты частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA), выявляющего соединения, отличающие пациентов с тотальной ПОУГ от Контр. (Г) графики, иллюстрирующие попарные сравнения концентраций lyso-PAF во ВГЖ пациентов с ПОУГ с лечением или без лечения (б/л) антиглаукомного лечения с использованием аналогов простагландинов (PG), бета-блокаторов, ингибиторов карбоновой ангидразы (КА) или альфа-адренергических агонистов. Во всех случаях  $p > 0,05$ .

Поскольку пациенты с ПОУГ получали комплексную гипотензивную терапию, было проверено, связаны ли выявленные изменения с действием соответствующих антиглаукомных препаратов, а именно аналогов простагландинов, бета-блокаторов, ингибиторов карбоновой ангидразы или

агонистов альфа-адренергических рецепторов (см. Таблица 9). Попарное сравнение данных о концентрации Lyso-PAF во ВГЖ у пациентов с ПОУГ, получавших или не получавших каждый вид вышеуказанной терапии, не выявило существенных различий (Рис. 3.57Г). Такие же результаты были получены для 12,13-DiHOME и 13-KODE (а также для других липидов, зависимых от ПОУГ, выявленных в ходе исследования). Кроме того, не было обнаружено значительного влияния системных заболеваний, таких как артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца и сахарный диабет. Таким образом, можно заключить, что изменения оксипинолов представляли собой специфический для ПОУГ эффект.

### **Стадия ПОУГ и ВГД-зависимые изменения в сигнальных липидах ВГЖ**

Учитывая, что ПОУГ является медленно прогрессирующим заболеванием, было оценено, какие сигнальные липиды ВГЖ подвергаются динамическим изменениям после его развития. Использовали PLS-DA для сравнения данных для каждой из подгрупп ПОУГ, зависящих от стадии/ВГД (см. Таблицу 3.8), с данными для контрольной группы (рис. 3.58А-Г). Также сравнили всех пациентов II стадии со всеми пациентами III стадии (Рис. 3.58Д). (Также приведены данные относительно чистого эффекта ВГД-зависимых изменений в сигнальном липидоме ВГЖ и СЖ; см. Приложение В, Рис. В.1). В целом, проанализированные данные демонстрировали возрастающую степень расхождения с ростом тяжести глаукомы. Основной вклад в изменения профиля оксипинолов в зависимости от стадии заболевания обеспечивали одним и теми же соединения, а именно 12,13-DiHOME, 13-KODE и lyso-PAF, хотя в некоторых случаях дополнительно регистрировали различия в содержании AA и 9-HODE.



**Рис. 3.58.** Изменения содержания сигнальных липидов во ВГЖ пациентов с ПОУГ в зависимости от стадии/ВГД. Результаты частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA), выявляющего соединения ВГЖ, отличающие больных глаукомой со стадией IIА (А), стадией IIВ (Б), стадией IIIB (В) или стадией IIIC (Г) ПОУГ от контрольных лиц (CONT). Также представлены данные PLS-DA по сравнению содержания ВГЖ сигнальных липидов у пациентов с различными стадиями ПОУГ независимо от уровня ВГД (Д). На осях указана объясненная дисперсия каждого компонента.

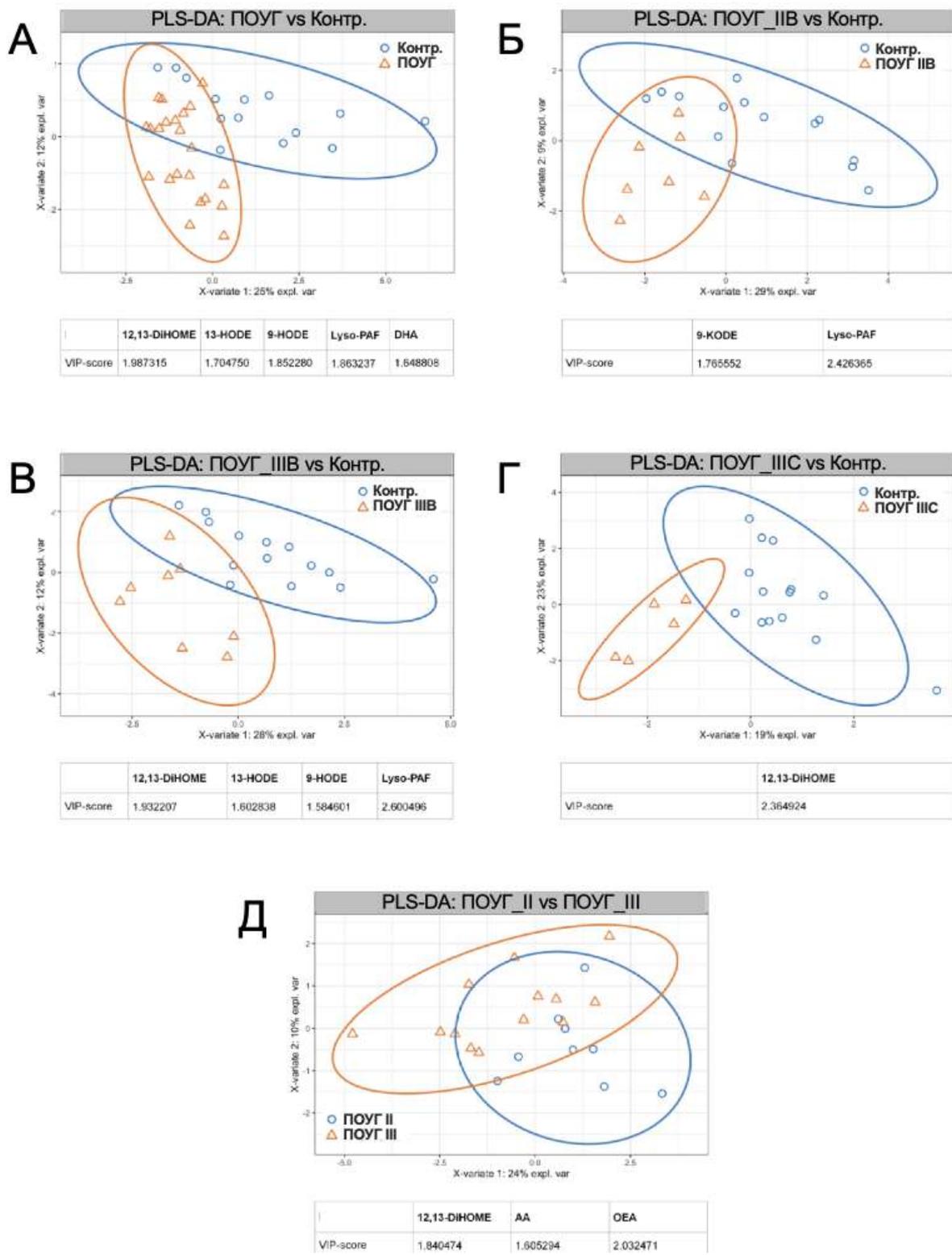
Производный LA оксипипин 12,13-DiНОМЕ можно считать наиболее значимым биомаркером ПОУГ, поскольку он наиболее часто встречался в нашем анализе как соединение, обеспечивающее разницу между контрольной и глаукомной группами как для ВГЖ, так и для СЖ. Он принадлежит к недавно выявленному классу липидов, называемых липокинами, которые действуют как сигнальные молекулы, модулирующие системный метаболизм. 12,13-DiНОМЕ повышается в ответ на воздействие холода или физическую нагрузку, и его действие связано с улучшением метаболизма, таким как повышенное окисление и поглощение жирных кислот [3,399]. Общий путь биосинтеза 12,13-DiНОМЕ включает два этапа: окисление LA под действием СУР с образованием эпоксидного производного 12,13-ЕрОМЕ и его последующее дигидроксилирование, катализируемое ЕН-1 или ЕН-2 [399]. Несмотря на то, что 12,13-DiНОМЕ никогда не был связан с глаукомой, существующие транскриптомные и протеомные данные об изменениях в глазных тканях, связанных с ПОУГ, в целом подтверждают повышенную продукцию и секрецию этого оксипипина во ВГЖ и СЖ.

Интересно отметить, что, хотя большинство соединений накапливались во ВГЖ с развитием ПОУГ, 9-NODE продемонстрировал противоположную тенденцию. Этот эффект может быть связан с окислением и, таким образом, истощением NODE (предшественника), дающим KODE (продукт), поскольку последний увеличивается в глаукоматозной ВГЖ. Действительно, как и 13-KODE, 9-KODE был повышен у некоторых пациентов с III стадией ПОУГ (см. Приложение В, Рис. В.2). В целом, можно отметить, что производные линолевой кислоты 12,13-DiНОМЕ и 9- и 13-KODE, а также AA и lyso-PAF являются основными сигнальными липидами, повышенными во ВГЖ после развития ПОУГ.

### **Изменения в содержании оксипипинов в СЖ, связанные с ПОУГ**

Слезная жидкость рассматривается как потенциальный источник биомаркеров различных глазных заболеваний, за счет удобства и неинвазивной процедуре отбора образцов. Описанные выше подходы были использованы для анализа ассоциированных с ПОУГ изменений в СЖ, собранных у тех же пациентов и в контрольной группе. Выделили 22 липидных соединения в слезной жидкости, которые совпадали с выделенными в ВГЖ (см. табл. 3.9). Изменившиеся соединения в СЖ были

схожи с соединениями, изменившимися в ВГЖ, а именно 12,13-DiHOME, 9- и 13-HODE/KODE, AA и lyso-PAF (Рис. 3.59). Как и в случае с ВГЖ, в глаукоматозной СЖ наблюдалось снижение уровня HODE (предшественника) и увеличение уровня KODE (продукта). Исключение составила ДНА, которая продемонстрировала специфическое для глаукомы снижение только в СЖ, особенно в парах "полная ПОУГ против контроля" (Рис. 3.59А) и "стадия ПА против контроля" (данные не показаны). Как и в случае с ВГЖ, лечение антиглаукомными препаратами не повлияло на структуру сигнальных липидов в СЖ (см. Приложение В, Рис. В.3).



**Рис. 3.59.** Общие и зависимые от стадии/ВГД изменения в содержании сигнальных липидов в СЖ пациентов с ПОУГ. Результаты частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA), выявляющего соединения СЖ, отличающие пациентов с тотальной глаукомой (А) и пациентов с ПОУГ IIВ (Б), IIIВ (В) или IIIC (Г) стадии от контрольных лиц (Контр.). Также представлены данные PLS-DA по сравнению содержания СЖ сигнальных липидов у пациентов с различными стадиями ПОУГ независимо от уровня ВГД (Д). На осях указана объясненная дисперсия каждого компонента.

## **Протеомный и транскриптомный анализ открытых наборов данных, ассоциированных с глаукомой.**

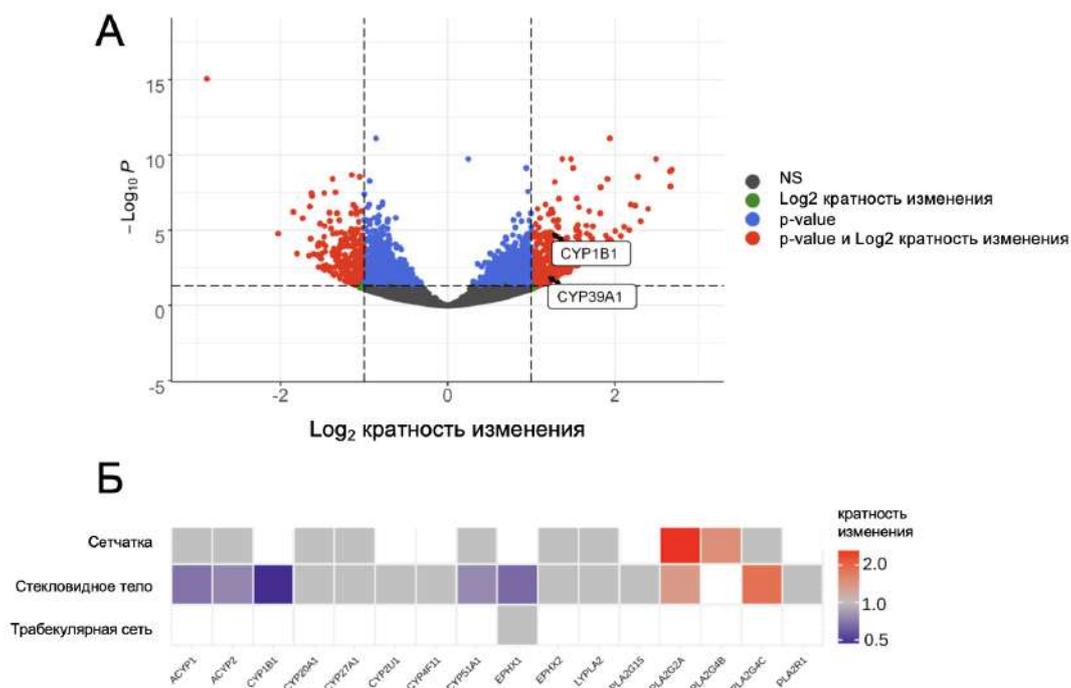
Для предсказания ферментативных путей, ответственных за производство выявленных липидных медиаторов во ВГЖ были проанализированы наборы данных, описывающие связанные с глаукомой изменения в транскриптомах и протеомах пораженных глазных тканей.

Были проанализированы изменения в ТС, сетчатке и стекловидном теле, поскольку эти ткани могут секретировать сигнальные липиды во ВГЖ и в то же время наиболее подвержены глаукоме [385]. На первом этапе проанализировали данные RNA-Seq, полученные для первичных клеток ТС человека, в условиях модели, имитирующей один из основных патогенетических процессов у пациентов с глаукомой (открытый датасет GSE123100) [400]. Основное внимание было уделено семействам ферментов, участвующих в биосинтезе обнаруженных сигнальных липидов, а именно CYP/эпоксид-гидролазам (DiHOME), LOX (HODE/KODE) и PLA2s (AA и Lyso-PAF). Проведенный анализ дифференциальной экспрессии RNA-Seq выявил более 590 ДЭГ, только два из которых, а именно CYP1B1 и CYP39A1 участвовали в биосинтезе изменившихся оксилипинов (Рис. 3.60А).

Экспрессия родственного фермента, CYP2S1, увеличилась в сетчатке крысы в модели глаукомы, основанной на операции на зрительном нерве [401]. В то же время, экспрессия CYP1B1 была обнаружена сниженной в стекловидном теле пациентов с ПОУГ (Рис. 3.60Б) [402]. Примечательно, что CYP1B1 известен как ген, часто ассоциируемый с первичной врожденной глаукомой, его мутации часто обнаруживались у пациентов с ПОУГ, что позволяет предположить существование общего CYP1B1-опосредованного механизма обоих вариантов заболевания [403]. Хотя прямых указаний на участие CYP1B1 в синтезе 12,13-DiHOME нет, последний может представлять собой сигнальный липид, опосредующий патологические эффекты, связанные с абберациями в CYP1B1.

Примечательно, что CYP известны как маркеры окислительного стресса, поскольку они участвуют в переработке различных токсичных метаболитов с образованием активных форм кислорода, таких как супероксид-анион, перекись водорода и гидроксильный радикал [404]. Соответственно, повышение уровня CYP, о чем свидетельствует стабильное увеличение их продукта 12,13-DiHOME, может быть признаком окислительного стресса в тканях глаза, пораженных ПОУГ. Хотя в низких

дозах 12,13-DiHOMЕ оказывает благоприятное метаболическое воздействие, повышенный уровень 12,13-DiHOMЕ может способствовать размыканию электронно-транспортной цепи митохондрий и окислительному стрессу [405], что может привести к гибели ГКС. О развитии окислительного стресса при ПОУГ свидетельствует и рост уровня других сигнальных липидов ВГЖ, 9-NODE/KODE и 13-NODE/KODE, наблюдаемый в нашем исследовании. Эти метаболиты могут быть синтезированы из LA через два альтернативных механизма, а именно LOX-зависимые пути или неферментативное окисление, вызванное свободными радикалами [3]. Учитывая, что в пораженных глазных тканях (ТС, сетчатка или стекловидное тело) не было обнаружено изменений LOX, связанных с ПОУГ [400,402], можно ожидать, что окислительный стресс является основной движущей силой для производства NODE/KODE, обнаруженных в глаукоматозной ВГЖ. Действительно, эти оксипирины широко рассматриваются как биомаркеры окислительного стресса в различных тканях [406]. Более того, уровни 9- и 13-NODE выше в крови пациентов с ПОУГ [396]. Эти наблюдения согласуются с полученными данными, поскольку NODE являются предшественниками KODE, и наблюдалось увеличение KODE в глаукоматозной ВГЖ, которая, по крайней мере, частично образуется в результате ультрафильтрации плазмы [407]. Следует также отметить, что CYP1B1 и его продукты могут играть специфическую роль в окислительно-восстановительных механизмах глаукомы: этот фермент участвует в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза, и его отсутствие может снизить толерантность ТС и сетчатки к окислительному стрессу, тем самым вызывая дефекты развития и врожденную глаукому, или ПОУГ [403]. В совокупности эти данные подтверждают критическую роль окислительного стресса в патогенезе глаукомы [408].



**Рис. 3.60.** Биоинформатический анализ ферментативных путей, ответственных за производство выявленных специфических для ПОУГ липидных медиаторов во ВГЖ. (А) Вулканная диаграмма, показывающая ДЭГ, соответствующие сигнальным липид-синтезирующим ферментам в клетках ТС, подвергшихся длительной перфузии при высоком давлении, согласно анализу транскриптомных данных. По оси X показано изменение уровня транскриптов в  $\log_2$ -кратной степени в клетках ТС, перфузируемых при высоком давлении в течение 3 ч по сравнению с 5 ч. По оси Y показаны р-значения  $-\log_{10}$  с отсечкой, рассчитанной по поправке Бонферрони. Значительно изменившиеся транскрипты ( $p < 0,05$ ) обозначены красным цветом. (Б) тепловая карта, иллюстрирующая изменения экспрессии сигнальных липид-синтезирующих ферментов в сетчатке, стекловидном теле и трабекулярной сетке пациентов с ПОУГ, определенные на основе анализа протеомных данных.

Чтобы завершить анализ глазных тканей, пораженных глаукомой, был проведен анализ протеомных наборов данных, полученных из образцов сетчатки и стекловидного тела, собранных у пациентов с ПОУГ [402,409]. Также проанализировали протеом ТС, полученный из передних сегментов человеческого глаза [410]. Результаты представлены в виде тепловой карты, иллюстрирующей ассоциированные с ПОУГ изменения в содержании анализируемых ферментов в ткани (Рис. 3.60В). Среди 16 белков, принадлежащих к исследованным семействам, экспрессия только двух - PLA2, PLA2G2A и PLA2G4B, была увеличена в глаукоматозной сетчатке. Интересно, что PLA2G2A и PLA2G4C были также повышены в стекловидном теле. Также было снижено содержание эпоксид-гидролазы-1 (EH-1), CYP1B1 и CYP51A1. Следует добавить, что ни один из 16 целевых

белков не был повышен в ТС в модели *ex vivo*, и не было обнаружено изменений в уровнях экспрессии LOX во всех анализируемых тканях (данные не приведены).

Следует отметить связанное с ПОУГ повышение содержания во ВГЖ АА и lyso-PAF. Эти соединения представляют собой побочные продукты гидролиза фосфолипидов (таких как 1-О-алкил-2-ацил-GPC), катализируемого фосфолипазами А2 [411]. Соответственно, анализ протеомных данных выявил такие фосфолипазы (PLA2G2A, PLA2G4B и PLA2G4C) в качестве основного типа сигнальных ферментов липидного метаболизма, повышенных в сетчатке и стекловидном теле пациентов с ПОУГ (Рис. 3.60Б) [402]. Ранее также было показано, что PLA2G2A значительно повышена в других глазных тканях, таких как ТС и конъюнктивы у таких пациентов [412]. Образуюсь в рамках одного и того же пути, АА и Lyso-PAF могут вызывать различные физиологические эффекты. Lyso-PAF ацетируется ацетилтрансферазами Lyso-PAF, образуя физиологически активный PAF, который вызывает агрегацию тромбоцитов и воспалительные реакции через активацию соответствующих рецепторов [411]. PAF, по-видимому, играет важную роль в глазном воспалении и глаукоме [413], он способствует развитию глазной гипертензии и может способствовать повреждению ГКС через усиление высвобождения глутамата и увеличению токсичности в сетчатке [414]. АА, напротив, проявляет защитные эффекты в отношении ГКС и может перерабатываться СОХ с образованием PG, которые увеличивают отток ВГЖ как через ТС, так и через увеосклеральные пути [393,415].

В целом, увеличение содержания повышающих ВГД и цитотоксических медиаторов PAF и 12,13-DiHOME, а также оксипинов NODE/KODE, связанных с окислительным стрессом, представляют собой часть патофизиологической картины ПОУГ, проявляющейся в сигнальном липидоме ВГЖ.

Выявленные липидные медиаторы могут рассматриваться как специфические биомаркеры глаукомы, тем более что их сходные паттерны были обнаружены в СЖ, который можно собрать у пациентов с помощью неинвазивной процедуры. Направленное модулирование сигнальных путей с участием этих липидов может дать новое представление о лечении глаукомы. Следует отметить, что аналоги простагландинов, широко применяемые в терапии ПОУГ, ингибируют активность PAF [416], что может объяснять их активность по снижению ВГД. Выявленное увеличение

12,13-DiНОМЕ может быть подавлено с помощью новых ингибиторов ЕН, которые в настоящее время предлагаются в качестве фармакотерапии различных глазных заболеваний [417]. Наконец, полученные результаты подтверждают роль окислительного стресса при ПОУГ и дают дополнительное обоснование для включения антиоксидантов в комплексную терапию этого заболевания [408].

### **3.3.3 Профили оксипинов в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона**

Болезнь Паркинсона (БП) — это дегенеративное заболевание центральной нервной системы, которым страдают более 4 млн. человек во всем мире [418]. Хотя известно большое количество молекулярных механизмов, участвующих в патогенезе БП, таких как агрегация  $\alpha$ -синуклеина, окислительный стресс, генетические мутации, дисфункция митохондрий и нейровоспаление (см. обзор [419]), взаимосвязь между ними остается неясной.

В соответствии с клиническими проявлениями выделяют несколько стадий, характеризующие тяжесть заболевания [420]. В ряде работ показана взаимосвязь отдельных липидов, в том числе оксипинов, с различными процессами, проявляющимися при болезни Паркинсона, (обзор последних работ [421]). Обширные данные, полученные в клинических исследованиях и при изучении животных моделей, также подтверждают участие воспаления в возникновении и прогрессировании БП (см. обзор [422]). Остается неясным, в какой степени профили оксипинов могут отражать различные стадии заболевания, поэтому нами была исследована плазма крови 73 пациентов (группа БП) и 36 здоровых добровольцев (группа КГ). Клиническое исследование на людях было проведено на базе научного центра неврологии. Также было оценено, насколько эти профили могут коррелировать с изменениями транскриптома головного мозга пациентов с БП, ранее опубликованными в открытых базах данных. Это позволило оценить, отражают ли изменения концентрации оксипинов изменения экспрессии соответствующих генов в ткани мозга, или же профили оксипинов являются независимой характеристикой заболевания и его стадий. При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [96].

## Клинические характеристики

Антропометрические и демографические параметры включенных в исследование лиц представлены в Таблице 3.10. В целом, по шкале Hoehn and Yahr, 8 пациентов находились на I стадии заболевания, 21 - на II, 41 - на III и 3 - на IV.

**Таблица 3.10.** Демографические параметры пациентов и стадии заболевания.

	Пациенты с болезнью Паркинсона (n = 73)		Контрольная группа (n = 36)	
	Среднее	СО	Среднее	СО
Возраст [лет]	59	9,2	54	15
Индекс массы тела (ИМТ)	27,1	4,3	26,8	3,3
Пол				
Мужской	41		12	
Женский	32		24	
Шкала Хен и Яра				
I	8			
II	21			
III	41			
IV	3			
Возраст начала заболевания				
<55	42			
>55	31			

## Выявление измененных ПНЖК и оксипинов у пациентов с болезнью Паркинсона.

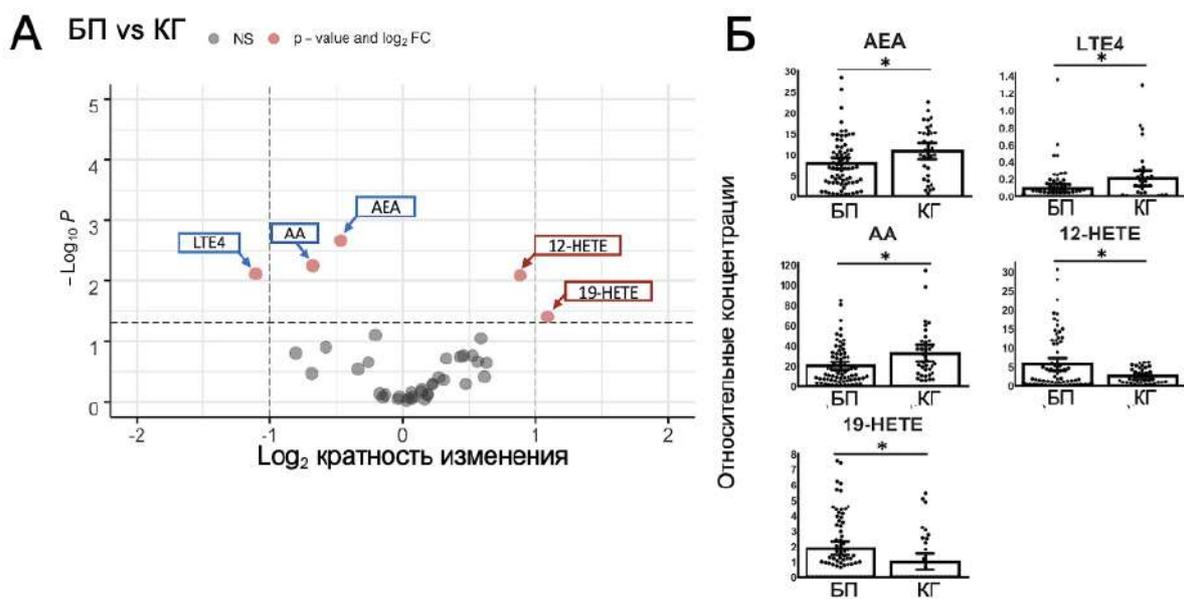
Всего в плазме крови человека детектировали 40 метаболитов, которые принадлежат к различным классам липидов: 3 ПНЖК (АА, ДНА и эйкозапентаеновая (ЕРА)), 19 производных АА, 6 производных ДНА, 1 производное  $\alpha$ -линоленовой кислоты (АЛА), 1 производное дигомо- $\gamma$ -линоленовой кислоты (DGLA), 2 производных ЕРА, 6 производных линолевой кислоты (LA) и не являющиеся ПНЖК соединения олеиновой кислоты (ОЕА) и lyso-PAF.

Сравнили, коррелирует ли более высокий индекс массы тела (ИМТ) с концентрацией оксипинов. Корреляции между ИМТ и концентрацией оксипинов не наблюдалось.

Поскольку распределение мужчин и женщин в изучаемых когортах пациентов было неравномерным - в группе с болезнью Паркинсона было больше мужчин, а в группе здорового контроля - больше женщин (Таблица

3.10), сравнили коррелируют ли пол с концентрацией оксилипинов. При анализе группы здоровых пациентов были выявлены незначительные изменения (ОЕА, АЕА и 8-НДоНЕ повысились, а ЕРА снизился при сравнении Ж vs М), в группе с болезнью Паркинсона снизился только 15-НЕТrЕ а (Ж vs М) (см. Приложение Г, Рис. Г.1).

Для оценки отдельных метаболитов, различающихся в группах БП и КГ, были проведены попарные сравнения нормализованных концентраций метаболитов (см. Приложение Г, Рис. Г.2). Полученные результаты были проиллюстрированы с помощью вулканной диаграммы с поправкой Хольма-Бонферрони (Рис. 3.61А). Было выявлено 5 метаболитов с существенно изменившимися концентрациями. Гистограммы относительных концентраций указанных соединений представлены на (Рис. 3.61Б). Наблюдалось снижение концентрации производных АА: АЕА, лейкотриена Е4 (LТЕ4), АА и увеличение концентрации гидроксизйкозатетраеновых кислот 19-НЕТЕ и 12-НЕТЕ (Рис. 3.61Б) в образцах плазмы крови больных БП по сравнению с КГ. Это имеет смысл в контексте ранее известных данных о патологии болезни Паркинсона. Следует отметить, что снижение концентрации арахидоновой кислоты было показано в качестве прогностического биомаркера БП при сравнении исходных доклинических образцов плазмы 39 случайно отобранных лиц, у которых развилась БП (группа Pre-PD), и соответствующей контрольной группы [423]. Наблюдаемое снижение концентрации АЕА представляет особый интерес, поскольку модуляция эндоканнабиноидной системы в настоящее время обсуждается в контексте терапии болезни Паркинсона [424]. Синтез анандамида, по-видимому, связан с дофамином и регулируется дофаминергическими D2-рецепторами в стриатуме [425]. Ранее также было показано, что концентрация АЕА снижена в плазме крови пациентов с БП [102]. Увеличение концентрации -НЕТЕ, показанное нами, а также другими авторами [101], может свидетельствовать о связи окислительного повреждения с возникновением и прогрессированием БП.



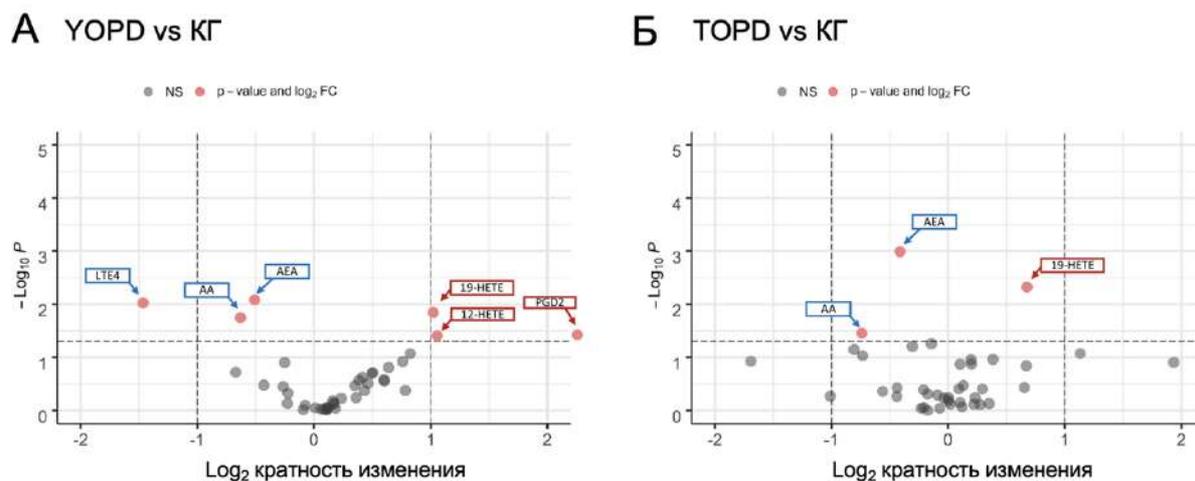
**Рис. 3.61. Изменения концентрации оксипинов у больных БП.** (А) Вулканная диаграмма с указанием достоверно измененных соединений. По оси X показано log<sub>2</sub>-кратное изменение по сравнению с КГ. По оси Y указаны р-значения  $-\log_{10}$  (с поправкой). Отсечение для р-значений указано с учетом поправки Бонферрони. Соединения, которые изменились незначительно, выделены серым цветом. Красными точками обозначены соединения, для которых  $p < 0,05$ . (Б) Относительная концентрация метаболитов АЕА, LTE4, АА, 12-НЕТЕ и 19-НЕТЕ в образцах плазмы крови при БП по сравнению с КГ,  $p < 0,05$ .

### Возраст начала болезни Паркинсона и корреляция с концентрацией оксипинов.

Далее оценили, коррелирует ли концентрация оксипинов с возрастом начала БП у пациентов. Болезнь Паркинсона обычно развивается в возрасте 55-65 лет [426] Выборка пациентов была разделена на 2 группы: пациенты с началом болезни в возрасте до 55 лет были определены как молодые (до 55 лет (YOPD), 41 пациент), а пациенты в возрасте старше 55 лет - как типичные (после 55 лет (TOPD), 30 пациентов). Для оценки отдельных метаболитов, различающихся между YOPD и TOPD, провели попарное сравнение нормализованных концентраций метаболитов. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью вулканной диаграммы с поправкой Хольма-Бонферрони (Рис. 3.62).

При сравнении YOPD с КГ концентрации 19-НЕТЕ, 12-НЕТЕ и простагландина D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) были значительно повышены, а концентрации АЕА, LTE4 и АА - снижены (Рис. 3.62А). Гистограммы относительных концентраций указанных соединений представлены в Приложении Г, Рис. Г.3. При анализе группы TOPD также обнаружили увеличение содержания

19-НЕТЕ и снижение АЕА и АА (Рис. 3.62Б). При попарном сравнении YOPD и TOPD статистически значимо выше была только дигидрокси-октадеценовая кислота (9,10-DiHOME). Можно предположить, что возраст начала заболевания не оказывает существенного влияния на профиль оксипинов в анализируемых когортах пациентов.



**Рис. 3.62. Изменение концентрации оксипинов у пациентов с разным возрастом начала БП.** Вулканная диаграмма с указанием соединений, концентрация которых существенно изменилась. По оси X показано изменение в  $\log_2$ -кратном отношении концентрации TOPD (Б, после 55 лет) и YOPD (А, до 55 лет) к концентрации у пациентов с КГ. По оси Y указаны р-значения  $-\log_{10}$  (с поправкой). Отсечение для р-значений указано с учетом поправки Бонферрони. Соединения, которые изменились незначительно, выделены серым цветом. Красными точками отмечены соединения, для которых  $p < 0,05$ .

### Стадии заболевания по шкале Хен и Яра, корреляция с концентрацией оксипинов.

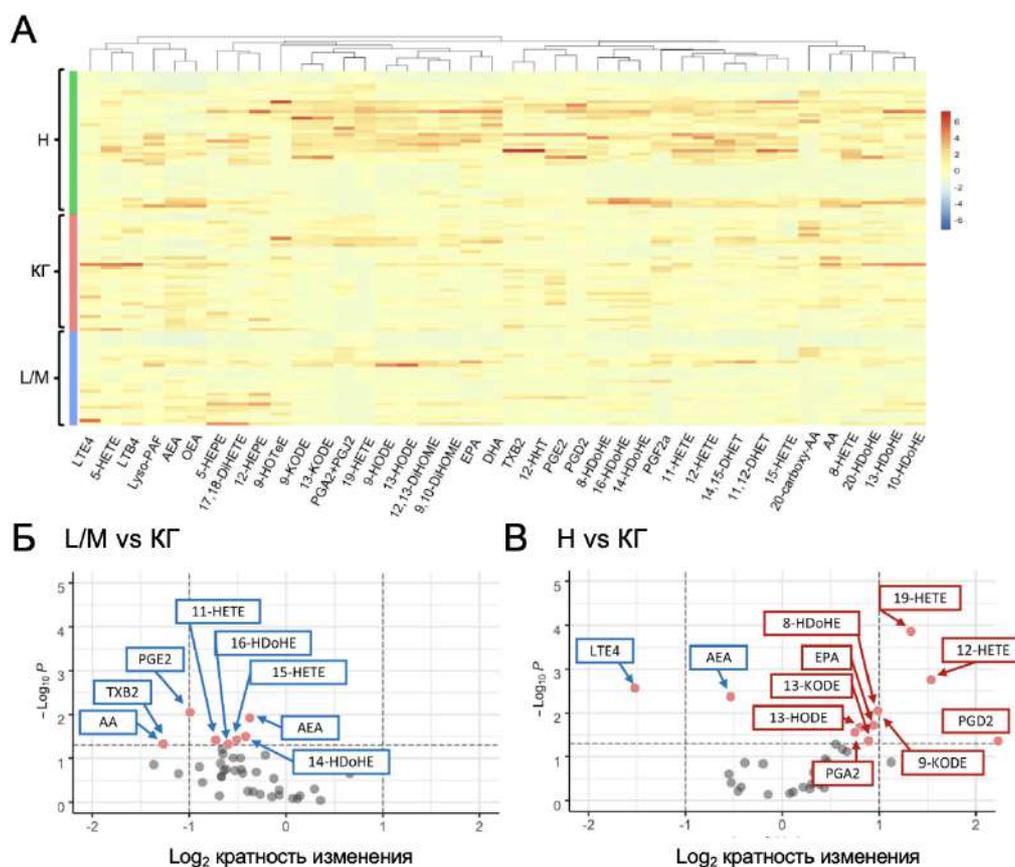
На следующем этапе проанализировали, коррелируют ли изменения концентрации оксипинов со стадией заболевания у конкретного пациента. Больные БП с I-II стадиями по шкале Хен и Яра были отнесены к ранним стадиям (L/M), а с 3-4 стадиями - к поздним (Н). Сравнивали 29 пациентов с L/M и 44 пациента с Н-стадией.

Полученные данные представлены в виде тепловой карты, на которой по вертикальной оси отмечены пациенты, а по горизонтальной - относительное количество каждого липидного медиатора (Рис. 3.63А). Сверху для метаболитов показаны дендрограммы. Цветная полоса слева указывает, к какой группе относится пациент: Н (зеленый), КГ (красный) или L/M (синий). В группе пациентов Н наблюдались более выраженные изменения профилей оксипинов по сравнению с КГ (Рис. 3.63А).

Для оценки отдельных метаболитов, различающихся в группах L/M и КГ или Н и КГ, были проведены попарные сравнения нормализованных концентраций метаболитов. Полученные результаты были проиллюстрированы с помощью вулканной диаграммы с поправкой Хольма-Бонферрони (Рис. 3.63Б, В). При сравнении L/M с КГ не было значительного повышения концентрации метаболитов, одновременно наблюдали снижение концентрации широкого спектра метаболитов, в том числе АА, пяти метаболитов, образующихся из АА (АЕА, ТХВ<sub>2</sub>, РGE<sub>2</sub>, 15-НЕТЕ и 11-НЕТЕ) и двух метаболитов, образующихся из DHA (14-НDoHE и 16-НDoHE) (Рис. 3.63Б). Сравнение Н с КГ выявило снижение концентрации АЕА, LTE<sub>4</sub> и повышение концентрации четырех производных АА (19-НЕТЕ, 12-НЕТЕ, PGD<sub>2</sub> и PGA<sub>2</sub>+PGJ<sub>2</sub>), одного производного DHA (8-НDoHE), трех производных LA (9-KODE, 13-KODE и 13-HODE) и EPA (Рис. 3.63С). Гистограммы относительных концентраций указанных соединений представлены в Приложении Г, Рис. Г.4.

Различия между профилями оксипинов на ранних и поздних стадиях особенно очевидны при сравнении групп Н и L/M. Значительно различались концентрации 20 соединений: ПНЖК АА и DHA; 12 АА-производных метаболитов (19-/11-/12-/15-/8-НЕТЕ, 11,12-/14,15-DHET, PGA<sub>2</sub>+PGJ<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, ТХВ<sub>2</sub>, 12-ННТ, PGF<sub>2α</sub>; 4 метаболита DHA – 8-/14-/16- и 20-НDoHE); 1 метаболит 15-НЕТrE, полученный из ALA, и 1 метаболит 9-KODE, полученный из LA (см. Приложение Г, Рис. Г.4).

В целом ВЭЖХ-МС/МС-анализ образцов плазмы крови больных БП показал, что группа поздних стадий имеет характерные маркеры (снижение концентрации LTE<sub>4</sub> и повышение концентрации 19-НЕТЕ), а группа L/M характеризуется также уникальным набором и снижением синтеза оксипинов в целом.



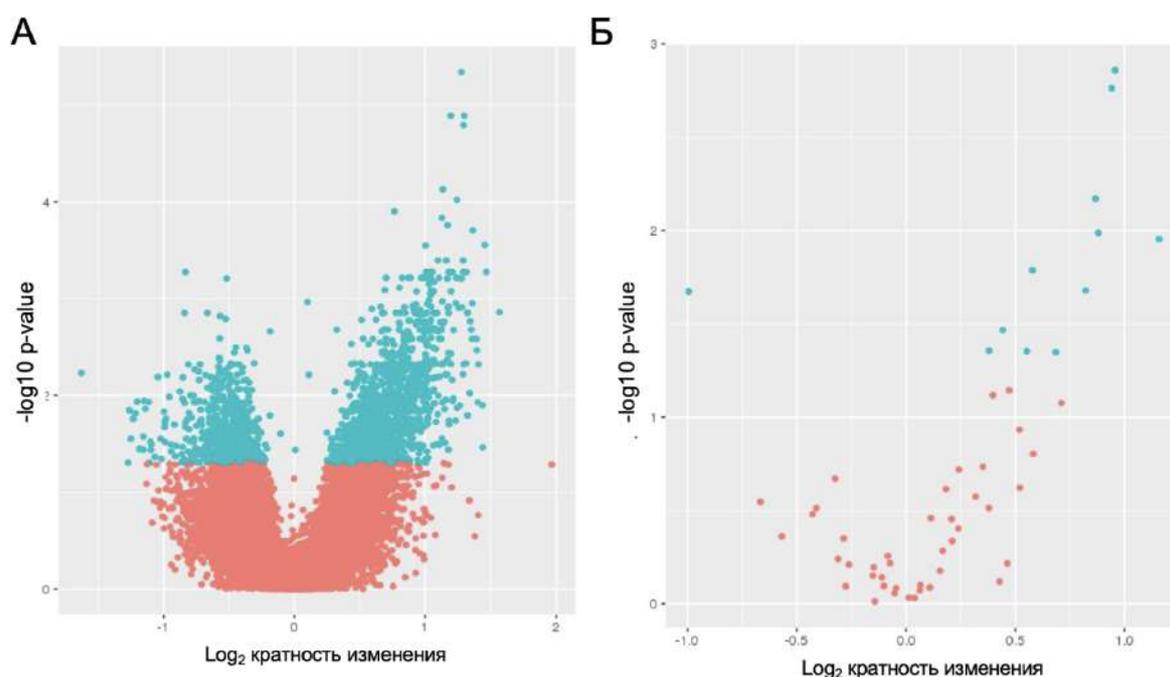
**Рис. 3.63.** Стадии БП по шкале Noehn and Yahr - корреляция с концентрацией метаболитов оксилипинов в плазме крови. (А) Карта кластеризованных изображений построена с использованием евклидова расстояния и алгоритма полной кластеризации связей. Н - пациенты с 3-4 стадией Noehn-Yahr, КГ - здоровый контроль, L/M - пациенты с 1-2 стадией Noehn-Yahr. На рисунке каждая запись матрицы окрашена в соответствии с ее значением; строки представляют метаболиты, столбцы - испытуемых. Дендрограммы показаны слева (для пациентов) и сверху (для метаболитов). (Б,В) Графики вулканов, показывающие значительные изменения соединений. По оси X указано изменение в 2 раза, по оси Y - р-значения (с поправкой), равные  $-\log_{10}$ . Отсечение для р-значений указано с учетом поправки Бонферрони. Соединения, которые изменились незначительно, выделены серым цветом. Красными точками отмечены соединения, для которых  $p < 0,05$ .

### ДЭГ в наборах данных тканей ВА9 при БП по сравнению с КГ.

Далее был проведен транскриптомный анализ, чтобы выяснить, могут ли изменения концентрации оксилипинов в крови напрямую отражать изменения их метаболизма в тканях мозга. С помощью программы ARGEOS [241] был составлен список доступных наборов данных РНК-секвенирования. При отборе наборов данных использовали следующие критерии: наличие контрольных образцов и образцов с БП, люди, тотальная/полиА РНК, более 10 образцов, свободный доступ, материал,

полученный непосредственно от пациентов. Этим критериям соответствовал только один набор данных GSE68719 (посмертные образцы тканей зоны Бродмана 9 (BA9), 29 пациентов с БП и 44 КГ).

При анализе использовали список из 185 генов каскада ПНЖК, который был нами предложен ранее [427]. Всего из 2024 идентифицированных дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ) (Рис. 3.64А) 25 могут быть отнесены к генам метаболизма ПНЖК (Рис. 3.64Б). Получено, что увеличилась экспрессия 21 гена - ряда цитохромов CYP2S1, CYP21A2, десатураз FADS2, FADS3, дегидрогеназы ACADVL, генов липоксигеназ ALOX5, ALOX5AP, ALOX12, гамма-глутамилтрансферазы 5 (GGT5), лигазы ACSL5, эпоксид-гидролазы EPHX1, нескольких фосфолипаз PLA1A, PLCD1, PLCG1, PLCB2, PLCB3, PLCD3, PLD2, рецептора OXER1 и генов, участвующих в биосинтезе анандамида INPP5D, AVHD4. Снизилась экспрессия 4 генов - дегидрогеназы HSD17B12, лигазы ACSL4, PLA2G12A и NAPEPLD (см. Приложение Г, Таблица Г.1).



**Рис. 3.64.** Вулканные диаграммы, показывающие существенно измененные гены. По оси Y указаны р-значения  $-\log_{10}$  (с поправкой). По оси X указано изменение экспрессии в 2 раза у пациентов с БП.

Полученные нами данные по изменению профиля оксипинов (снижение АЕА у пациентов с БП и повышение НЕТЕ) совпадают [101,102] или отличаются (повышение LTV<sub>3</sub>, Lyso-PC, АА, снижение 12-НЕТЕ)

[95,100] с результатами, опубликованными в других исследованиях. Существует несколько возможных объяснений этих расхождений, связанных с характером получения данных в таких исследованиях. Прежде всего, известно, что БП является крайне гетерогенным заболеванием, характеризующимся несколькими стадиями [426]. Количество пациентов/доноров в исследованиях или количество пациентов на каждой из стадий заболевания может влиять на результаты тестирования. Например, в одном из опубликованных исследований [100] было 28 пациентов и 18 доноров, в другом [101] соотношение БП/КГ составило 61/61, а в нашем исследовании – 73/36. В нашем исследовании было больше пациентов с поздними стадиями заболевания, чем с ранними (29 пациентов с ранней стадией БП и 44 пациента с поздней стадией БП), в то время как в других работах выборка пациентов смещена в сторону ранних стадий заболевания (31 пациент с ранней стадией БП и 11 пациентов с поздней стадией БП) [95].

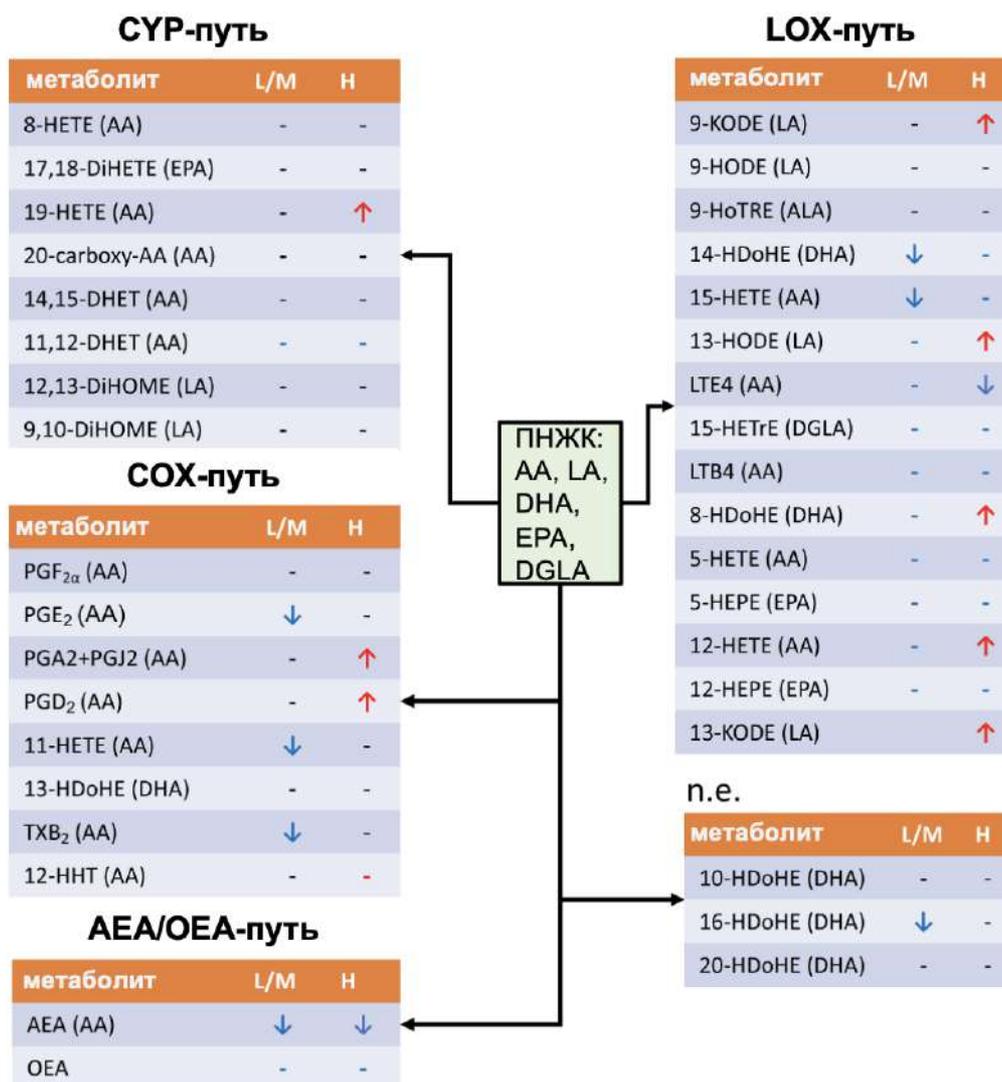
Во-вторых, возможны тонкие различия в протоколах отбора и подготовки проб. Например, в исследовании [95] для подготовки плазмы использовались пробирки с К2-ЭДТА, в то время как в данном исследовании использовались пробирки с гепарином. Хотя ранее было показано, что точные измерения большинства оксипинов могут быть получены как из хранящихся образцов плазмы с ЭДТА, так и из гепарином, выбор пробирок может влиять на стабильность и последующее определение оксипинов [428].

В-третьих, на профиль оксипинов может влиять окружающая среда, образ жизни или генетическое разнообразие пациентов или здоровых доноров. Так, работы Zhang и соавторов [95] и Zhao и соавторов [100] были проведены в Китае, Seet с соавторами [101] анализировали клинические образцы из Национального госпиталя Сингапура, а Klatt-Schreiner и соавторы [102] исследовали образцы пациентов из Германии и Израиля. В нашем исследовании анализировались образцы плазмы пациентов из России. Известно, что различия в образе жизни и окружающей среде влияют на эпидемиологию БП [429]. Влияние диет на прогрессирование заболеваний тоже описано [430], однако до сих пор нет понимания того, как развиваются системные заболевания на фоне различных диет.

Поскольку болезнь Паркинсона имеет неврологическую природу, постоянно возникает вопрос о том, насколько концентрация оксипинов в крови отражает изменения, происходящие в головном мозге. Для ответа на

этот вопрос были проанализированы изменения в генах, участвующих в метаболизме оксипинов, используя один из общедоступных наборов данных. Хотя ряд транскриптов был идентифицирован как репрезентативные ДЭГ, прямого соответствия с данными об изменении концентрации оксипинов в плазме крови обнаружено не было. Следует отметить, что концентрация оксипинов в крови отличается при различных неврологических и аффективных расстройствах (Таблица 1.2 Литобзор п.1.3.2), хотя на уровне транскриптов генов мозговой ткани наблюдается сходство между этими заболеваниями [431]. Полученные данные подтверждают предположение о том, что оксипины крови отражают общие изменения в системе врожденного иммунитета на уровне всего организма.

Использованный нами подход с разделением больных по стадиям заболевания на группы L/M и H и сравнение групп с контролем (КГ) позволил выявить важную характеристику системы оксипинов в развитии заболевания. Полученные нами данные свидетельствуют о различиях между ранней (группа L/M) и поздней (группа H) стадиями заболевания. Инфографика полученных результатов представлена на (Рис. 3.65). Обнаруженные оксипины разделены на пути в соответствии с общепринятой классификацией, основанной на ключевом ферменте в данном метаболическом каскаде (COX-путь, CYP-путь, LOX-путь, АЕА/ОЕА-путь и неферментативный путь (n.e.)) (см. Литобзор п.1.1). В скобках для каждого метаболита указаны ПНЖК (АА, ДНА, LA, ALA и др.) как исходные субстраты для каждого метаболического каскада.



**Рис. 3.65.** Диаграмма профилей оксипинов плазмы крови пациентов с ранней (L/M) и поздней (H) стадиями БП. Изменения на каждой стадии представлены в сравнении с контролем. Отмечены циклооксигеназные (COX), липоксигеназные (LOX), цитохром P450 монооксигеназные (CYP450) ветви, а также анандамидный (AEA) путь и неферментативные превращения ПНЖК. Увеличение концентрации анализируемых оксипинов отмечено красной стрелкой вверх, а уменьшение концентрации - синей стрелкой вниз соответственно.

В группе L/M наблюдалось снижение метаболитов AA, синтезируемых через COX (PGE<sub>2</sub>, 11-HETE, TXB<sub>2</sub>) и LOX (15-HETE), а также снижение метаболитов DHA, синтезируемых через LOX (14-HDoHE) или неферментативный (16-HDoHE) пути (Рис. 3.65). Действительно, активация COX-пути ассоциируется с развитием воспаления, связанного с БП [432]. Возможным объяснением этого является активное функционирование противовоспалительных компенсаторных механизмов на ранних стадиях БП. Интересно, что синтезируемые LOX 14-HDoHE и 15-

НЕТЕ относят к противовоспалительным соединениям [123,433]. Можно предположить, что в группе L/M происходит ослабление вклада всех оксипинов в поддержание гомеостаза иммунной системы. В группе Н наблюдалось увеличение синтеза метаболитов, синтезируемых через CYP (19-НЕТЕ), COX (PGD<sub>2</sub>, PGA<sub>2</sub> и PGJ<sub>2</sub>) и LOX-пути (9-KODE, 13-HODE, 8-HDoHE, 12-НЕТЕ и 13-KODE). Снижение концентрации LTE<sub>4</sub> наблюдалось только в группе Н, а АЕА - как в группе Н, так и в группе L/M.

Снижение синтеза отдельных производных на стадии L/M отличается от повышения синтеза на стадии Н (Рис. 3.65), т.е. изменения происходят не на уровне отдельных веществ, а всей метаболической системы оксипинов. Тот факт, что производные COX и LOX ведут себя сходным образом (снижение синтеза на ранних стадиях и увеличение на высоких) (Рис. 3.65), свидетельствует о том, что ингибиторы этих ветвей метаболизма ПНЖК могут быть активны только на поздних стадиях.

Ингибиторами COX являются нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), такие как аспирин, ибупрофен и др. В некоторых эпидемиологических исследованиях сообщалось о защитной роли противовоспалительных средств при развитии БП [434,435], в то время как в других не было выявлено никаких эффектов, и отмечалось, что применение НПВС не связано с повышенным риском развития болезни Паркинсона [436]. В то же время показано, что снижение нейровоспаления у пациентов с БП может замедлить прогрессирование симптомов заболевания [437]. Недавно было показано, что ликофелон, двойной ингибитор путей COX/5-LOX, обладает нейропротекторными свойствами в центральной нервной системе [438]. Он предложен в качестве потенциальной терапии патологий, связанных с нейровоспалением [438]. Полученные данные подтверждают эти предположения, но только для поздних стадий БП, поскольку на более ранних стадиях ингибиторы синтеза оксипинов могут быть губительны.

Полученные результаты показывают, что воспалительные процессы на уровне синтеза оксипинов активируются по мере прогрессирования БП. Таким образом, представляется перспективным добавление ингибиторов ферментов, ответственных за синтез оксипинов (COX и LOX), к стандартной терапии БП в отдельных когортах с III-IV стадиями по шкале Хен и Яра, поскольку потенциально они могут способствовать уменьшению нейровоспаления и замедлению прогрессирования БП за счет изменения профиля оксипинов. С другой стороны, на более ранних и

средних стадиях заболевания может быть перспективным использование добавок с оксипиринами, таких как анандамид или производных DHA, способствующих разрешению воспаления. К примеру, было показано, что резолвин D1 предотвращает развитие патологии БП на ранних стадиях заболевания у крыс [439]. В целом данные свидетельствуют о том, что нарушения синтеза оксипиринов отражают изменения, происходящие в организме по мере прогрессирования заболевания.

Таким образом, анализ профилей оксипиринов в плазме крови пациентов с Болезнью Паркинсона (БП), разделенных на раннюю и позднюю стадии на основании шкалы Хен-Яра и сравнение их с профилями контрольной группой показал, что воспалительные процессы, связанные с метаболизмом оксипиринов, активируются по мере прогрессирования заболевания: на начальных стадиях концентрации COX/LOX производных AA и LOX-производных DHA снижались, при тяжелой стадии наблюдалось увеличение синтеза AA-производных по COX-пути и LA-производных по LOX пути.

#### **3.3.4. Профили оксипиринов в плазме крови при раке молочной железы**

Целью исследования было выявить изменения в метаболизме оксипиринов как характеристики больных раком молочной железы. Сравнили профиль оксипиринов в плазме крови 152 здоровых добровольцев (КГ) и 169 пациентов с различными стадиями рака молочной железы (РМЖ). Для интеграции данных липидомики, транскриптомики и геномики проанализировали транскриптом 10 открытых наборов данных, полученных из тканей и клеток крови пациентов с РМЖ, и данные ОНП для 33 генов, связанных с метаболизмом оксипиринов. При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [440].

Рассмотрение рака как системного заболевания, включающего взаимодействие между трансформированными раковыми клетками и окружающим микроокружением, а также как реакции всего организма на нарушение системы врожденного иммунитета, в настоящее время находится в центре внимания исследователей (см. Литобзор п. 1.3.1). Воспаление и нестабильность генома лежат в основе основных признаков рака [64]. Ранее была показана роль отдельных оксипиринов в развитии

опухоли (см. обзор [69]). Исследования были сосредоточены на эйкозаноидах, вырабатываемых раковыми клетками или их микроокружением, в основном производные арахидоновой кислоты (АА), образующиеся по СОХ пути биосинтеза оксипинов (PGE<sub>2</sub> и др.) [69]. Взгляд на оксипины как на часть врожденного иммунитета, отвечающего за гомеостаз организма после нарушений, поставил новые задачи, связанные с измерением профилей оксипинов.

РМЖ является основной причиной смерти от рака среди женщин во всем мире. Он возникает из клеток железистого эпителия молочной железы и является чрезвычайно гетерогенным заболеванием. Гетерогенность наблюдается как внутри опухоли, полученной от одного пациента, так и между пациентами. Этот фактор определяет риск прогрессирования заболевания и его устойчивость к терапии [441]. Патогенез РМЖ до сих пор остается неизвестным, наряду с проблемой ранней диагностики, которая является залогом успешной терапии. Для решения этих вопросов предлагаются современные подходы в геномике [442], транскриптомике [443] и метаболомике [444]. Хотя метаболомика может считаться полезным инструментом в диагностике ранней стадии РМЖ [444], данных об использовании профилей оксипинов для этих целей мало.

Мы нашли три работы, в которых были определены профили оксипинов пациентов с РМЖ [76, 445, 446]. Профили оксипинов образцов плазмы ограниченной группы больных РМЖ без данных о стадиях заболевания и другой важной информации о пациентах [76] или профили оксипинов в опухолевых тканях больных РМЖ [445,446] показывают лишь возможность перспективных результатов, но не отвечают на вопрос о возможности нарушения состава оксипинов крови отражать патологию РМЖ. Поэтому сравнивали характерные особенности профиля оксипинов плазмы крови у больных РМЖ (n = 162) и здоровых добровольцев (n = 153). Клиническое исследование было проведено совместно с Московским научно-исследовательским онкологическим институтом им. П.А. Герцена.

### **Клиническая характеристика.**

В исследовании приняли участие 169 пациентов с РМЖ и 152 пациента из КГ. Антропометрические и демографические параметры включенных в исследование лиц представлены в таблице 3.11. В целом, 53

пациента имели подтип LumA, 87-Lum B (включая 5 HER2+), 4 HER2+, 10 TN и 15 неустановленных подтипов.

**Таблица 3.11.** Демографические параметры пациентов и характеристики заболевания.

<b>Пациенты с РМЖ (n = 169)</b>		
	<b>Среднее</b>	<b>СО</b>
Возраст [лет]	54,5	12,6
Индекс массы тела (ИМТ)	26,8	5,8
		<i>n</i>
Стадия рака	0	12
	I	118
	IIA	31
	IIB	8
Молекулярный подтип	LumA	53
	LumB	82
	LumB, Her2+	5
	Her2+	4
	TN	10
	-	15
<b>Контрольная группа (n = 152)</b>		
	<b>Среднее</b>	<b>СО</b>
Возраст [лет]	49,8	10,1
Индекс массы тела (ИМТ)	27,3	5,2

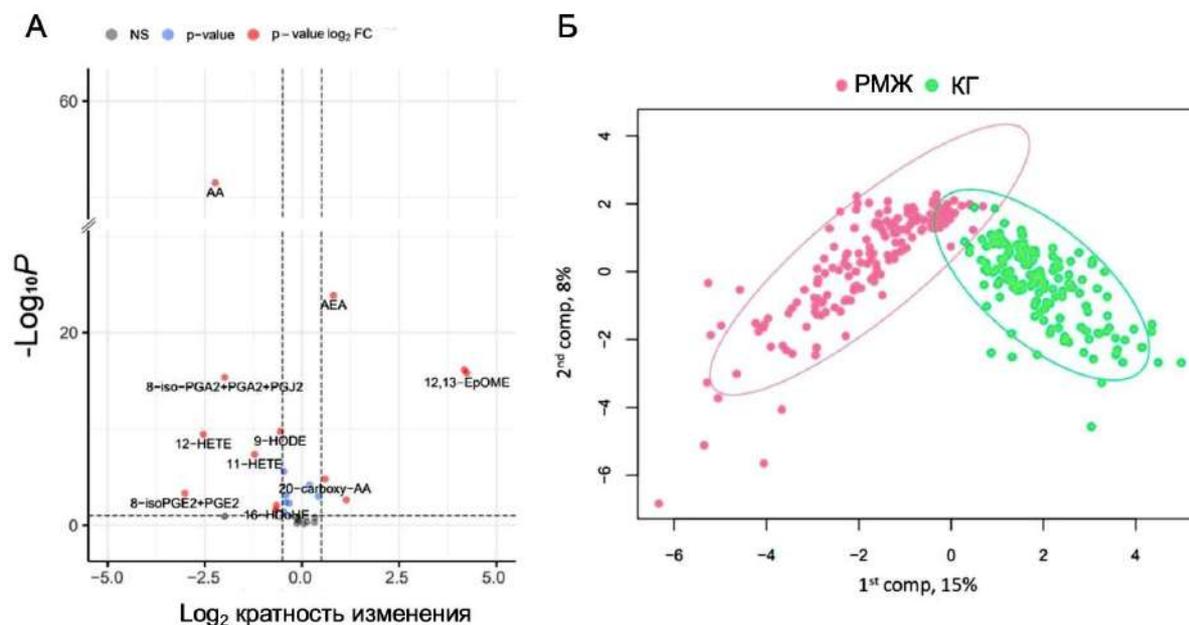
Аббревиатуры: LumA - люминальный A, LumB - люминальный B, HER2+ - человеческий эпидермальный фактор роста рецептор 2 (HER2) положительный рак молочной железы, TN - трижды негативный рак молочной железы.

### **Выявление измененных ПНЖК и оксипинов у здоровых доноров и пациентов с раком молочной железы**

Было обнаружено в общей сложности 34 метаболита в плазме крови человека. Метаболиты принадлежали к различным классам липидов: 4 ПНЖК (AA, DHA, дигомо- $\gamma$ -линоленовая кислота (DGLA) и EPA), 14 производных AA, одно производное DGLA, 4 производных DHA, 1 производное  $\alpha$ -линоленовой кислоты (ALA), 2 производных EPA, 7 производных линолевой кислоты (LA) и соединение олеиновой кислоты (OEA), не являющееся производным ПНЖК.

Для оценки отдельных метаболитов, различающихся между группами РМЖ и КГ, провели попарные сравнения нормализованных концентраций метаболитов. Результаты проиллюстрированы с помощью вулканной

диаграммы с поправкой Хольма-Бонферрони (Рис. 3.66А). Выявлено 18 метаболитов с существенно измененными концентрациями (Таблица 3.12). Гистограммы относительных концентраций указанных соединений представлены в Приложении Д, Рис. Д.1.



**Рис. 3.66** Изменение концентрации оксипинов у пациентов с РМЖ по сравнению с КГ. (А) Вулканная диаграмма, показывающая значительно измененные соединения. Ось Х указывает на  $\log_2$  кратности изменения соединений у пациентов с РМЖ по сравнению с КГ. Ось Y показывает  $-\log_{10}$  р-значения (скорректированные). Отсечение для р-значений указано на основе поправки Бонферрони. Соединения, изменившиеся незначительно, обозначены серым цветом. Красными точками отмечены соединения, которые изменились более чем в два раза и имели  $p < 0,05$ . (Б) Модель PLS-DA, дискриминирующая группы КГ и РМЖ. Объясненная дисперсия каждого компонента указана в скобках на соответствующей оси.

**Таблица 3.12.** Сводная информация о 18 идентифицированных метаболитах и их статистических значениях.

Метаболит	$\log_2 FC$	ПНЖК	р-значение
AA	-2,2	AA	2,893548e-52
5-HETE	5,1	AA	7,575180e-39
15-HETrE	6,0	DGLA	1,448791e-35
AEA	0,8	AA	1,387907e-24
11-HDoHE	5,2	DHA	1,940721e-18
9,10-EpOME	4,2	LA	7,414864e-17
12,13-EpOME	4,2	LA	1,554750e-16
PGA <sub>2</sub> +PGJ <sub>2</sub>	-2,0	AA	4,461561e-16
9-HODE	-0,6	LA	1,883501e-10
12-HETE	-2,5	AA	3,520998e-10

11-HETE	-1,2	AA	4,466121e-08
LXA5 (15-HEPE)	-6,15	EPA	8,651793e-06
20-carboxy-AA	0,6	AA	1,564957e-05
13,14-dihydro-15-keto-PGF <sub>2α</sub> (PGFM)	-5,4	AA	2,201848e-04
PGE <sub>2</sub>	-3,0	AA	4,969367e-04
Resolvin-D1	1,1	DHA	2,209084e-03
16-HDoHE	-0,7	DHA	8,448198e-03
20-HDoHE	-0,7	DHA	2,689864e-02

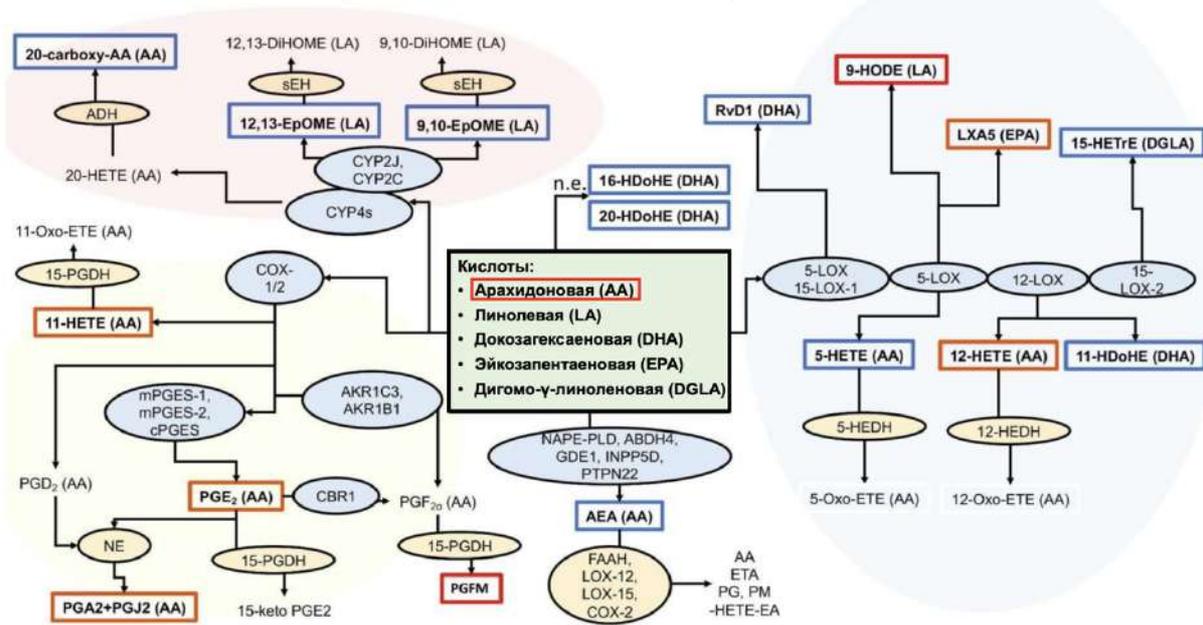
Для проверки, можно ли различать пациентов с РМЖ и КГ на основе концентрации оксилипинов, проведен PLS-DA анализ. Модель оценивали с помощью перекрестной валидации на основе значений общей ошибки, BER и площади под кривой (AUC). Оптимальное число компонентов составило три. Проекция на первые две компоненты представлены на рисунке 3.66Б. Исследуемые группы были разделены с небольшим перекрытием. Для каждого метаболита оценивали показатель VIP. Значение этого параметра отражает объясненную вариацию между классами в каждой проекции. Пять метаболитов (11-HDoHE, 5-HETE, 15-HETrE, AEA и AA) со значениями VIP > 1,5 представлены в таблице 3.13. На Рис. 3.67 представлена схема биосинтеза измененных при сравнении пациентов с РМЖ и КГ оксилипинов.

**Таблица 3.13.** Оценки важности переменных в прогнозе (VIP) для пяти метаболитов. Для отбора VIP установлено значение отсечки 1,5.

Соединение	11-HDoHE*	5- HETE*	15-HETrE*	AEA*	AA*
<b>VIP-баллы</b>	1,518144	2,068291	2,007403	1,621081	2,309511

\* p < 0,05 (с поправкой на множественное тестирование).

### Сравнение оксипинов пациентов с РМЖ и КГ



**Рис. 3.67.** Схема профилей оксипинов при раке молочной железы и у здоровых контрольных доноров. Отмечены ветви циклооксигеназы (COX), липоксигеназы (LOX), монооксигеназы цитохрома P450 (CYP450), а также пути анандамида (AEA) и неферментативные превращения ПНЖК. Анализируемые оксипиновы отмечены красной рамкой для индуцированных в РМЖ и синей рамкой для сниженных в РМЖ образцов.

Выявлено, что синтез AA и ее COX-производных метаболитов, а именно  $PGA_2 + PGJ_2$ , 11-НЕТЕ и  $PGE_2$ , повышен у пациентов с РМЖ (Таблица 3.12, Рис. 3.67). Увеличения  $PGF_{2\alpha}$  не наблюдается, но происходит увеличение его основного метаболита 15-keto-13,14-dihydro- $PGF_{2\alpha}$  (PGFM), который образуется из  $PGF_{2\alpha}$  под действием фермента 15-PGDH [3]. Последний используется как маркер биосинтеза  $PGF_{2\alpha}$  *in vivo*.

Из метаболитов, синтезируемых по LOX пути, наблюдали увеличение 12-НЕТЕ (производное AA), 9-НОДЕ (производное LA) и LXA5 (производное EPA). Наблюдали снижение содержания производного DGLA - 15-НЕТрЕ, производных DHA - резольвина D1 и 11-НДоНЕ, образующихся энзиматически по LOX пути. Интересно, что концентрации производных DHA, образующихся по LOX пути, уменьшились, а концентрации производных 16-НДоНЕ и 20-НДоНЕ, образующихся из DHA неферментативным путем, увеличились.

Из метаболитов, синтезируемых по пути цитохрома P450 (CYP), наблюдали снижение концентрации 9,10-ЕрОМЕ и 12,13-ЕрОМЕ (метаболиты LA). 20-НЕТЕ в плазме не обнаружили, но выявили последовательное снижение 20-карбоксии арахидоновой кислоты (20-

COOH-AA), которая считается производным 20-НЕТЕ, окисленной алкогольдегидрогеназой [447].

Наблюдали снижение содержания эндоканнабиноида АЕА, соединения демонстрирующего противораковые свойства в различных моделях рака, включая рак молочной железы [448]. Действительно, развитие и прогрессирование опухолей может быть связано с нарушениями эндоканнабиноидного баланса [449]. Можно предположить, что спектр действия оксипинов смещен в сторону провоспалительного ответа, поскольку наблюдается увеличение PGE<sub>2</sub>, снижение АЕА и других производных с противовоспалительными свойствами.

### **Корреляция стадии, молекулярного подтипа, индекса массы тела (ИМТ) и биохимических маркеров крови с концентрацией оксипинов**

На следующем этапе сравнили, существует ли корреляция между стадией заболевания пациента, молекулярным подтипом РМЖ, более высоким индексом массы тела (ИМТ) и биохимическими маркерами крови с концентрацией оксипинов. Корреляции между сравниваемыми параметрами не наблюдали (подробно в Приложении Д, Рис. Д.1-Д.5).

### **Геномный и транскриптомный анализ открытых наборов данных, ассоциированных с РМЖ.**

В настоящее время в литературе накоплен большой объем транскриптомных данных пациентов с РМЖ и доказательств наличия патологически значимых однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), ассоциированных с РМЖ, что позволяет сопоставить данные, полученные при метаболомном анализе, и соответствующие изменения на геномном уровне. Известно, что экспрессия генов биосинтеза оксипинов связана с раком, а ОНП в генах метаболизма оксипинов играют важную роль в различных типах рака [67,450-452]. Подход для сравнения данных транскриптома и метаболома для биохимических путей был предложен ранее [49,51], но он не был использован для анализа профилей оксипинов.

В настоящее время взаимодействие между генетическим полиморфизмом и уровнем оксипинов показано [67, 450, 453] и хорошо охарактеризовано для колоректального рака [451,452]. В основном рассматривали отдельные гены, связанные с транспортом, удлинением и десатурацией полиненасыщенных жирных кислот [67,450,451,453].

Полиморфизмы генов могут вносить вклад в профиль оксипинов крови, однако ранее комплексная оценка полиморфизма генов метаболизма оксипинов не проводилась. Такой анализ может дать возможность предсказать наиболее перспективные гены для дальнейшего изучения. Поэтому, чтобы оценить, какие клетки или ткани могут отражать изменения оксипинов крови, были проанализированы транскриптомы, полученные ранее в тканях и клетках крови пациентов с РМЖ, и данные ОНП из клинических баз данных для генов, связанных с метаболизмом оксипинов.

### Связь изменения содержания оксипинов с транскриптомными данными экспрессии генов метаболизма ПНЖК

Мы составили список генов, участвующих в метаболизме целевых оксипинов, изменившихся при анализе профиля оксипинов (Рис. 3.67), на основе известных данных [3,89,123,454]. Всего было отобрано 33 гена, представленных в Таблице 3.14.

**Таблица 3.14.** Изменение содержания оксипинов у больных РМЖ по сравнению с КГ, ферменты и гены человека, участвующие в метаболизме липидов.

Метаболиты	Ферменты и гены участвующие в биосинтезе метаболита	Ферменты и гены участвующие в деградации метаболита
AA		
5-HETE	5-LOX ( <i>ALOX5</i> )	5-HEDH
15-HETrE	15-LOX-2 ( <i>ALOX15B</i> )	
AEA	NAPE-PLD ( <i>NAPEPLD</i> ), $\alpha/\beta$ -hydrolase domain 4 ( <i>ABDH4</i> ), GDE1 ( <i>GDE1</i> ), PTPN22 ( <i>PTPN22</i> ), INPP5D ( <i>INPP5D</i> )	FAAH ( <i>FAAH</i> ), COX-2 ( <i>PTGS2</i> ), 12-LOX ( <i>ALOX12</i> ), 15-LOX ( <i>ALOX15</i> )
11-HDoHE	12-LOX ( <i>ALOX12</i> )	
9,10-EpOME	CYP2J ( <i>CYP2J2</i> ), CYP2C ( <i>CYP2C18</i> , <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2C8</i> , <i>CYP2C9</i> )	mEH ( <i>EPHX1</i> ), sEH ( <i>EPHX2</i> ), EH3 ( <i>EPHX3</i> ), EH4 ( <i>EPHX4</i> )
12,13-EpOME	CYP2J ( <i>CYP2J2</i> ), CYP2C ( <i>CYP2C18</i> , <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2C8</i> , <i>CYP2C9</i> )	mEH ( <i>EPHX1</i> ), sEH ( <i>EPHX2</i> ), EH3 ( <i>EPHX3</i> ), EH4 ( <i>EPHX4</i> )
PGA2+PGJ2	PGDS ( <i>HPGDS</i> ), COX-1 ( <i>PTGS1</i> ), COX-2 ( <i>PTGS2</i> ), n.e.	
9-HODE	5-LOX ( <i>ALOX5</i> )	
12-HETE	12-LOX ( <i>ALOX12</i> ), 15-LOX ( <i>ALOX15</i> ) (min)	12-HEDH

11-HETE	15-LOX-2 ( <i>ALOX15B</i> ), COX-1 ( <i>PTGS1</i> ), COX-2 ( <i>PTGS2</i> )	
LXA5	5-LOX ( <i>ALOX5</i> )	
20-carboxy-AA	CYP4A11 ( <i>CYP4A11</i> ), Leukotriene-B(4) omega-hydroxylase 1 ( <i>CYP4F2</i> ), Leukotriene-B(4) omega-hydroxylase 2 ( <i>CYP4F3B</i> ), ADH ( <i>ADH</i> )	
13,14-dihydro-15-keto-PGF2a (PGFM)	15-PGDH ( <i>HPGD</i> ), AKR1C3 ( <i>AKR1C3</i> ), AKR1B1 ( <i>AKR1B1</i> ), CBR1 ( <i>CBR1</i> )	
PGE2	COX-1 ( <i>PTGS1</i> ), COX-2 ( <i>PTGS2</i> ), mPGES-1 ( <i>PTGES</i> ), mPGES-2 ( <i>PTGES2</i> ), cPGES ( <i>PTGES3</i> )	15-PGDH ( <i>HPGD</i> ), CBR1 ( <i>CBR1</i> )
Resolvin-D1	15-LOX ( <i>ALOX15</i> ), 5-LOX ( <i>ALOX5</i> )	
16-HDoHE	n.e.	
20-HDoHE	n.e.	

Далее оценивали входят ли гены из этого списка в перечень дифференциально экспрессирующиеся генов (ДЭГ), аализуя различные наборы транскриптомных данных (Таблица 3.15).

**Таблица 3.15.** Наборы данных для анализа дифференциальной экспрессии генов

GSE-номер набора данных	Количество образцов в анализе*	Контрольная группа	Группа больных
<b>Наборы данных (ткань)</b>			
GSE141142 ( $n = 24$ )	14	ткани здоровых людей	ткани больных РМЖ
GSE52194 ( $n = 20$ )	20	ткани здоровых людей	ткани больных РМЖ
GSE100925 ( $n = 103$ )	58	ткани здоровых людей	ткани больных РМЖ
GSE71651 ( $n = 33$ )	18	ткани здоровых людей	ткани больных РМЖ
GSE89225 ( $n = 54$ )	15	обычные CD4 Т-клетки от здоровых людей	обычные CD4 Т-клетки от пациентов с РМЖ
	19	регуляторные Т-клетки от здоровых людей	регуляторные Т-клетки от пациентов с РМЖ
<b>Наборы данных (кровь)</b>			
GSE68086 ( $n = 285$ )	94	тромбоциты крови здоровых людей	тромбоциты крови пациентов с РМЖ
GSE117970 ( $n = 116$ )	79	моноциты здоровых людей	моноциты пациентов с РМЖ
GSE87517 ( $n = 41$ )	30	лейкоциты (CD45+CD3+ Т-клетки) здоровых людей	лейкоциты пациентов с РМЖ

GSE111842 (n = 34)	22	периферическая кровь здоровых людей	циркулирующие опухолевые клетки, отсортированные из периферической крови пациентов с БК
GSE148991 (n = 11)	11	Плазма и лейкоцитарная пленка здоровых людей	циркулирующие опухолевые клетки от пациентов с метастатическим РМЖ

### 3.4.1. ДЭГ в наборах данных тканей пациентов с РМЖ vs. КГ

Анализируя ДЭГ в транскриптомных данных образцов тканей пациентов с РМЖ и КГ, полученных из открытых источников, было обнаружено, что: в наборе данных GSE141142 повышена экспрессия генов ALOX12B, в наборе данных GSE52194: повышена экспрессия ряда цитохромов - CYP2C19, CYP2C9 CYP4F2, CYP4F3, а также генов HPGDS, NAREPLD, RTPN22. Снижена активность трех эпоксидных гидролаз EPHX1, EPHX2, EPHX3, а также генов биосинтеза простагландинов: PTGES, PTGES3, PTGS2. В наборе данных GSE100925 (образцы ткани КГ против ткани пациентов с РМЖ) и GSE80333 (образцы фибробластов из КГ против фибробластов из пациентов с РМЖ) ни один из выбранных генов не был в списке ДЭГ. В наборе данных GSE89225\_conv экспрессия ALOX15B снижена.

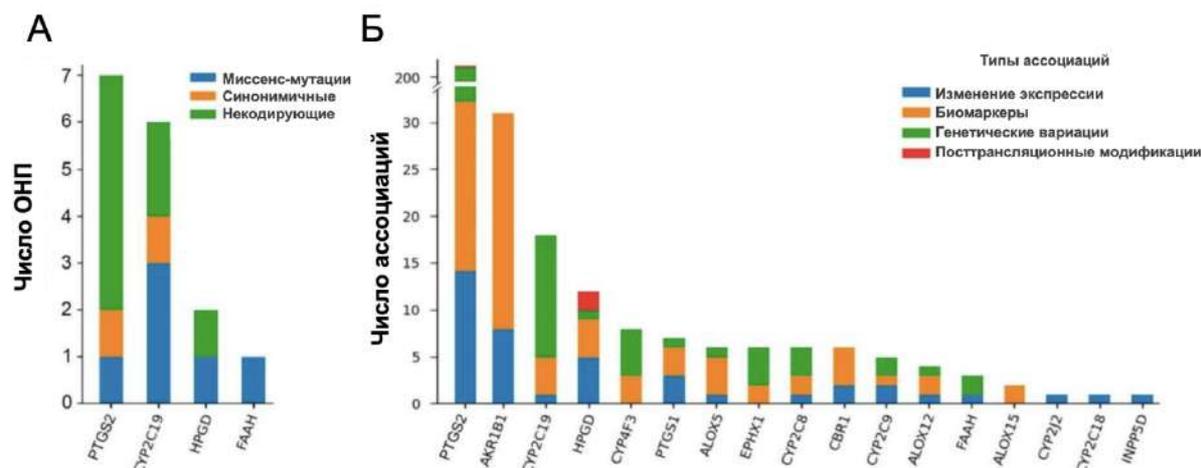
### 3.4.2. ДЭГ в наборе данных крови пациентов с РМЖ vs. КГ

В наборах данных GSE111842 (периферическая кровь из КГ по сравнению с циркулирующими опухолевыми клетками, отсортированными из периферической крови пациентов с РМЖ) и GSE148991 (плазма из КГ по сравнению с циркулирующими опухолевыми клетками пациентов с метастатическим РМЖ) ни один из генов не был в списке ДЭГ. В наборе данных GSE117970 (моноциты из КГ по сравнению с моноцитами пациентов с РМЖ) наблюдалось увеличение экспрессии AKR1C3, CYP2C9, EPHX2 и EPHX4 и уменьшение экспрессии PTGES. В наборе данных GSE68086 (самый большой набор данных по размеру выборки - тромбоциты крови из КГ против тромбоцитов крови пациентов с РМЖ) наблюдалось снижение экспрессии генов AKR1B1, ALOX12B, ALOX15B, цитохромов CYP2C19, CYP4A11, CYP4F2, эпоксид-гидролазы EPHX4 и FAAH. Экспрессия генов биосинтеза простагландина E2 - PTGES и PTGES2 - также была снижена.

В целом, ДЭГ-анализ образцов тканей и крови пациентов с РМЖ показал, что 19 генов биосинтеза оксипинонов изменяют свой уровень экспрессии (Рис. 3.68). Для образцов тканей наблюдалось снижение



пользователям получить информацию об ассоциациях между вариациями в гене и риском развития заболевания на основе анализа текстов статей, а также проверенных баз данных, включая UniProt, ClinVar, GWAS Catalog и GWAS db. Полученный список ОНП в целевых генах был проверен вручную, а незначимые значения были исключены из анализа. Было установлено, что из списка генов, кодирующих биосинтез оксилипинов, ОНП имеются в четырех генах: PTGS2 (фермент COX-2), CYP2C19 (цитохром P450 2C19), 15-HPGD и FAAH (Рис. 3.69А).



**Рис. 3.69.** ОНП (А) и ассоциации (Б) с РМЖ для генов, участвующих в биосинтезе оксилипинов.

В кодирующих областях различают синонимичные и несинонимичные ОНП. Синонимичные ОНП не приводят к аминокислотным заменам и обычно не влияют на активность ферментов. В контексте ассоциации с заболеваниями важную роль играют несинонимичные ОНП, в которых происходит замена одного аминокислотного остатка (missense) или преждевременно образуется стоп-кодон (nonsense). В некодирующих областях ОНП наблюдаются в интронах и межгенных областях, особенно в регуляторных областях и местах связывания белковых факторов. Функциональные ОНП могут попадать в сайты сплайсинга и регионы, контролирующие транскрипцию, и таким образом влиять на экспрессию генов. В отдельную категорию входят некодирующие ОНП, которые влияют на структуру и функционирование различных типов РНК.

Программа DisGeNet также позволяет выявлять гены, связанные с заболеваниями, на основе анализа исходных данных из различных баз данных. Были проанализированы ассоциации между выбранными генами и РМЖ. Выделены: измененная экспрессия (изменения в функции белка

посредством измененной экспрессии гена связаны с фенотипом заболевания); биомаркер (ген/белок либо играет роль в этиологии заболевания (например, участвует в молекулярном механизме, который приводит к заболеванию), либо является биомаркером заболевания); генетическая вариация (используется, когда вариация последовательности (мутация, ОНП) связана с фенотипом заболевания, но еще нет доказательств того, что различные вариации вызывают заболевание. В некоторых случаях наличие вариаций повышает восприимчивость к заболеванию; посттрансляционная модификация (изменения в функции белка с помощью посттрансляционных модификаций (метилование или фосфорилирование белка) связаны с фенотипом заболевания. Было обнаружено, что для 17 генов такая ассоциация присутствует (Рис. 3.56Б), цвет указывает на тип ассоциации для наблюдаемых генов. Ось у представляет собой количество упоминаний генов в контексте РМЖ. Наиболее распространенными генами являются цитохромы, такие как CYP2C19, CYP4F3, CYP2C8 и CYP2C9, и гены трансформации оксипинолов, такие как HPGD, EPHX1 и CBR1.

Наибольшее количество ассоциаций наблюдается для гена PTGS2 (210) и AKR1B1 (31), при этом они в основном связаны с биомаркерами РМЖ. CYP2C19, PTGS2, HPGD и FAAH включены как в список генов, ассоциированных с РМЖ, так и в список ОНП, ассоциированных с РМЖ.

### **3.3.5. Исследование роли метаболизма ПНЖК при раке молочной железы с использованием рангового алгоритма случайного леса**

Хотя рак молочной железы (РМЖ) является ведущей причиной онкологической смертности среди женщин во всем мире, систематического изучения метаболизма ПНЖК как системы взаимосвязанных процессов при этом заболевании не проводилось. Целью работы было с использованием подходов машинного обучения (алгоритм случайного леса) и алгоритма отбора признаков при помощи алгоритма Борута, определить список наиболее важных генов метаболизма ПНЖК, измененных в тканях рака молочной железы по сравнению с нормальными тканями, а также выявить наиболее значимые гены, различающиеся между молекулярными подтипами рака молочной железы. При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования [427].

Транскриптомный анализ — один из продуктивных способов изучения изменений метаболических путей. Было показано, что метаболическое репрограммирование рака регулируется на уровне транскрипции [455,456]. Гетерогенность рака молочной железы и сопровождающая ее вариабельность метаболических процессов требуют большого объема данных для изучения. Данные были накоплены с появлением методов секвенирования нового поколения (NGS) и микрочипов [457]. Совместный анализ таких наборов данных с помощью подходов машинного обучения (ML) мог бы лучше определить роль ПНЖК в развитии рака молочной железы.

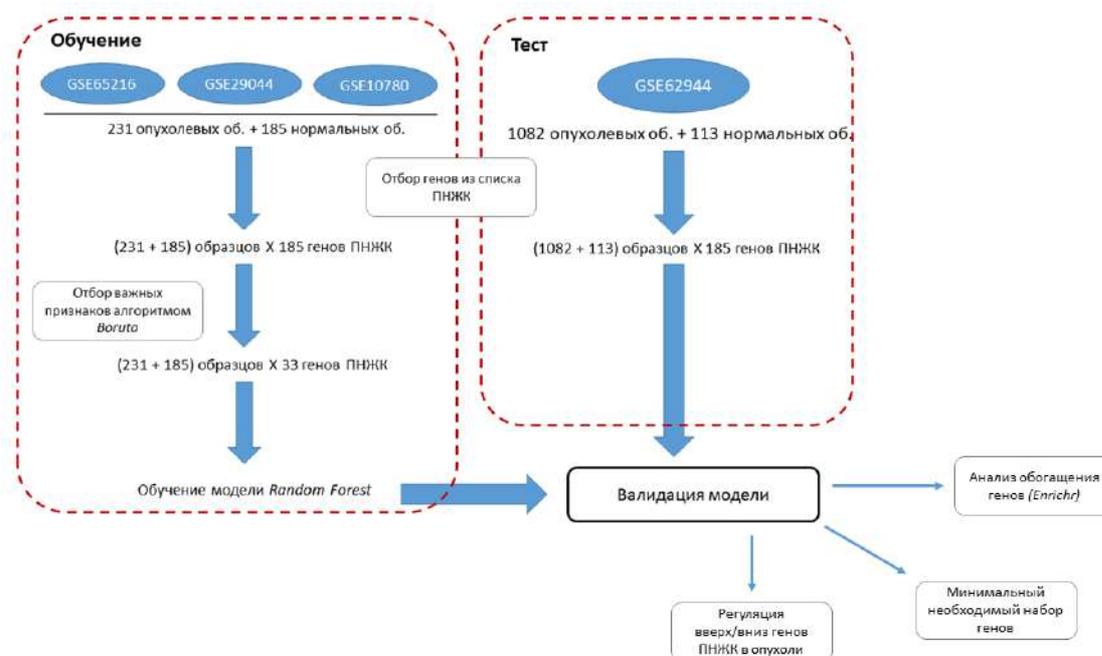
Подходы ML, в частности, алгоритм случайного леса (Random Forest, RF) [243], уже успешно применяются для анализа данных экспрессии для различных типов рака [458]. Тем не менее, анализ широкого набора транскриптомных данных ограничен различиями в соответствующих технологических платформах. Для преодоления этих ограничений можно использовать непараметрические методы [459]. Сочетание непараметрических методов, в частности ранжирования профиля экспрессии, со случайным лесом упрощает применение RF к гетерогенным наборам данных. RF-подходы эффективно применяются для различения гетерогенных групп, хотя, насколько нам известно, они не использовались для анализа путей ПНЖК.

Мы использовали подход, основанный на сочетании непараметрического метода и RF-модели. Методы выбора признаков Борута [460] и последовательного выбора признаков [461] широко используются и доказали свою эффективность. Использование алгоритма отбора признаков Борута [245] позволило идентифицировать гены, ответственные за изменения метаболизма ПНЖК при РМЖ. Прогнозирующая способность классификаторов была протестирована на независимых наборах данных. Исследование расширило представление о роли метаболических путей ПНЖК в патогенезе рака молочной железы и позволило выявить их специфические закономерности при различных молекулярных подтипах рака молочной железы.

### **3.3.5.1. Ранговый классификатор RF образцов опухолевой и нормальной ткани**

Для оценки роли метаболизма ПНЖК в патогенезе РМЖ был составлен список из 202 генов на основе известных данных [3], описанных в работе

[440]. Выполнен систематический поиск транскриптомов в открытых базах данных с использованием ранее разработанного инструмента ARGEOС [241] и выбрали наборы данных GSE65216, GSE29044, GSE10780 ( $n = 231$  образец опухоли,  $n = 185$  образцов здоровой ткани) и GSE62944 ( $n = 1082$  образца опухоли,  $n = 113$  образцов здоровой ткани), причем последний представляет данные TCGA из базы данных TCGA (Атлас генома рака). Наборы данных включали образцы как рака молочной железы, так и нормальных прилегающих тканей. Затем первоначальный список выбранных генов ПНЖК сопоставлялся с генами, представленными в наборах данных; Для дальнейшего анализа было выбрано 185 генов, представленных во всех наборах данных. Отобранные наборы данных были разделены на две группы: обучающая выборка (GSE65216, GSE29044 и GSE10780) и тестовая выборка (GSE62944). Пошаговый алгоритм дальнейшего изучения различий в регуляции ПНЖК между нормальными образцами и образцами рака молочной железы представлен на Рис.3.70.

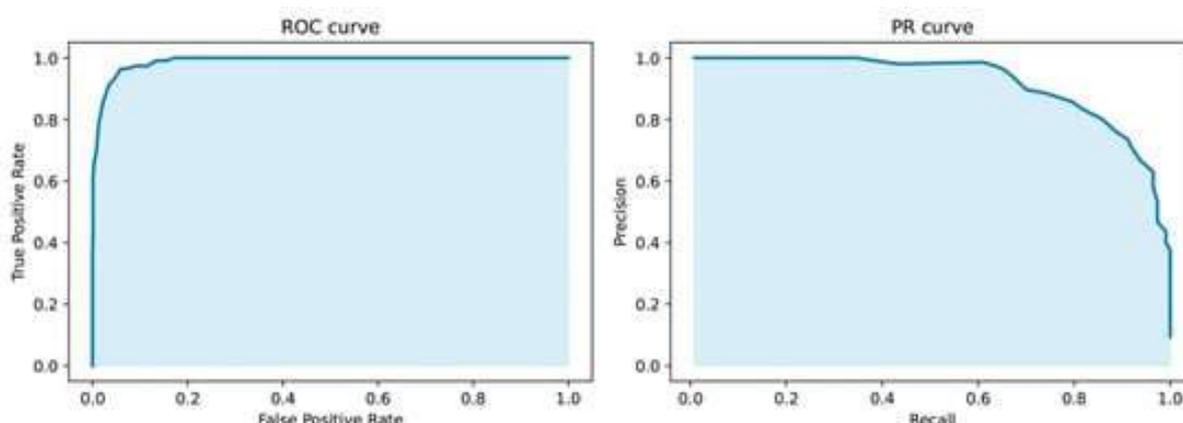


**Рис. 3.70.** Пошаговый алгоритм изучения различий в регуляции ПНЖК между здоровыми образцами и образцами рака молочной железы.

На тренировочной выборке был проведен отбор важных признаков при помощи алгоритма Борута. Ключевая идея данного метода основывается на сравнении важностей исходных признаков с важностью признаков, полученных путем перемешивания значений исходных. Только признаки, несущие большую информацию, чем рандомные, отмечаются как важные.

Из исходных 185 генов ПНЖК 33 гена были отобраны алгоритмом Борута (Рис. 3.70, левая блок-схема).

Эти гены в дальнейшем использовались для изучения бинарной модели рангового случайного леса. Качество модели оценивалось на тестовой выборке (Рис. 3.70, правая блок-схема). Результаты показаны на Рис. 3.71 и таблице 3.16 .



**Рис. 3.71.** Показатели ROC и PR для бинарной классификации образцов рака молочной железы и нормальных образцов.

**Таблица 3.16.** Качество рангового RF для бинарной классификации здоровых и опухолевых тканей молочной железы. Показаны матрица ошибок и значения метрик качества.

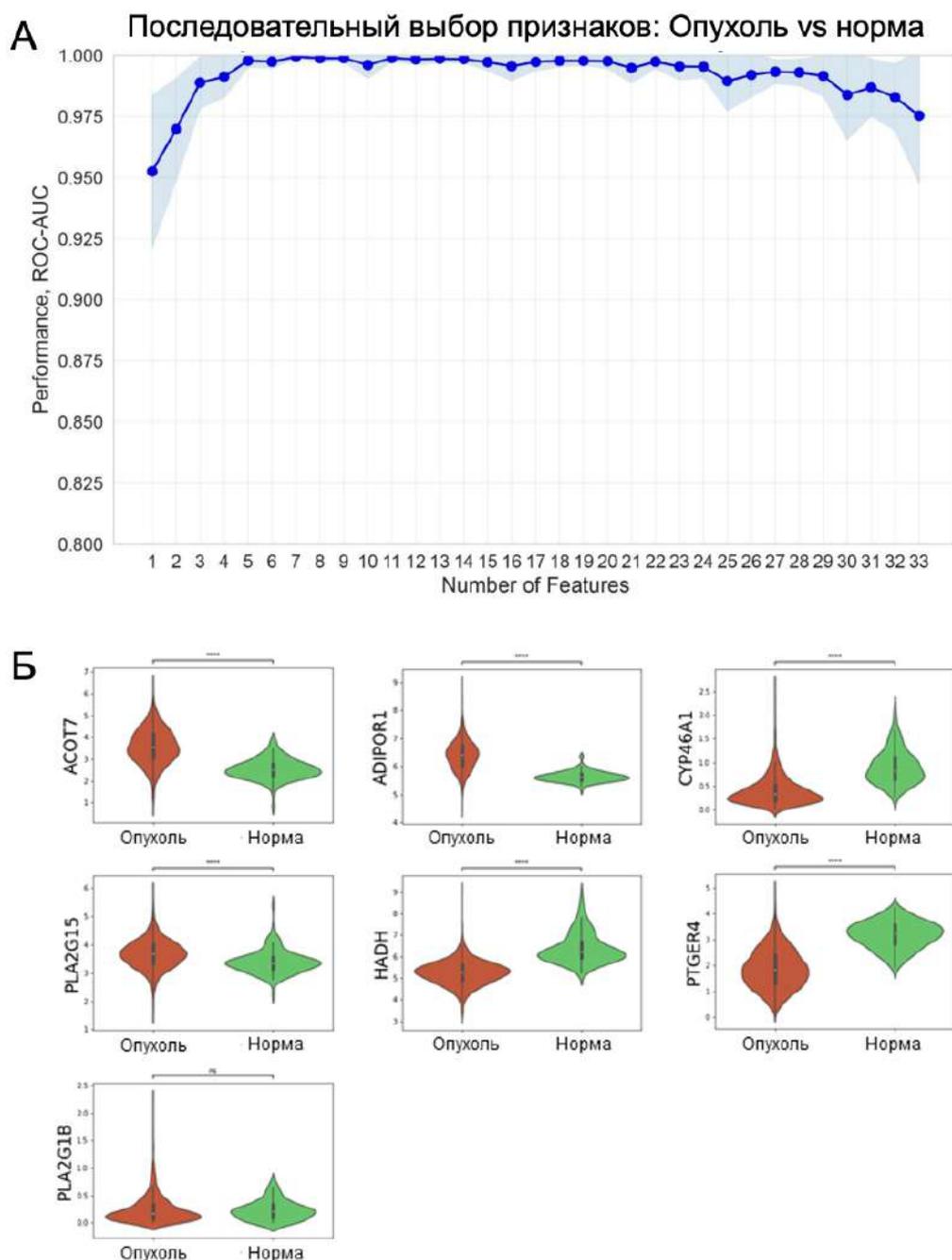
		<b>РЕФЕРЕНС</b>	
		Опухолевая ткань	Нормальная ткань
<b>ПРЕДСКА- ЗАНИЕ</b>	Опухолевая ткань	1037	9
	Нормальная ткань	45	104
<b>Сбалансированная точность</b>		<b>ROC AUC</b>	<b>PR AUC</b>
<b>Ранговая модель</b>	0,9394	0,9889	0,9119

Полученный классификатор, основанный на 33 генах ПНЖК, эффективно разделяет больные и нормальные образцы (Таблица 3.16). Это указывает на то, что действительно, профили экспрессии генов метаболизма ПНЖК различаются между здоровыми и опухолевыми тканями молочной железы.

Из 33 выбранных генов 6 генов имели значительно повышенную ( $p$ -значение  $<0,05$ ) экспрессию в образцах рака молочной железы, а экспрессия

24 генов была снижена по сравнению со здоровой тканью. Для характеристики этих генов был проведен анализ функциональных и биологических путей GO, а также путей в базе KEGG и WikiPathways с использованием метода Enrichr. Анализ обогащения путей базы KEGG показал, что метаболический путь линолевой кислоты активируется при раке молочной железы, в то время как в здоровых прилегающих тканях в большей степени были обогащены метаболические процессы арахидоновой кислоты. Более того, согласно данным WikiPathways, метаболизм эйкозаноидов осуществляемый через циклооксигеназный путь, подавляется в опухолях по сравнению с образцами здоровой молочной железы.

На следующем этапе был использован метод последовательного выбора признаков (SFS) для определения минимального набора генов, который демонстрирует лучшее качество разделения опухолевых и здоровых образцов. Алгоритм SFS определил, что ранговый RF-классификатор, основанный на списке из семи генов (ADIPOR1, HADH, ACOT7, PTGER4, PLA2G15, PLA2G1B и CYP46A1), имеет наибольшую прогностическую эффективность по шкале ROC-AUC (ROC-AUC 0,99, ДИ 0,002) (Рис. 3.72А). Экспрессия этих генов при раке молочной железы и нормальных прилегающих тканях показана на Рис. 3.72Б.



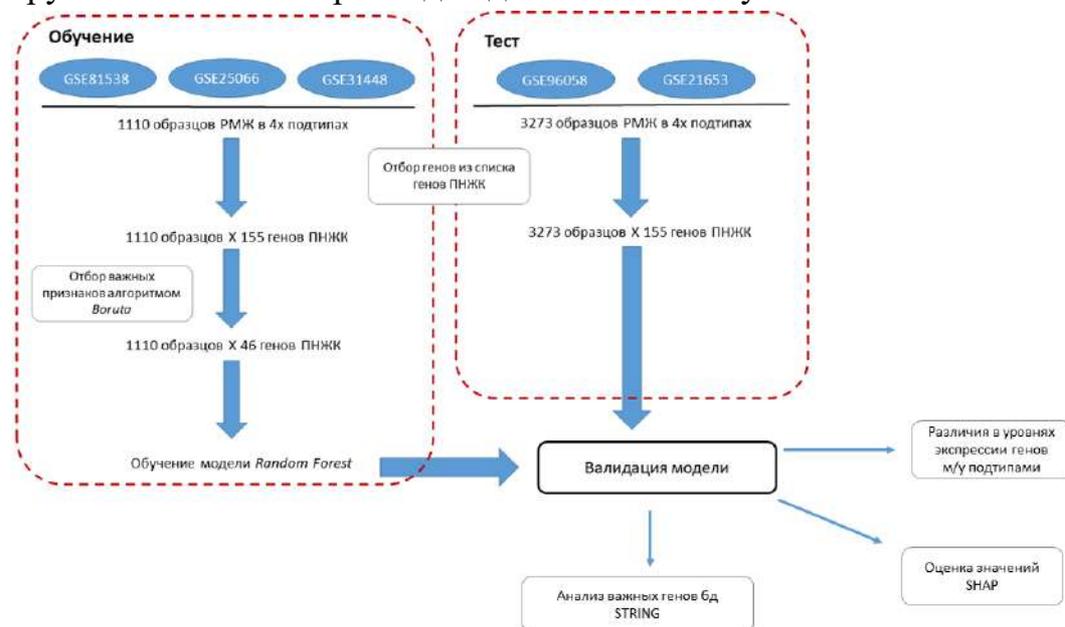
**Рис. 3.72.** Выявление минимального набора генов ПНЖК, необходимого для эффективной классификации рака молочной железы и нормальных образцов. (А) Голубая область - 95% ДИ. (Б) Экспрессия генов ADIPOR1, HADH, ACOT7, PTGER4, PLA2G15, PLA2G1B и CYP46A1 в образцах рака молочной железы и нормальных прилегающих тканях \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.3.5.2. Ранговая модель классификации рака молочной железы для идентификации наиболее важных генов ПНЖК

Рак молочной железы является гетерогенным онкологическим заболеванием [462]. С появлением высокопроизводительного секвенирования в клинической практике стали широко использоваться

внутренние молекулярные подтипы рака молочной железы. В работе [463] выделяют пять молекулярных подтипов: люминальные А, люминальные В, нормоподобные, HER2-обогащенные и базальноподобные опухоли. Эти подтипы различаются по прогнозу выживаемости и выбору терапевтической стратегии [464]. Таким образом, актуально изучить различия в метаболизме ПНЖК не только между здоровыми и раковыми тканями, но и между молекулярными подтипами.

Мы использовали пять наборов данных из базы данных GEO: в качестве обучающей выборки - GSE81538, GSE25066 и GSE31448, и в качестве тестовой выборки GSE96058 и GSE21653. Пошаговый алгоритм дальнейшего изучения различий в регуляции ПНЖК между подтипами опухолей представлен на Рис. 3.73. Из-за различий платформ только 155 генов из полного списка ПНЖК (202 гена) присутствовали в обоих наборах групп и были выбраны для дальнейшего изучения.



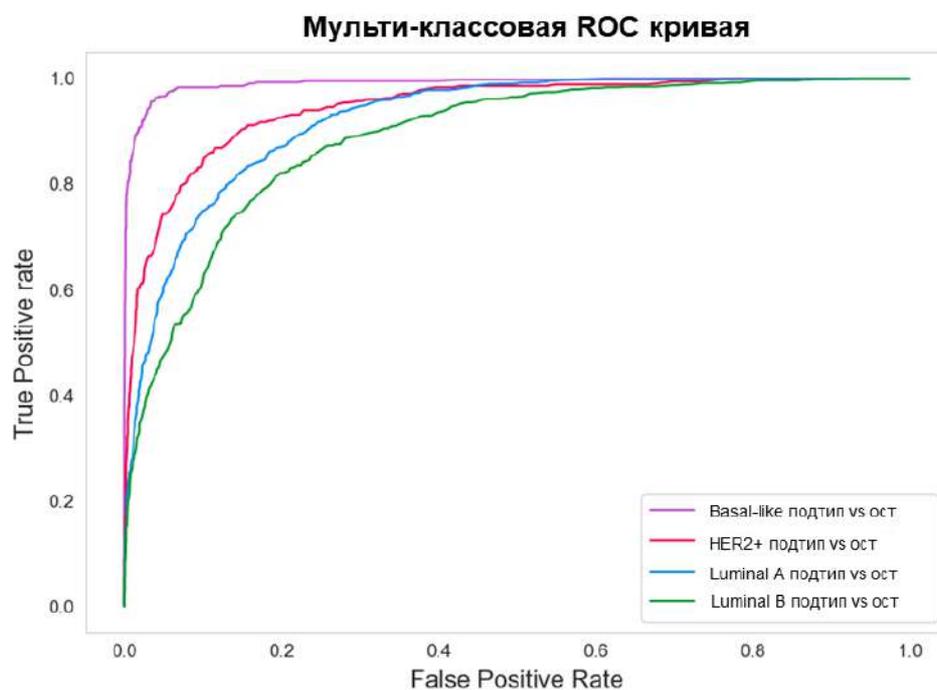
**Рис. 3.73.** Пошаговый алгоритм изучения различий в регуляции ПНЖК между четырьмя молекулярными подтипами РМЖ.

Алгоритм Борута отметил 46 генов как важные для разделения четырех молекулярных подтипов рака молочной железы. Гены, выделенные как важные, в дальнейшем использовались для построения рангового классификатора случайного леса. Мультиклассовая модель имела сбалансированную точность 0,82 и ROC-AUC 0,85. Поскольку тестовая выборка не была сбалансирована между классами, оценивали показатель качества F1-score, который составлял 0,75.

Метрики качества (сбалансированная точность, показатель ROC-AUC и F1) построенной модели показывают, что профили экспрессии генов ПНЖК различаются между молекулярными подтипами. Наибольшее количество ошибочных классификаций (Рис. 3.74, Таблица 3.17) приходится на разделение люминальных подтипов (Lum A и Lum B).

**Таблица 3.17.** Качество рангового RF для бинарной классификации молекулярных подтипов. Матрица ошибок.

	РЕФЕРЕНС				
	LumA	LumB	HER2+	Basal-like	
ПРЕДСКАЗАНИЕ	LumA	1622	341	66	10
	LumB	100	402	52	13
	HER2+	15	21	202	15
	Basal-like	4	6	30	374



**Рис. 3.74.** Матрица ошибок для рангового RF классификатора молекулярных подтипов РМЖ на основании экспрессии генов ПНЖК.

Отобранные 46 генов были проанализированы для определения подтипа, в котором они значительно (значение  $p < 0,05$ ) дифференциально экспрессируются. Анализ проводился на самом большом наборе данных (GSE96058) из тестовой выборки. В таблице 3.18 показаны гены, экспрессия

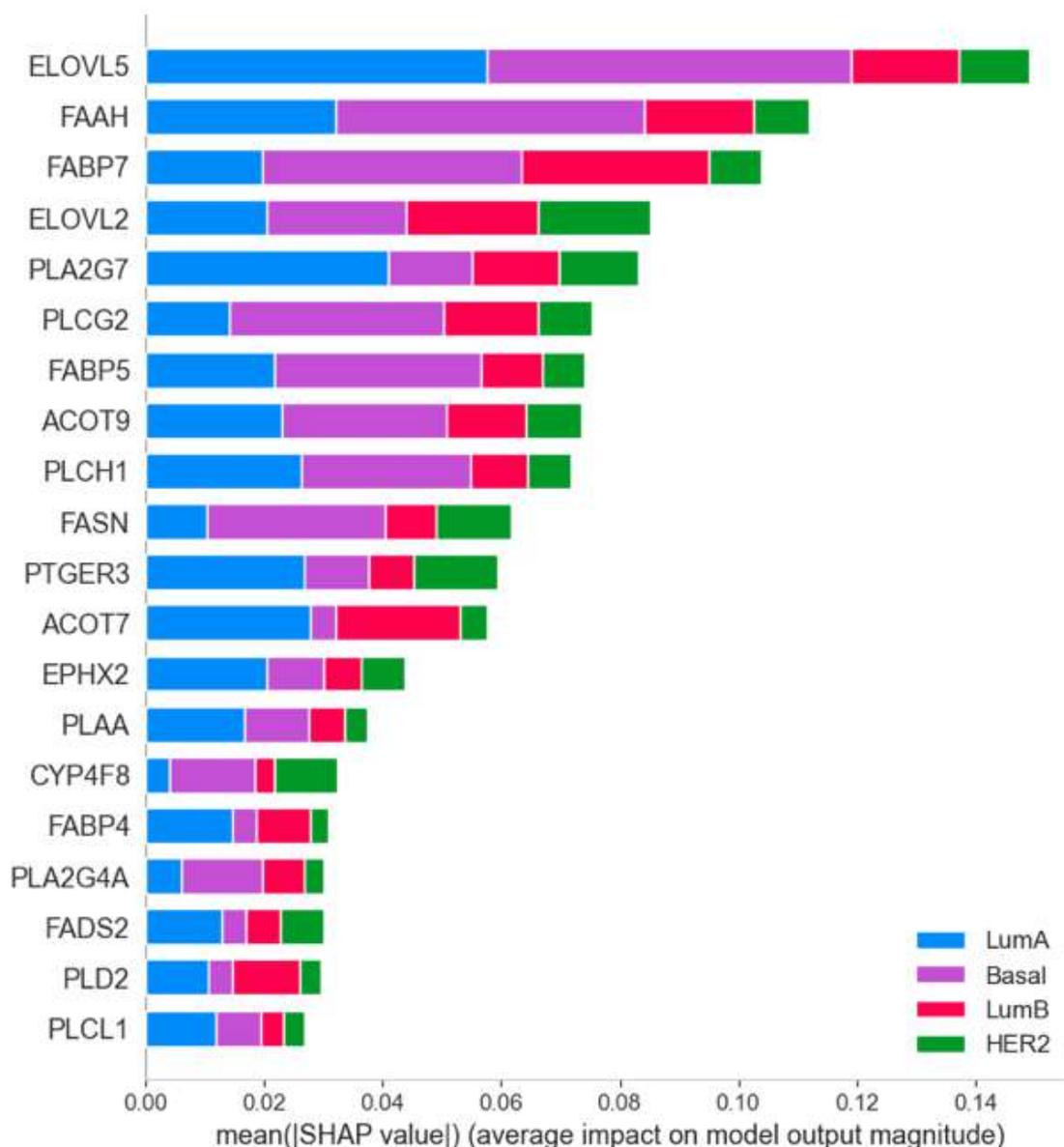
которых была значительно повышена при соответствующем молекулярном подтипе рака. Видно, что для каждого подтипа выявляется характерный набор генов, большинство из которых ответственны за обеспечение функционирования сигнальной системы оксипинонов.

Таблица 3.18. Гены *up*-регулируемые в соответствующем подтипе

<b>Luminal A</b>	<b>Luminal B</b>	<b>HER2+</b>	<b>Basal-like</b>
<i>ELOVL5</i>	<i>PTGES3</i>	<i>FASN</i> *	<i>AKR1B1</i>
<i>ACAA1</i> *	<i>ADIPOR1</i>	<i>FABP6</i>	<i>CYP39A1</i>
<i>PLD2</i>	<i>MBOAT7</i> *	<i>MGLL</i>	<i>PLD1</i>
<i>ACAD8</i> *	<i>ACOT8</i> *	<i>ALOX15B</i>	<i>PLA2G4A</i>
<i>PLCL1</i>	<i>CYP2B6</i>	<i>FADS2</i>	<i>FPR2</i>
<i>HPGDS</i>	<i>FAAH</i>		<i>PLCG2</i>
<i>CYP4F11</i>			<i>CYP7B1</i>
<i>PTGER3</i>			<i>FABP5</i>
<i>CYP4F8</i>			<i>PLA2G7</i>
<i>ELOVL2</i>			<i>CBR1</i>
<i>EPHX2</i>			<i>PLAA</i>
<i>LPCAT3</i> *			<i>ACOT9</i> *
<i>LTC4S</i>			<i>HSD17B12</i>
<i>FABP4</i>			<i>CYP39A1</i>
			<i>PLA2G2D</i>
			<i>PLCH1</i>

\* - отнесен к группе генов, отвечающих за энергетические и структурные функции жирных кислот; остальные можно отнести к генам сигнальной системе оксипинонов.

Отобранные гены ПНЖК (46 генов) для построения рангового классификатора RF были исследованы при помощи метода SHAP values. Сводный график на Рис. 3.75 показывает 20 наиболее важных генов. Шкалы, отмеченные цветом, отображают влияние конкретного гена на отделение соответствующего цвету подтипа РМЖ от остальных. *ELOVL5* был наиболее важным геном для общей классификации и, в частности, для Basal-like и Luminal A подтипов. Ранжированная экспрессия *FABP7* оказала наибольшее влияние на отделение Luminal B подтипа, а экспрессия *ELOVL2* — на HER2-обогащенный подтип (Рис. 3.75).



**Рис. 3.75.** Наиболее важные гены для классификации молекулярных подтипов на основании SHAP значений. Каждый цвет представляет важность отделения соответствующего класса от других.

#### 4. Обсуждение

Вопрос о том, изменяется ли состав оксилипинов в крови, остается открытым. Если да, то о чем могут свидетельствовать профили оксилипинов?

Мы выявили повышение концентрации производных арахидоновой кислоты (AA), синтезируемых по циклооксигеназному (COX) пути, снижение концентрации метаболитов, синтезируемых по эпоксигеназному пути (метаболиты AA и линолевой кислоты (LA)), липоксигеназному

(LOX) пути (метаболиты ДНА), а также снижение концентрации эндогенного каннабиноида анандамида (АЕА) в крови больных РМЖ. Это согласуется с данными, полученными для отдельных соединений, таких как PGE<sub>2</sub> или LOX-метаболиты линолевой и линоленовой кислот [76,465]. Преимущества представленной работы заключаются в том, что одновременно рассматривали большое количество оксипинов (профилей) и делали это на большой выборке данных. Поэтому наблюдали изменения в соединениях, которые ранее не анализировались в профилях, хотя они считаются важными (в частности, АЕА). Полученные данные подтверждают предположение о том, что изменения оксипинов отражают общее состояние организма и могут не отражать напрямую изменения, наблюдаемые в конкретной опухолевой ткани.

Транскриптомная часть исследования проливает новый свет на роль оксипинов в опухолевых заболеваниях. Показано, что многие гены метаболизма оксипинов изменяют свою экспрессию при сравнении пациентов с РМЖ и КГ. На данных транскриптомов, полученных из опухолевой ткани, выявлена повышенная экспрессия цитохромов и пониженная эпоксидгидролазы, что указывает на возможность повышения концентрации 12,13-ЕрОМЕ и 9,10-ЕрОМЕ (рис. 3.68). Аналогичные данные были получены при измерении оксипинов в тканях больных РМЖ [445]. Наш анализ показал снижение экспрессии генов биосинтеза простагландинов (СОХ-2, простагландин синтазы) и повышение экспрессии НРGDS (простагландин D синтазы) (Рис. 3.68). Эти изменения могут привести к снижению концентрации PGE<sub>2</sub> и увеличению других продуктов, таких как 11-НЕТЕ, РGFM или РGD<sub>2</sub> (рис. 3.68). Увеличение 11-НЕТЕ и РGD<sub>2</sub> наблюдалось в тканях РМЖ [445]. Увеличение экспрессии N-ацилфосфатидилэтаноламин фосфолипаза D (NAPCPLD), основного фермента синтеза АЕА [448], должно привести к увеличению синтеза АЕА. Это согласуется с данными о высоком уровне предшественника АЕА, N-ацилфосфатидилэтаноламина в тканях РМЖ [466]. Анализ ДЭГ показывает, что образцы опухолевой ткани или клетки крови пациентов с РМЖ имеют свой собственный паттерн экспрессии генов метаболизма оксипинов. При этом эти изменения не коррелируют напрямую с изменениями профиля оксипинов в плазме крови. Профиль оксипинов крови является независимой характеристикой для различения ранних стадий РМЖ по сравнению с КГ.

В настоящее время не вызывает сомнения важность на разных стадиях рака изменений в концентрации отдельных АА-производных оксипинов [65,69,88] или в СУР, СОХ и LOX, ферментах синтеза оксипинов [70,445]. В данной работе показаны изменения в профиле оксипинов в крови пациентов с РМЖ по сравнению с кровью КГ. Эта характеристика остается уникальной и не отражает напрямую изменения в транскрипции генов метаболизма оксипинов в клетках крови или опухолевых тканях. Остается много вопросов: отражают ли изменения оксипинов стадии рака или специфические защитные реакции организма? Являются ли наблюдаемые изменения защитой от нарушения гомеостаза при заболевании или проявлением патологии? Ответ на этот вопрос влияет на направление терапевтических стратегий. Другие вопросы включают: можно ли использовать профили оксипинов для диагностики конкретного рака и его стадии? Могут ли оксипины крови специфически отражать изменения в патологии тканей? Хотя большинство вопросов по биологии оксипинов остаются нерешенными, наша работа дает утвердительный ответ на два последних вопроса. Остается открытым вопрос, какие именно изменения отражает профиль оксипинов крови. Хотя высказывалось предположение, что изменения метаболитов отражают изменения в опухолевых тканях [443], полученные данные показывают, что более вероятно, что изменения оксипинов крови отражают системный ответ организма на патологию, не связанный напрямую с опухолью или изменениями в клетках крови. Дальнейшие исследования покажут, насколько устойчива эта характеристика, но в настоящее время полученные данные свидетельствуют о том, что профиль оксипинов крови может быть использован для выявления ранних стадий РМЖ по сравнению с КГ.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Результаты 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 СОХ-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 было показано, 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 оксипинов, получить характеристики изменений внутриклеточных регуляторных участков (MAPK, PPAR, NF- $\kappa$ 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  $3\beta$ -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 оксипинов.

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

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

7. Изменение профиля оксипинов 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Serhan, C.N., Chiang, N., Van Dyke, T.E. (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators, *Nat Rev Immunol*, **8**, 349–61, doi: 10.1038/nri2294.
2. Buczynski, M.W., Dumlao, D.S., Dennis, E.A. (2009) An integrated omics analysis of eicosanoid biology, *J Lipid Res*, **50**, 1015–38, doi: 10.1194/jlr.R900004-JLR200.

3. Gabbs, M., Leng, S., Devassy, J.G., Monirujjaman, M., Aukema, H.M. (2015) Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs, *Advances in Nutrition*, **6**, 513–40, doi: 10.3945/an.114.007732.
4. Funk, C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology., *Science (1979)*, **294**, 1871–5, doi: 10.1126/science.294.5548.1871.
5. Сергеева, М.Г., Варфоломеева, А.Т. (2006) Каскад арахидоновой кислоты. Народное образование, Москва.
6. Dennis, E.A., Norris, P.C. (2015) Eicosanoid storm in infection and inflammation., *Nat Rev Immunol*, **15**, 511–23, doi: 10.1038/nri3859.
7. Straus, D.S., Glass, C.K. (2001) Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets, *Med Res Rev*, **21**, 185–210, doi: 10.1002/MED.1006.
8. Musiek, E.S., Milne, G.L., McLaughlin, B., Morrow, J.D. (2005) Cyclopentenone eicosanoids as mediators of neurodegeneration: a pathogenic mechanism of oxidative stress-mediated and cyclooxygenase-mediated neurotoxicity., **15**.
9. Figueiredo-Pereira, M.E., Rockwell, P., Schmidt-Glenewinkel, T., Serrano, P. (2015) Neuroinflammation and J2 prostaglandins: linking impairment of the ubiquitin-proteasome pathway and mitochondria to neurodegeneration, *Front Mol Neurosci*, **7**, 1–20, doi: 10.3389/FNMOL.2014.00104.
10. Tanaka, N., Yamaguchi, H., Mano, N. (2014) Transport of eicosapentaenoic acid-derived PGE<sub>3</sub>, PGF(3 $\alpha$ ), and TXB<sub>3</sub> by ABCC4, *PLoS One*, **9**, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0109270.
11. Kuhn, H., Banthiya, S., Van Leyen, K. (2015) Mammalian lipoxygenases and their biological relevance, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, **1851**, 308–30, doi: 10.1016/j.bbalip.2014.10.002.
12. Archambault, A.S., Turcotte, C., Martin, C., Provost, V., Larose, M.C., Laprise, C., Chakir, J., Bissonnette, É., Laviolette, M., Bossé, Y., Flamand, N. (2018) Comparison of eight 15-lipoxygenase (LO) inhibitors on the biosynthesis of 15-LO metabolites by human neutrophils and eosinophils, *PLoS One*, **13**, doi: 10.1371/journal.pone.0202424.
13. Morgan, L.T., Thomas, C.P., Kühn, H., O'Donnell, V.B. (2010) Thrombin-activated human platelets acutely generate oxidized docosahexaenoic-acid-containing phospholipids via 12-lipoxygenase, *Biochemical Journal*, **431**, 141–8, doi: 10.1042/BJ20100415.
14. Picq, M., Chen, P., Perez, M., Michaud, M., Véricel, E., Guichardant, M., Lagarde, M. (2010) DHA metabolism: Targeting the brain and lipoxygenation, *Mol Neurobiol*, **42**, 48–51, doi: 10.1007/s12035-010-8131-7.
15. Guichardant, M., Véricel, E., Lagarde, M. (2019) Biological relevance of double lipoxygenase products of polyunsaturated fatty acids, especially within blood vessels and brain, *Biochimie*, **159**, 55–8, doi: 10.1016/j.biochi.2018.08.009.
16. Pickens, C.A., Sordillo, L.M., Zhang, C., Fenton, J.I. (2017) Obesity is positively associated with arachidonic acid-derived 5- and 11-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE), *Metabolism*, **70**, 177–91, doi: 10.1016/j.metabol.2017.01.034.
17. Leung, K.S., Chan, H.F., Leung, H.H., Galano, J.M., Oger, C., Durand, T., Lee, J.C.Y. (2017) Short-time UVA exposure to human keratinocytes instigated polyunsaturated

- fatty acid without inducing lipid peroxidation, *Free Radic Res*, **51**, 269–80, doi: 10.1080/10715762.2017.1300885.
18. Wang, B., Wu, L., Chen, J., Dong, L., Chen, C., Wen, Z., Hu, J., Fleming, I., Wang, D.W. (2021) Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets, *Signal Transduct Target Ther*, **6**, doi: 10.1038/S41392-020-00443-W.
  19. Hercule, H.C., Schunck, W.H., Gross, V., Seringer, J., Leung, F.P., Weldon, S.M., Da Costa Goncalves, A.C., Huang, Y., Luft, F.C., Gollasch, M. (2009) Interaction between P450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 54–60, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.171298.
  20. Dhanasekaran, A., Gruenloh, S.K., Buonaccorsi, J.N., Zhang, R., Gross, G.J., Falck, J.R., Patel, P.K., Jacobs, E.R., Medhora, M. (2008) Multiple antiapoptotic targets of the PI3K/Akt survival pathway are activated by epoxyeicosatrienoic acids to protect cardiomyocytes from hypoxia/anoxia, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **294**, doi: 10.1152/AJPHEART.00979.2007.
  21. Spector, A.A. (2009) Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway, *J Lipid Res*, **50 Suppl**, doi: 10.1194/JLR.R800038-JLR200.
  22. Liu, X., Qian, Z. yuan., Xie, F., Fan, W., Nelson, J.W., Xiao, X., Kaul, S., Barnes, A.P., Alkayed, N.J. (2017) Functional screening for G protein-coupled receptor targets of 14,15-epoxyeicosatrienoic acid, *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **132**, 31–40, doi: 10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2016.09.002.
  23. Maccarrone, M. (2017) Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years, *Front Mol Neurosci*, **10**, doi: 10.3389/FNMOL.2017.00166.
  24. Акимов, М.Г., Бобров, М.Ю., Безуглов, В.В., Коновалов, С.С. (2009) Липиды и рак: очерки липидологии онкол. процесса. Прайм-Еврознак.
  25. O’Sullivan, S.E. (2016) An update on PPAR activation by cannabinoids, *Br J Pharmacol*, **173**, 1899–910, doi: 10.1111/BPH.13497.
  26. Vigor, C., Bertrand-Michel, J., Pinot, E., Oger, C., Vercauteren, J., Le Faouder, P., Galano, J.M., Lee, J.C.Y., Durand, T. (2014) Non-enzymatic lipid oxidation products in biological systems: assessment of the metabolites from polyunsaturated fatty acids, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **964**, 65–78, doi: 10.1016/J.JCHROMB.2014.04.042.
  27. Vangaveti, V., Baune, B.T., Kennedy, R.L. (2010) Hydroxyoctadecadienoic acids: novel regulators of macrophage differentiation and atherogenesis., *Ther Adv Endocrinol Metab*, **1**, 51–60, doi: 10.1177/2042018810375656.
  28. Galano, J.M., Roy, J., Durand, T., Lee, J.C.Y., Le Guennec, J.Y., Oger, C., Demion, M. (2018) Biological activities of non-enzymatic oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids (NEO-PUFAs) derived from EPA and DHA: New anti-arrhythmic compounds?, *Mol Aspects Med*, **64**, 161–8, doi: 10.1016/j.mam.2018.03.003.
  29. Hasin, Y., Seldin, M., Lusic, A. (2017) Multi-omics approaches to disease, *Genome Biol*, **83**, doi: 10.1186/s13059-017-1215-1.
  30. Goodwin, S., McPherson, J.D., McCombie, W.R. (2016) Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies, *Nat Rev Genet*, **17**, 333–51, doi: 10.1038/NRG.2016.49.

31. Segers, K., Declerck, S., Mangelings, D., Heyden, Y. Vander., Eeckhaut, A. Van. (2019) Analytical techniques for metabolomic studies: a review, *Bioanalysis*, **11**, 2297–318, doi: 10.4155/BIO-2019-0014.
32. Balazy, M. (2004) Eicosanomics: targeted lipidomics of eicosanoids in biological systems, *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **73**, 173–80, doi: 10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2004.03.003.
33. Rudd, P.M., Karlsson, N.G., Khoo, K.-H., Thaysen-Andersen, M., Wells, L., Packer, N.H. (2022) Glycomics and Glycoproteomics, *Essentials of Glycobiology*, doi: 10.1101/GLYCOBIOLOGY.4E.51.
34. LaFramboise, T. (2009) Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances, *Nucleic Acids Res*, **37**, 4181–93, doi: 10.1093/NAR/GKP552.
35. Ng, S.B., Turner, E.H., Robertson, P.D., Flygare, S.D., Bigham, A.W., Lee, C., Shaffer, T., Wong, M., Bhattacharjee, A., Eichler, E.E., Bamshad, M., Nickerson, D.A., Shendure, J. (2009) Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes, *Nature*, **461**, 272–6, doi: 10.1038/NATURE08250.
36. Mehrmohamadi, M., Sepehri, M.H., Nazer, N., Norouzi, M.R. (2021) A Comparative Overview of Epigenomic Profiling Methods, *Front Cell Dev Biol*, **9**, doi: 10.3389/FCELL.2021.714687.
37. Wensel, C.R., Pluznick, J.L., Salzberg, S.L., Sears, C.L. (2022) Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome, *J Clin Invest*, **132**, doi: 10.1172/JCI154944.
38. Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., Shafee, T. (2017) Transcriptomics technologies, *PLoS Comput Biol*, **13**, doi: 10.1371/JOURNAL.PCBI.1005457.
39. Cui, M., Cheng, C., Zhang, L. (2022) High-throughput proteomics: a methodological mini-review, *Lab Invest*, **102**, 1170–81, doi: 10.1038/S41374-022-00830-7.
40. Д.В. Чистяков, Л.В. Коваленко, М.Ю. Донников, М.Г. Сергеева. (2023) Профили оксипинонов в крови как маркеры патогенеза онкологических заболеваний, *Биохимия*, том 88, № 5, стр. 761-772; doi: 10.31857/S0320972523050056.
41. Heo, Y.J., Hwa, C., Lee, G.H., Park, J.M., An, J.Y. (2021) Integrative Multi-Omics Approaches in Cancer Research: From Biological Networks to Clinical Subtypes, *Mol Cells*, **44**, 433–43, doi: 10.14348/MOLCELLS.2021.0042.
42. de Anda-Jáuregui, G., Hernández-Lemus, E. (2020) Computational Oncology in the Multi-Omics Era: State of the Art, *Front Oncol*, **0**, 423, doi: 10.3389/FONC.2020.00423.
43. Stratton, M.R., Campbell, P.J., Futreal, P.A. (2009) The cancer genome, *Nature*, **458**, 719–24, doi: 10.1038/NATURE07943.
44. Ivliev, A.E., 't Hoen, P.A.C., Sergeeva, M.G. (2010) Coexpression network analysis identifies transcriptional modules related to proastrocytic differentiation and sprouty signaling in glioma, *Cancer Res*, **70**, 10060–70, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2465.
45. Ivliev, A.E., 't Hoen, P.A.C., van Roon-Mom, W.M.C., Peters, D.J.M., Sergeeva, M.G. (2012) Exploring the transcriptome of ciliated cells using in silico dissection of human tissues., *PLoS One*, **7**, e35618, doi: 10.1371/journal.pone.0035618.

46. Lancashire, L.J., Lemetre, C., Ball, G.R. (2009) An introduction to artificial neural networks in bioinformatics--application to complex microarray and mass spectrometry datasets in cancer studies, *Brief Bioinform*, **10**, 315–29, doi: 10.1093/BIB/BBP012.
47. Zafeiris, D., Rutella, S., Ball, G.R. (2018) An Artificial Neural Network Integrated Pipeline for Biomarker Discovery Using Alzheimer’s Disease as a Case Study., *Comput Struct Biotechnol J*, **16**, 77–87, doi: 10.1016/j.csbj.2018.02.001.
48. Swan, A.L., Stekel, D.J., Hodgman, C., Allaway, D., Alqahtani, M.H., Mobasheri, A., Bacardit, J. (2015) A machine learning heuristic to identify biologically relevant and minimal biomarker panels from omics data, *BMC Genomics*, **16**, S2, doi: 10.1186/1471-2164-16-S1-S2.
49. Seth Nanda, C., Venkateswaran, S.V., Patani, N., Yuneva, M. (2020) Defining a metabolic landscape of tumours: genome meets metabolism, *Br J Cancer*, **122**, 136–49, doi: 10.1038/S41416-019-0663-7.
50. Terunuma, A., Putluri, N., Mishra, P., Mathé, E.A., Dorsey, T.H., Yi, M., Wallace, T.A., Issaq, H.J., Zhou, M., Keith Killian, J., Stevenson, H.S., Karoly, E.D., Chan, K., Samanta, S., Prieto, D., Hsu, T.Y.T., Kurley, S.J., Putluri, V., Sonavane, R., Edelman, D.C., Wulff, J., Starks, A.M., Yang, Y., Kittles, R.A., Yfantis, H.G., Lee, D.H., Ioffe, O.B., Schiff, R., Stephens, R.M., Meltzer, P.S., Veenstra, T.D., Westbrook, T.F., Sreekumar, A., Ambs, S. (2014) MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis, *J Clin Invest*, **124**, 398–412, doi: 10.1172/JCI71180.
51. Hassan, M.A., Al-Sakkaf, K., Shait Mohammed, M.R., Dallol, A., Al-Maghrabi, J., Aldahlawi, A., Ashoor, S., Maamra, M., Ragoussis, J., Wu, W., Khan, M.I., Al-Malki, A.L., Choudhry, H. (2020) Integration of Transcriptome and Metabolome Provides Unique Insights to Pathways Associated With Obese Breast Cancer Patients, *Front Oncol*, **10**, 804, doi: 10.3389/fonc.2020.00804.
52. Yeung, J., Hawley, M., Holinstat, M. (2017) The expansive role of oxylipins on platelet biology, *J Mol Med*, **95**, 575–88, doi: 10.1007/s00109-017-1542-4.
53. Lone, A.M., Taskén, K. (2013) Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells, *Front Immunol*, **4**, doi: 10.3389/FIMMU.2013.00130.
54. James, M.J., Penglis, P.S., Caughey, G.E., Demasi, M., Cleland, L.G. (2001) Eicosanoid production by human monocytes: Does COX-2 contribute to a self-limiting inflammatory response?, *Inflammation Research*, **50**, 249–53, doi: 10.1007/s000110050750.
55. Bogatcheva, N. V., Sergeeva, M.G., Dudek, S.M., Verin, A.D. (2005) Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology, *Microvasc Res*, **69**, 107–27, doi: 10.1016/j.mvr.2005.01.007.
56. Burla, B., Arita, M., Arita, M., Bendt, A.K., Cazenave-Gassiot, A., Dennis, E.A., Ekroos, K., Han, X., Ikeda, K., Liebisch, G., Lin, M.K., Loh, T.P., Meikle, P.J., Orešič, M., Quehenberger, O., Shevchenko, A., Torta, F., Wakelam, M.J.O., Wheelock, C.E., Wenk, M.R. (2018) MS-based lipidomics of human blood plasma: A community-initiated position paper to develop accepted guidelines, *J Lipid Res*, **59**, 2001–17, doi: 10.1194/jlr.S087163.

57. Morris, J.K., Piccolo, B.D., John, C.S., Green, Z.D., Thyfault, J.P., Adams, S.H. (2019) Oxylipin Profiling of Alzheimer's Disease in Nondiabetic and Type 2 Diabetic Elderly, *Metabolites*, **9**, doi: 10.3390/METABO9090177.
58. Gao, B., Lang, S., Duan, Y., Wang, Y., Shawcross, D.L., Louvet, A., Mathurin, P., Ho, S.B., Stärkel, P., Schnabl, B. (2019) Serum and Fecal Oxylipins in Patients with Alcohol-Related Liver Disease, *Dig Dis Sci*, **64**, 1878–92, doi: 10.1007/s10620-019-05638-y.
59. Quehenberger, O., Armando, A.M., Brown, A.H., Milne, S.B., Myers, D.S., Merrill, A.H., Bandyopadhyay, S., Jones, K.N., Kelly, S., Shaner, R.L., Sullards, C.M., Wang, E., Murphy, R.C., Barkley, R.M., Leiker, T.J., Raetz, C.R.H., Guan, Z., Laird, G.M., Six, D.A., Russell, D.W., McDonald, J.G., Subramaniam, S., Fahy, E., Dennis, E.A. (2010) Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma, *J Lipid Res*, **51**, 3299–305, doi: 10.1194/JLR.M009449.
60. Huynh, K., Barlow, C.K., Jayawardana, K.S., Weir, J.M., Mellett, N.A., Cinel, M., Magliano, D.J., Shaw, J.E., Drew, B.G., Meikle, P.J. (2019) High-Throughput Plasma Lipidomics: Detailed Mapping of the Associations with Cardiometabolic Risk Factors, *Cell Chem Biol*, **26**, 71-84.e4, doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2018.10.008.
61. Bowden, J.A., Heckert, A., Ulmer, C.Z., Jones, C.M., Koelmel, J.P., Abdullah, L., Ahonen, L., Alnouti, Y., Armando, A.M., Asara, J.M., Bamba, T., Barr, J.R., Bergquist, J., Borchers, C.H., Brandsma, J., Breitkopf, S.B., Cajka, T., Cazenave-Gassiot, A., Checa, A., Cinel, M.A., Colas, R.A., Cremers, S., Dennis, E.A., Evans, J.E., Fauland, A., Fiehn, O., Gardner, M.S., Garrett, T.J., Gotlinger, K.H., Han, J., Huang, Y., Neo, A.H., Hyötyläinen, T., Izumi, Y., Jiang, H., Jiang, H., Jiang, J., Kachman, M., Kiyonami, R., Klavins, K., Klose, C., Köfeler, H.C., Kolmert, J., Koal, T., Koster, G., Kuklenyik, Z., Kurland, I.J., Leadley, M., Lin, K., Maddipati, K.R., McDougall, D., Meikle, P.J., Mellett, N.A., Monnin, C., Moseley, M.A., Nandakumar, R., Oresic, M., Patterson, R., Peake, D., Pierce, J.S., Post, M., Postle, A.D., Pugh, R., Qiu, Y., Quehenberger, O., Ramrup, P., Rees, J., Rembiesa, B., Reynaud, D., Roth, M.R., Sales, S., Schuhmann, K., Schwartzman, M.L., Serhan, C.N., Shevchenko, A., Somerville, S.E., St John-Williams, L., Surma, M.A., Takeda, H., Thakare, R., Thompson, J.W., Torta, F., Triebel, A., Trötzmüller, M., Ubhayasekera, S.J.K., Vuckovic, D., Weir, J.M., Welti, R., Wenk, M.R., Wheelock, C.E., Yao, L., Yuan, M., Zhao, X.H., Zhou, S. (2017) Harmonizing lipidomics: NIST interlaboratory comparison exercise for lipidomics using SRM 1950-Metabolites in Frozen Human Plasma, *J Lipid Res*, **58**, 2275–88, doi: 10.1194/JLR.M079012.
62. Koch, E., Mainka, M., Dalle, C., Ostermann, A.I., Rund, K.M., Kutzner, L., Froehlich, L.F., Bertrand-Michel, J., Gladine, C., Schebb, N.H. (2020) Stability of oxylipins during plasma generation and long-term storage, *Talanta*, **217**, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121074.
63. Liakh, I., Pakiet, A., Sledzinski, T., Mika, A. (2020) Methods of the analysis of oxylipins in biological samples, *Molecules*, **25**, doi: 10.3390/molecules25020349.
64. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646–74, doi: 10.1016/J.CELL.2011.02.013.

65. Wang, D., Dubois, R.N. (2010) Eicosanoids and cancer, *Nat Rev Cancer*, **10**, 181–93, doi: 10.1038/NRC2809.
66. Butler, L.M., Perone, Y., Dehairs, J., Lupien, L.E., de Laat, V., Talebi, A., Loda, M., Kinlaw, W.B., Swinnen, J. V. (2020) Lipids and cancer: Emerging roles in pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention, *Adv Drug Deliv Rev*, **159**, 245–93, doi: 10.1016/j.addr.2020.07.013.
67. Azrad, M., Turgeon, C., Demark-Wahnefried, W. (2013) Current evidence linking polyunsaturated Fatty acids with cancer risk and progression, *Front Oncol*, **3**, doi: 10.3389/FONC.2013.00224.
68. Markosyan, N., Chen, E.P., Smyth, E.M. (2014) Targeting COX-2 abrogates mammary tumorigenesis: Breaking cancer-associated suppression of immunosurveillance, *Oncoimmunology*, **3**, e29287, doi: 10.4161/ONCI.29287.
69. Johnson, A.M., Kleczko, E.K., Nemenoff, R.A. (2020) Eicosanoids in Cancer: New Roles in Immunoregulation, *Front Pharmacol*, **11**, doi: 10.3389/FPHAR.2020.595498.
70. Catalano, A., Procopio, A. (2005) New aspects on the role of lipoxygenases in cancer progression, *Histol Histopathol*, **20**, 969–75, doi: 10.14670/HH-20.969.
71. Wang, Q., Morris, R.J., Bode, A.M., Zhang, T. (2022) Prostaglandin Pathways: Opportunities for Cancer Prevention and Therapy, *Cancer Res*, **82**, 949–65, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-2297.
72. Luo, Y., Liu, J.Y. (2020) Pleiotropic Functions of Cytochrome P450 Monooxygenase-Derived Eicosanoids in Cancer, *Front Pharmacol*, **11**, doi: 10.3389/FPHAR.2020.580897.
73. Mahapatra, A. Das., Choubey, R., Datta, B. (2020) Small Molecule Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors in Multitarget and Combination Therapies for Inflammation and Cancer, *Molecules*, **25**, doi: 10.3390/MOLECULES25235488.
74. Bruno, R.D., Njar, V.C.O. (2007) Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development, *Bioorg Med Chem*, **15**, 5047–60, doi: 10.1016/J.BMC.2007.05.046.
75. Laezza, C., Pagano, C., Navarra, G., Pastorino, O., Proto, M.C., Fiore, D., Piscopo, C., Gazzero, P., Bifulco, M. (2020) The Endocannabinoid System: A Target for Cancer Treatment, *Int J Mol Sci*, **21**, doi: 10.3390/IJMS21030747.
76. Chocholoušková, M., Jirásko, R., Vrána, D., Gatěk, J., Melichar, B., Holčapek, M. (2019) Reversed phase UHPLC/ESI-MS determination of oxylipins in human plasma: a case study of female breast cancer, *Anal Bioanal Chem*, **411**, 1239–51, doi: 10.1007/s00216-018-1556-y.
77. Zheng, J., Zheng, Y., Li, W., Zhi, J., Huang, X., Zhu, W., Liu, Z., Gong, L. (2022) Combined metabolomics with transcriptomics reveals potential plasma biomarkers correlated with non-small-cell lung cancer proliferation through the Akt pathway, *Clin Chim Acta*, **530**, 66–73, doi: 10.1016/J.CCA.2022.02.018.
78. Zhang, J., Yang, Q., Li, J., Zhong, Y., Zhang, L., Huang, Q., Chen, B., Mo, M., Shen, S., Zhong, Q., Liu, H., Cai, C. (2017) Distinct differences in serum eicosanoids in healthy, enteritis and colorectal cancer individuals, *Metabolomics*, **14**, doi: 10.1007/S11306-017-1293-9.

79. Guo, J., Pan, Y., Chen, J., Jin, P., Tang, S., Wang, H., Su, H., Wang, Q., Chen, C., Xiong, F., Liu, K., Li, Y., Su, M., Tang, T., He, Y., Sheng, J. (2023) Serum metabolite signatures in normal individuals and patients with colorectal adenoma or colorectal cancer using UPLC-MS/MS method, *J Proteomics*, **270**, doi: 10.1016/J.JPROT.2022.104741.
80. Zhang, L. jian., Chen, B., Zhang, J. jie., Li, J., Yang, Q., Zhong, Q. sheng., Zhan, S., Liu, H., Cai, C. (2017) Serum polyunsaturated fatty acid metabolites as useful tool for screening potential biomarker of colorectal cancer, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **120**, 25–31, doi: 10.1016/J.PLEFA.2017.04.003.
81. Liu, J., Mazzone, P.J., Cata, J.P., Kurz, A., Bauer, M., Mascha, E.J., Sessler, D.I. (2014) Serum Free Fatty Acid Biomarkers of Lung Cancer, *Chest*, **146**, 670–9, doi: 10.1378/CHEST.13-2568.
82. Fitian, A.I., Nelson, D.R., Liu, C., Xu, Y., Ararat, M., Cabrera, R. (2014) Integrated metabolomic profiling of hepatocellular carcinoma in hepatitis C cirrhosis through GC/MS and UPLC/MS-MS, *Liver Int*, **34**, 1428–44, doi: 10.1111/LIV.12541.
83. Gong, Z.G., Zhao, W., Zhang, J., Wu, X., Hu, J., Yin, G.C., Xu, Y.J. (2017) Metabolomics and eicosanoid analysis identified serum biomarkers for distinguishing hepatocellular carcinoma from hepatitis B virus-related cirrhosis, *Oncotarget*, **8**, 63890–900, doi: 10.18632/ONCOTARGET.19173.
84. Rodríguez-Blanco, G., Burgers, P.C., Dekker, L.J.M., Ijzermans, J.J.N., Wildhagen, M.F., Schenk-Braat, E.A.M., Bangma, C.H., Jenster, G., Luiders, T.M. (2014) Serum levels of arachidonic acid metabolites change during prostate cancer progression, *Prostate*, **74**, 618–27, doi: 10.1002/PROS.22779.
85. Pruijboom, W.M., Bac, D.J., Van Dijk, A.P.M., Garrelds, I.M., Tak, C.J.A.M., Bonta, I.L., Wilson, J.H.P., Zijlstra, F.J. (1995) Levels of soluble intercellular adhesion molecule 1, eicosanoids and cytokines in ascites of patients with liver cirrhosis, peritoneal cancer and spontaneous bacterial peritonitis, *Int J Immunopharmacol*, **17**, 375–84, doi: 10.1016/0192-0561(95)00015-T.
86. Hada, M., Edin, M.L., Hartge, P., Lih, F.B., Wentzensen, N., Zeldin, D.C., Trabert, B. (2019) Prediagnostic Serum Levels of Fatty Acid Metabolites and Risk of Ovarian Cancer in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **28**, 189–97, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0392.
87. Murakami, M., Sato, H., Taketomi, Y. (2020) Updating Phospholipase A2 Biology, *Biomolecules*, **10**, 1–33, doi: 10.3390/BIOM10101457.
88. Nagarajan, S.R., Butler, L.M., Hoy, A.J. (2021) The diversity and breadth of cancer cell fatty acid metabolism, *Cancer & Metabolism 2021 9:1*, **9**, 1–28, doi: 10.1186/S40170-020-00237-2.
89. Hajeyah, A.A., Griffiths, W.J., Wang, Y., Finch, A.J., O'Donnell, V.B. (2020) The Biosynthesis of Enzymatically Oxidized Lipids, *Front Endocrinol (Lausanne)*, **11**, doi: 10.3389/FENDO.2020.591819.
90. Guzman-Martinez, L., Maccioni, R.B., Andrade, V., Navarrete, L.P., Pastor, M.G., Ramos-Escobar, N. (2019) Neuroinflammation as a Common Feature of Neurodegenerative Disorders, *Front Pharmacol*, **10**, doi: 10.3389/FPHAR.2019.01008.

91. Prasad, K.N., Hovland, A.R., La Rosa, F.G., Hovland, P.G. (1998) in *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* vol. 219, Proc Soc Exp Biol Med, pp. 120–5.
92. Ebstein, R.P., Oppenheim, G., Stessman, J. (1984) Alzheimer's disease: Isoproterenol and prostaglandin E1-stimulated cyclic AMP accumulation in lymphocytes, *Life Sci*, **34**, 2239–43, doi: 10.1016/0024-3205(84)90211-X.
93. Borkowski, K., Taha, A.Y., Pedersen, T.L., De Jager, P.L., Bennett, D.A., Arnold, M., Kaddurah-Daouk, R., Newman, J.W. (2021) Serum metabolomic biomarkers of perceptual speed in cognitively normal and mildly impaired subjects with fasting state stratification, *Sci Rep*, **11**, doi: 10.1038/s41598-021-98640-2.
94. Mastrogiovanni, M., Trostchansky, A., Naya, H., Dominguez, R., Marco, C., Povedano, M., López-Vales, R., Rubbo, H. (2022) HPLC-MS/MS Oxylipin Analysis of Plasma from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients, *Biomedicines*, **10**, doi: 10.3390/biomedicines10030674.
95. Zhang, J., Liu, L., Zhang, L., Chen, S., Chen, Y., Cai, C. (2021) Targeted fatty acid metabolomics to discover Parkinson's disease associated metabolic alteration, *Journal of Mass Spectrometry*, **56**, doi: 10.1002/jms.4781.
96. Chistyakov, D. V., Azbukina, N. V., Lopachev, A. V., Goriainov, S. V., Astakhova, A.A., Ptitsyna, E. V., Klimenko, A.S., Poleshuk, V. V., Kazanskaya, R.B., Fedorova, T.N., Sergeeva, M.G. (2024) Plasma oxylipin profiles reflect Parkinson's disease stage, *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **171**, doi: 10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2023.106788.
97. Stirton, H., Meek, B.P., Edell, A.L., Solati, Z., Surendran, A., Aukema, H., Modirrousta, M., Ravandi, A. (2021) Oxolipidomics profile in major depressive disorder: Comparing remitters and non-remitters to repetitive transcranial magnetic stimulation treatment, *PLoS One*, **16**, doi: 10.1371/journal.pone.0246592.
98. Iuliano, L., Pacelli, A., Ciacciarelli, M., Zerbinati, C., Fagioli, S., Piras, F., Orfei, M.D., Bossù, P., Pazzelli, F., Serviddio, G., Caltagirone, C., Spalletta, G. (2013) Plasma fatty acid lipidomics in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimer's Disease*, **36**, 545–53, doi: 10.3233/JAD-122224.
99. Peña-Bautista, C., López-Cuevas, R., Cuevas, A., Baquero, M., Cháfer-Pericás, C. (2019) Lipid peroxidation biomarkers correlation with medial temporal atrophy in early Alzheimer Disease, *Neurochem Int*, **129**, doi: 10.1016/j.neuint.2019.104519.
100. Zhao, H., Wang, C., Zhao, N., Li, W., Yang, Z., Liu, X., Le, W., Zhang, X. (2018) Potential biomarkers of Parkinson's disease revealed by plasma metabolic profiling, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **1081–1082**, 101–8, doi: 10.1016/j.jchromb.2018.01.025.
101. Seet, R.C.S., Lee, C.Y.J., Lim, E.C.H., Tan, J.J.H., Quek, A.M.L., Chong, W.L., Looi, W.F., Huang, S.H., Wang, H., Chan, Y.H., Halliwell, B. (2010) Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers, *Free Radic Biol Med*, **48**, 560–6, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.026.
102. Klatt-Schreiner, K., Valek, L., Kang, J.S., Khlebtovsky, A., Trautmann, S., Hahnefeld, L., Schreiber, Y., Gurke, R., Thomas, D., Wilken-Schmitz, A., Wicker, S., Auburger, G., Geisslinger, G., Lötsch, J., Pfeilschifter, W., Djaldetti, R., Tegeder, I. (2020) High

- Glucosylceramides and Low Anandamide Contribute to Sensory Loss and Pain in Parkinson's Disease, *Movement Disorders*, **35**, 1822–33, doi: 10.1002/mds.28186.
103. Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity., *Nat Rev Immunol*, **1**, 135–45, doi: 10.1038/35100529.
  104. Takeda, K., Akira, S. (2015) Toll-like receptors., **109**, 14.12.1-10, doi: 10.1002/0471142735.im1412s109.
  105. Medzhitov, R., Schneider, D.S., Soares, M.P. (2012) Disease tolerance as a defense strategy., *Science*, **335**, 936–41.
  106. Medzhitov, R., Horng, T. (2009) Transcriptional control of the inflammatory response., *Nat Rev Immunol*, **9**, 692–703.
  107. Newton, K., Dixit, V.M. (2012) Signaling in innate immunity and inflammation., *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a006049–a006049, doi: 10.1101/cshperspect.a006049.
  108. Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Serhan, C.N., Stockinger, B., Tak, P.P. (2013) The resolution of inflammation., *Nat Rev Immunol*, **13**, 59–66, doi: 10.1038/nri3362.
  109. Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D.W., Fasano, A., Miller, G.W., Miller, A.H., Mantovani, A., Weiland, C.M., Barzilai, N., Goronzy, J.J., Rando, T.A., Effros, R.B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., Slavich, G.M. (2019) Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span, *Nat Med*, **25**, 1822–32, doi: 10.1038/S41591-019-0675-0.
  110. Venero, J., Espinosa-Oliva, A., Herrera, A., Oliva-Martin, M., de Pablos, R., Carrillo-Jimenez, A. (2015) Collateral Damage: Contribution of Peripheral Inflammation to Neurodegenerative Diseases, *Curr Top Med Chem*, **15**, 2193–210, doi: 10.2174/1568026615666150610142027.
  111. Chamorro, Á. (2004) Role of inflammation in stroke and atherothrombosis, *Cerebrovascular Diseases*, **17**, 1–5, doi: 10.1159/000075297.
  112. Ross, J.S., Chou, C.J., Xu, H., Yang, D., Nichols, A., Sole, J., Tartaglia, L.A., Yang, Q., Chen, H., Tan, G., Barnes, G.T. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, *Journal of Clinical Investigation*, **112**, 1821–30, doi: 10.1172/jci200319451.
  113. Gilroy, D.W., Bishop-Bailey, D. (2019) Lipid mediators in immune regulation and resolution, *Br J Pharmacol*, **176**, 1009–23, doi: 10.1111/bph.14587.
  114. Kawasaki, T., Kawai, T. (2014) Toll-like receptor signaling pathways, *Front Immunol*, **461**, doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
  115. Chistyakov, D. V., Astakhova, A.A., Sergeeva, M.G. (2018) Resolution of inflammation and mood disorders, *Exp Mol Pathol*, **105**, 190–201, doi: 10.1016/j.yexmp.2018.08.002.
  116. Chistyakov, D.V.D.V., Aleshin, S., Sergeeva, M.G.M.G., Reiser, G. (2014) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  expression and activity levels by toll-like receptor agonists and MAP kinase inhibitors in rat astrocytes, *J Neurochem*, **130**, 563–74, doi: 10.1111/jnc.12757.
  117. Chistyakov, D.V.D.V., Aleshin, S.E., Astakhova, A.A.A.A., Sergeeva, M.G.M.G., Reiser, G. (2015) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)  $\alpha$  and  $\gamma$  of rat brain astrocytes in the course of activation by toll-like receptor agonists, *J Neurochem*, **134**, 113–24, doi: 10.1111/jnc.13101.

118. Akira, S., Saitoh, T., Matsushita, K., Takeuchi, O. (2010) Negative Regulators in Toll-like Receptor Responses, *Cornea*, **29**, S13–9, doi: 10.1097/ICO.0b013e3181ea4834.
119. Nathan, C., Ding, A. (2010) Nonresolving Inflammation, *Cell*, 871–82, doi: 10.1016/j.cell.2010.02.029.
120. Anderson, P. (2010) Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation, *Nat Rev Immunol*, **10**, 24–35, doi: 10.1038/nri2685.
121. Kumar, V. (2020) Toll-like receptors in sepsis-associated cytokine storm and their endogenous negative regulators as future immunomodulatory targets, *Int Immunopharmacol*, **89**, doi: 10.1016/J.INTIMP.2020.107087.
122. Serhan, C.N. (2017) Treating inflammation and infection in the 21st century: New hints from decoding resolution mediators and mechanisms, *FASEB Journal*, **31**, 1273–88, doi: 10.1096/fj.201601222R.
123. Serhan, C.N. (2014) Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology., *Nature*, **510**, 92–101, doi: 10.1038/nature13479.
124. Brown, G.C. (2019) The endotoxin hypothesis of neurodegeneration, *J Neuroinflammation*, **16**, 180, doi: 10.1186/s12974-019-1564-7.
125. Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O’Neill, L.A.J., Perretti, M., Rossi, A.G., Wallace, J.L. (2007) Resolution of inflammation: State of the art, definitions and terms, *FASEB Journal*, **21**, 325–32, doi: 10.1096/fj.06-7227rev.
126. Rajakariar R, et al., Rajakariar, R., Yaqoob, M.M., Gilroy, D.W. (2006) COX-2 in inflammation and resolution., *Mol Interv.* , **6**, 199-207., doi: 10.1124/mi.6.4.6.
127. Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Serhan, C.N. (2014) Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation., *Immunity*, **40**, 315–27, doi: 10.1016/j.immuni.2014.02.009.
128. Serhan, C.N. (2007) Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways., *Annu Rev Immunol*, **25**, 101–37, doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647.
129. Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S. (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity., *Nat Rev Immunol*, **11**, 519–31, doi: 10.1038/nri3024.
130. Stables, M.J., Shah, S., Camon, E.B., Lovering, R.C., Newson, J., Bystrom, J., Farrow, S., Gilroy, D.W. (2011) Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages., *Blood*, **118**, e192-208, doi: 10.1182/blood-2011-04-345330.
131. Nadjar, A., Leyrolle, Q., Joffre, C., Laye, S. (2017) Bioactive lipids as new class of microglial modulators: When nutrition meets neuroimmunology, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **79**, 19–26, doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.07.004.
132. Ghosal, A., Sekar, T. V., Said, H.M. (2014) Biotin uptake by mouse and human pancreatic beta cells/islets: a regulated, lipopolysaccharide-sensitive carrier-mediated process., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **307**, G365-73, doi: 10.1152/ajpgi.00157.2014.
133. Miller, L.S., Modlin, R.L. (2007) Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses., *J Invest Dermatol*, **127**, 262–3, doi: 10.1038/sj.jid.5700559.
134. Patel, H., Shaw, S.G., Shi-Wen, X., Abraham, D., Baker, D.M., Tsui, J.C.S. (2012) Toll-like receptors in ischaemia and its potential role in the pathophysiology of muscle

- damage in critical limb ischaemia, *Cardiol Res Pract*, 121237, doi: 10.1155/2012/121237.
135. Portou, M.J., Baker, D., Abraham, D., Tsui, J. (2015) The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review, *Vascul Pharmacol*, 31–6, doi: 10.1016/j.vph.2015.02.007.
  136. Sofroniew, M. V., Vinters, H. V. (2010) Astrocytes: biology and pathology., *Acta Neuropathol*, **119**, 7–35, doi: 10.1007/s00401-009-0619-8.
  137. Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O’Callaghan, J.P., Petzold, G.C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N.J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D.E., Bonvento, G., Butt, A.M., Chen, W.T., Cohen-Salmon, M., Cunningham, C., Deneen, B., De Strooper, B., Díaz-Castro, B., Farina, C., Freeman, M., Gallo, V., Goldman, J.E., Goldman, S.A., Götz, M., Gutiérrez, A., Haydon, P.G., Heiland, D.H., Hol, E.M., Holt, M.G., Iino, M., Kastanenka, K. V., Kettenmann, H., Khakh, B.S., Koizumi, S., Lee, C.J., Liddelow, S.A., MacVicar, B.A., Magistretti, P., Messing, A., Mishra, A., Molofsky, A. V., Murai, K.K., Norris, C.M., Okada, S., Oliet, S.H.R., Oliveira, J.F., Panatier, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M., Pellerin, L., Perea, G., Pérez-Nievas, B.G., Pfrieder, F.W., Poskanzer, K.E., Quintana, F.J., Ransohoff, R.M., Riquelme-Perez, M., Robel, S., Rose, C.R., Rothstein, J.D., Rouach, N., Rowitch, D.H., Semyanov, A., Sirko, S., Sontheimer, H., Swanson, R.A., Vitorica, J., Wanner, I.B., Wood, L.B., Wu, J., Zheng, B., Zimmer, E.R., Zorec, R., Sofroniew, M. V., Verkhratsky, A. (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions, *Nat Neurosci*, **24**, 312–25, doi: 10.1038/s41593-020-00783-4.
  138. Liddelow, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.S., Peterson, T.C., Wilton, D.K., Frouin, A., Napier, B.A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M.S., Rowitch, D.H., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Stevens, B., Barres, B.A. (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia, *Nature*, **541**, 481–7, doi: 10.1038/nature21029.
  139. Sofroniew, M. V. (2015) Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation., *Nat Rev Neurosci*, **16**, 249–63, doi: 10.1038/nrn3898.
  140. Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity, *Trends Immunol*, **28**, 138–45, doi: S1471-4906(07)00024-5 [pii] 10.1016/j.it.2007.01.005.
  141. Rothhammer, V., Quintana, F.J. (2015) Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes., *Semin Immunopathol*, **37**, 625–38, doi: 10.1007/s00281-015-0515-3.
  142. Cunningham, C., Dunne, A., Lopez-Rodriguez, A.B. (2019) Astrocytes: Heterogeneous and Dynamic Phenotypes in Neurodegeneration and Innate Immunity, *Neuroscientist*, **25**, 455–74, doi: 10.1177/1073858418809941.
  143. Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., Barres, B.A. (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis, *Journal of Neuroscience*, **32**, 6391–410, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.
  144. Moinfar, Z., Dambach, H., Faustmann, P.M. (2014) Influence of drugs on gap junctions in glioma cell lines and primary astrocytes in vitro, *Front Physiol*, **5** MAY, doi: 10.3389/fphys.2014.00186.

145. Matejuk, A., Ransohoff, R.M. (2020) Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview, *Front Immunol*, **11**, doi: 10.3389/fimmu.2020.01416.
146. Du, F., Qian, Z.M., Zhu, L., Wu, X.M., Qian, C., Chan, R., Ke, Y. (2010) Purity, cell viability, expression of GFAP and bystin in astrocytes cultured by different procedures, *J Cell Biochem*, **109**, 30–7, doi: 10.1002/jcb.22375.
147. Chistyakov, D. V., Astakhova, A.A., Azbukina, N. V., Goriainov, S. V., Chistyakov, V. V., Sergeeva, M.G. (2019) High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Influences Oxylipins Synthesis in Course of Neuroinflammation, *Int J Mol Sci*, **20**, 3894, doi: 10.3390/ijms20163894.
148. Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., de Assis, A.M., Gonçalves, C.A., Souza, D.O. (2017) Fluctuations in glucose levels induce glial toxicity with glutamatergic, oxidative and inflammatory implications, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, **1863**, 1–14, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.09.013.
149. Hsieh, H.L., Chi, P.L., Lin, C.C., Yang, C.C., Yang, C.M. (2014) Up-regulation of ROS-Dependent Matrix Metalloproteinase-9 from High-Glucose-Challenged Astrocytes Contributes to the Neuronal Apoptosis, *Mol Neurobiol*, **50**, 520–33, doi: 10.1007/s12035-013-8628-y.
150. Mosser, D.M., Edwards, J.P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nat Rev Immunol*, **8**, 958–69, doi: 10.1038/nri2448.
151. Lawrence, T., Natoli, G. (2011) Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity, *Nat Rev Immunol*, **11**, 750–61, doi: 10.1038/nri3088.
152. Colson, C., Ghandour, R.A., Dufies, O., Rekima, S., Loubat, A., Munro, P., Boyer, L., Pisani, D.F. (2019) Diet supplementation in  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acid favors an anti-inflammatory basal environment in mouse adipose tissue, *Nutrients*, **11**, doi: 10.3390/nu11020438.
153. Song, M.Y., Wang, J., Lee, Y., Lee, J., Kwon, K.S., Bae, E.J., Park, B.H. (2016) Enhanced M2 macrophage polarization in high n-3 polyunsaturated fatty acid transgenic mice fed a high-fat diet, *Mol Nutr Food Res*, **60**, 2481–92, doi: 10.1002/mnfr.201600014.
154. Jang, E., Kim, J.-H., Lee, S., Kim, J.-H., Seo, J.-W., Jin, M., Lee, M.-G., Jang, I.-S., Lee, W.-H., Suk, K. (2013) Phenotypic Polarization of Activated Astrocytes: The Critical Role of Lipocalin-2 in the Classical Inflammatory Activation of Astrocytes, *The Journal of Immunology*, **191**, 5204–19, doi: 10.4049/jimmunol.1301637.
155. Tarassishin, L., Suh, H.S., Lee, S.C. (2014) LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: Role of CD14, *Glia*, **62**, 999–1013, doi: 10.1002/glia.22657.
156. Von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.H., Adler, G., Kirsch, J. (2004) Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia, *Gut*, **53**, 222–8, doi: 10.1136/gut.2003.012625.
157. Derecki, N.C., Cardani, A.N., Yang, C.H., Quinnes, K.M., Crihfield, A., Lynch, K.R., Kipnis, J. (2010) Regulation of learning and memory by meningeal immunity: A key role for IL-4, *Journal of Experimental Medicine*, **207**, 1067–80, doi: 10.1084/jem.20091419.

158. Bélanger, M., Allaman, I., Magistretti, P.J. (2011) Differential effects of pro- and anti-inflammatory cytokines alone or in combinations on the metabolic profile of astrocytes, *J Neurochem*, **116**, 564–76, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07135.x.
159. Zwain, I.H., Yen, S.S.C. (1999) Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain, *Endocrinology*, **140**, 3843–52, doi: 10.1210/endo.140.8.6907.
160. Sasano, H., Suzuki, T., Harada, N. (1998) From Endocrinology to Intracrinology, *Endocr Pathol*, **9**, 9–20, doi: 10.1007/BF02739947.
161. Arbo, B.D., Bennetti, F., Ribeiro, M.F. (2016) Astrocytes as a target for neuroprotection: Modulation by progesterone and dehydroepiandrosterone., *Prog Neurobiol*, **144**, 27–47, doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.03.010.
162. Acáz-Fonseca, E., Avila-Rodriguez, M., Garcia-Segura, L.M., Barreto, G.E. (2016) Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions., *Prog Neurobiol*, **144**, 5–26, doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.06.002.
163. Pace, S., Rossi, A., Krauth, V., Dehm, F., Troisi, F., Bilancia, R., Weinigel, C., Rummeler, S., Werz, O., Sautebin, L. (2017) Sex differences in prostaglandin biosynthesis in neutrophils during acute inflammation, *Sci Rep*, **7**, 3759, doi: 10.1038/s41598-017-03696-8.
164. Nelson, L.H., Lenz, K.M. (2017) The immune system as a novel regulator of sex differences in brain and behavioral development., *J Neurosci Res*, **95**, 447–61, doi: 10.1002/jnr.23821.
165. Cosimo Melcangi, R., Garcia-Segura, L.M. (2010) Sex-specific therapeutic strategies based on neuroactive steroids: In search for innovative tools for neuroprotection., *Horm Behav*, **57**, 2–11, doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.06.001.
166. Astiz, M., Acáz-Fonseca, E., Garcia-Segura, L.M. (2014) Sex differences and effects of estrogenic compounds on the expression of inflammatory molecules by astrocytes exposed to the insecticide dimethoate, *Neurotox Res*, **25**, 271–85, doi: 10.1007/s12640-013-9417-0.
167. Ezio, G., Giancarlo, P. (2018) Sex and Gender Differences in the Brain Cholinergic System and in the Response to Therapy of Alzheimer Disease with Cholinesterase Inhibitors, *Curr Alzheimer Res*, **15**, doi: 10.2174/1567205015666180613111504.
168. Schwarz, J.M., Bilbo, S.D. (2012) Sex, glia, and development: interactions in health and disease., *Horm Behav*, **62**, 243–53, doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.02.018.
169. Achiron, A., Gurevich, M. (2009) Gender effects in relapsing-remitting multiple sclerosis: correlation between clinical variables and gene expression molecular pathways., *J Neurol Sci*, **286**, 47–53, doi: 10.1016/j.jns.2009.06.038.
170. Jobin, C., Larochelle, C., Parpal, H., Coyle, P.K., Duquette, P. (2010) Gender issues in multiple sclerosis: An update, *Women's Health*, **6**, 797–820, doi: 10.2217/whe.10.69.
171. Hanamsagar, R., Bilbo, S.D. (2016) Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: Focus on microglial function and neuroinflammation during development, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **160**, 127–33, doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.09.039.
172. Loram, L.C., Sholar, P.W., Taylor, F.R., Wiesler, J.L., Babb, J.A., Strand, K.A., Berkelhammer, D., Day, H.E.W., Maier, S.F., Watkins, L.R. (2012) Sex and estradiol

- influence glial pro-inflammatory responses to lipopolysaccharide in rats, *Psychoneuroendocrinology*, **37**, 1688–99, doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.02.018.
173. McCarthy, M.M. (2018) Sex differences in neuroimmunity as an inherent risk factor, *Neuropsychopharmacology*, 1–7, doi: 10.1038/s41386-018-0138-1.
  174. Bakheet, T., Williams, B.R.G., Khabar, K.S.A. (2006) ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome., *Nucleic Acids Res*, **34**, D111-4, doi: 10.1093/nar/gkj052.
  175. Taylor, G.A., Thompson, M.J., Lai, W.S., Blackshear, P.J. (1996) Mitogens stimulate the rapid nuclear to cytosolic translocation of tristetraprolin, a potential zinc-finger transcription factor., *Mol Endocrinol*, **10**, 140–6, doi: 10.1210/mend.10.2.8825554.
  176. Rappl, P., Brüne, B., Schmid, T. (2021) Role of Tristetraprolin in the Resolution of Inflammation, *Biology (Basel)*, **10**, 1–12, doi: 10.3390/BIOLOGY10010066.
  177. Brennan, C.M., Steitz, J.A. (2001) HuR and mRNA stability., *Cell Mol Life Sci*, **58**, 266–77, doi: 10.1007/PL00000854.
  178. Lin, F.Y., Chen, Y.H., Lin, Y.W., Tsai, J.S., Chen, J.W., Wang, H.J., Chen, Y.L., Li, C.Y., Lin, S.J. (2006) The role of human antigen R, an RNA-binding protein, in mediating the stabilization of toll-like receptor 4 mRNA induced by endotoxin: A novel mechanism involved in vascular inflammation, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 2622–9, doi: 10.1161/01.ATV.0000246779.78003.cf.
  179. Rhee, W.J., Ni, C.-W., Zheng, Z., Chang, K., Jo, H., Bao, G. (2010) HuR regulates the expression of stress-sensitive genes and mediates inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 6858–63, doi: 10.1073/pnas.1000444107.
  180. Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Lal, A., Pullmann, R., Yang, X., Galban, S., Srikantan, S., Martindale, J.L., Blethrow, J., Shokat, K.M., Gorospe, M. (2008) Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1., *Genes Dev*, **22**, 1804–15, doi: 10.1101/gad.1645808.
  181. Diaz-Muñoz, M.D., Bell, S.E., Fairfax, K., Monzon-Casanova, E., Cunningham, A.F., Gonzalez-Porta, M., Andrews, S.R., Bunik, V.I., Zarnack, K., Curk, T., Heggermont, W.A., Heymans, S., Gibson, G.E., Kontoyiannis, D.L., Ule, J., Turner, M. (2015) The RNA-binding protein HuR is essential for the B cell antibody response, *Nat Immunol*, **16**, 415–25, doi: 10.1038/ni.3115.
  182. Mahtani, K.R., Brook, M., Dean, J.L., Sully, G., Saklatvala, J., Clark, A.R. (2001) Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability., *Mol Cell Biol*, **21**, 6461–9, doi: 10.1128/MCB.21.9.6461.
  183. Abdelmohsen, K., Gorospe, M. (2010) Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR, *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 214–29, doi: 10.1002/wrna.4.
  184. Lee, J., Kim, H., Woo, J., Joe, E., Jou, I. (2012) 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid suppresses CCL2/MCP-1 expression in IFN- $\gamma$ -stimulated astrocytes by increasing MAPK phosphatase-1 mRNA stability, *J Neuroinflammation*, **9**, 34, doi: 10.1186/1742-2094-9-34.
  185. Woo, J.H., Lee, J.H., Kim, H., Choi, Y., Park, S.M., Joe, E., Jou, I. (2015) MAP kinase phosphatase-1 expression is regulated by 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 via a HuR-

- dependent post-transcriptional mechanism., *Biochim Biophys Acta*, **1849**, 612–25, doi: 10.1016/j.bbagr.2015.03.004.
186. Srikantan, S., Gorospe, M. (2012) HuR function in disease, *Front Biosci (Landmark Ed)*, **17**, 189–205, doi: 10.2741/3921.
  187. Lu, L., Zheng, L., Si, Y., Luo, W., Dujardin, G., Kwan, T., Potochick, N.R., Thompson, S.R., Schneider, D.A., King, P.H. (2014) Hu antigen R (HuR) is a positive regulator of the RNA-binding proteins TDP-43 and FUS/TLS: Implications for amyotrophic lateral sclerosis, *Journal of Biological Chemistry*, **289**, 31792–804, doi: 10.1074/jbc.M114.573246.
  188. Lisi, L., Navarra, P., Feinstein, D.L., Dello Russo, C. (2011) The mTOR kinase inhibitor rapamycin decreases iNOS mRNA stability in astrocytes, *J Neuroinflammation*, **8**, 1, doi: 10.1186/1742-2094-8-1.
  189. Tomlinson, D.R., Gardiner, N.J. (2008) Glucose neurotoxicity, *Nat Rev Neurosci*, **9**, 36–45, doi: 10.1038/nrn2294.
  190. Barrett, T.G., Bunday, S.E., Macleod, A.F. (1995) Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome, *The Lancet*, **346**, 1458–63, doi: 10.1016/S0140-6736(95)92473-6.
  191. Chen, J., Cui, X., Zacharek, A., Cui, Y., Roberts, C., Chopp, M. (2011) White matter damage and the effect of matrix metalloproteinases in type 2 diabetic mice after stroke, *Stroke*, **42**, 445–52, doi: 10.1161/STROKEAHA.110.596486.
  192. Ristow, M. (2004) Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus, *J Mol Med*, **82**, 510–29, doi: 10.1007/s00109-004-0552-1.
  193. Gandhi, G.K., Ball, K.K., Cruz, N.F., Diemel, G.A. (2010) Hyperglycaemia and Diabetes Impair Gap Junctional Communication among Astrocytes, *ASN Neuro*, **2**, AN20090048, doi: 10.1042/AN20090048.
  194. Wang, J., Li, G., Wang, Z., Zhang, X., Yao, L., Wang, F., Liu, S., Yin, J., Ling, E.A., Wang, L., Hao, A. (2012) High glucose-induced expression of inflammatory cytokines and reactive oxygen species in cultured astrocytes., *Neuroscience*, **202**, 58–68, doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.062.
  195. Giordano, C., Marchiò, M., Timofeeva, E., Biagini, G. (2014) Neuroactive peptides as putative mediators of antiepileptic ketogenic diets, *Front Neurol*, **5 APR**, doi: 10.3389/fneur.2014.00063.
  196. Stafstrom, C.E. (2003) Hyperglycemia Lowers Seizure Threshold, *Epilepsy Curr*, **3**, 148–9, doi: 10.1046/j.1535-7597.2003.03415.x.
  197. Duran, J., Gruart, A., López-Ramos, J.C., Delgado-García, J.M., Guinovart, J.J. (2019) in *Advances in Neurobiology* vol. 23, Springer New York LLC, pp. 311–29.
  198. Bélanger, M., Allaman, I., Magistretti, P.J. (2011) Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation, *Cell Metab*, **14**, 724–38, doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.016.
  199. Aleshin, S., Strokin, M., Sergeeva, M., Reiser, G. (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\beta/\delta$ , a possible nexus of PPAR $\alpha$ - and PPAR $\gamma$ -dependent molecular pathways in neurodegenerative diseases: Review and novel hypotheses., *Neurochem Int*, **63**, 322–30, doi: 10.1016/j.neuint.2013.06.012.

200. Garantziotis, S., Savani, R.C. (2019) Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context, *Matrix Biology*, **78–79**, 1–10, doi: 10.1016/j.matbio.2019.02.002.
201. Lau, L.W., Cua, R., Keough, M.B., Haylock-Jacobs, S., Yong, V.W. (2013) Pathophysiology of the brain extracellular matrix: A new target for remyelination, *Nat Rev Neurosci*, **14**, 722–9, doi: 10.1038/nrn3550.
202. Syková, E., Nicholson, C. (2008) Diffusion in Brain Extracellular Space, *Physiol Rev*, **88**, 1277–340, doi: 10.1152/physrev.00027.2007.
203. Barros, C.S., Franco, S.J., Müller, U. (2011) Extracellular Matrix: Functions in the nervous system, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**, 1–24, doi: 10.1101/cshperspect.a005108.
204. Mueller, A.M., Yoon, B.H., Sadiq, S.A. (2014) Inhibition of hyaluronan synthesis protects against central nervous system (CNS) autoimmunity and increases CXCL12 expression in the inflamed CNS, *Journal of Biological Chemistry*, **289**, 22888–99, doi: 10.1074/jbc.M114.559583.
205. Marinho, A., Nunes, C., Reis, S. (2021) Hyaluronic Acid: A Key Ingredient in the Therapy of Inflammation, *Biomolecules*, **11**, doi: 10.3390/BIOM11101518.
206. Jiang, D., Liang, J., Noble, P.W. (2011) Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases, *Physiol Rev*, **91**, 221–64, doi: 10.1152/physrev.00052.2009.
207. D’Agostino, A., Stellavato, A., Corsuto, L., Diana, P., Filosa, R., La Gatta, A., De Rosa, M., Schiraldi, C. (2017) Is molecular size a discriminating factor in hyaluronan interaction with human cells?, *Carbohydr Polym*, **157**, 21–30, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.07.125.
208. Austin, J.W., Gilchrist, C., Fehlings, M.G. (2012) High molecular weight hyaluronan reduces lipopolysaccharide mediated microglial activation, *J Neurochem*, **122**, 344–55, doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07789.x.
209. Struve, J., Maher, P.C., Li, Y.Q., Kinney, S., Fehlings, M.G., Kuntz IV, C., Sherman, L.S. (2005) Disruption of the hyaluronan-based extracellular matrix in spinal cord promotes astrocyte proliferation, *Glia*, **52**, 16–24, doi: 10.1002/glia.20215.
210. Khaing, Z.Z., Milman, B.D., Vanscoy, J.E., Seidlits, S.K., Grill, R.J., Schmidt, C.E. (2011) High molecular weight hyaluronic acid limits astrocyte activation and scar formation after spinal cord injury, *J Neural Eng*, **8**, 046033, doi: 10.1088/1741-2560/8/4/046033.
211. Nagy, N., Kuipers, H.F., Frymoyer, A.R., Ishak, H.D., Bollyky, J.B., Wight, T.N., Bollyky, P.L. (2015) 4-Methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer, *Front Immunol*, **6**, doi: 10.3389/fimmu.2015.00123.
212. Yoshioka, Y., Kozawa, E., Urakawa, H., Arai, E., Futamura, N., Zhuo, L., Kimata, K., Ishiguro, N., Nishida, Y. (2013) Suppression of hyaluronan synthesis alleviates inflammatory responses in murine arthritis and in human rheumatoid synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum*, **65**, 1160–70, doi: 10.1002/art.37861.
213. Li, F., Hao, P., Liu, G., Wang, W., Han, R., Jiang, Z., Li, X. (2017) Effects of 4-methylumbelliferone and high molecular weight hyaluronic acid on the inflammation of

- corneal stromal cells induced by LPS, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, **255**, 559–66, doi: 10.1007/s00417-016-3561-1.
214. Galgoczi, E., Jeney, F., Katko, M., Erdei, A., Gazdag, A., Sira, L., Bodor, M., Berta, E., Ujhelyi, B., Steiber, Z., Gyory, F., Nagy, E. V. (2020) Characteristics of hyaluronan synthesis inhibition by 4-methylumbelliferone in orbital fibroblasts, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **61**, doi: 10.1167/iovs.61.2.27.
  215. Rilla, K., Pasonen-Seppänen, S., Rieppo, J., Tammi, M., Tammi, R. (2004) The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor, *J Invest Dermatol*, **123**, 708–14, doi: 10.1111/J.0022-202X.2004.23409.X.
  216. Edward, M., Quinn, J.A., Pasonen-Seppänen, S.M., McCann, B.A., Tammi, R.H. (2010) 4-Methylumbelliferone inhibits tumour cell growth and the activation of stromal hyaluronan synthesis by melanoma cell-derived factors, *British Journal of Dermatology*, **162**, 1224–32, doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09699.x.
  217. Nakazawa, H., Yoshihara, S., Kudo, D., Morohashi, H., Kakizaki, I., Kon, A., Takagaki, K., Sasaki, M. (2006) 4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells., *Cancer Chemother Pharmacol*, **57**, 165–70, doi: 10.1007/s00280-005-0016-5.
  218. McKallip, R.J., Hagele, H.F., Uchakina, O.N. (2013) Treatment with the hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone suppresses SEB-induced lung inflammation, *Toxins (Basel)*, **5**, 1814–26, doi: 10.3390/toxins5101814.
  219. McKallip, R.J., Ban, H., Uchakina, O.N. (2015) Treatment with the Hyaluronic Acid Synthesis Inhibitor 4-Methylumbelliferone Suppresses LPS-Induced Lung Inflammation, *Inflammation*, **38**, 1250–9, doi: 10.1007/s10753-014-0092-y.
  220. Colombaro, V., Declèves, A.E., Jadot, I., Voisin, V., Giordano, L., Habsch, I., Nonclercq, D., Flamion, B., Caron, N. (2013) Inhibition of hyaluronan is protective against renal ischaemia-reperfusion injury, *Nephrology Dialysis Transplantation*, **28**, 2484–93, doi: 10.1093/ndt/gft314.
  221. Nagy, N., Freudenberger, T., Melchior-Becker, A., Röck, K., Ter Braak, M., Jastrow, H., Kinzig, M., Lucke, S., Suvorava, T., Kojda, G., Weber, A.A., Sörgel, F., Levkau, B., Ergün, S., Fischer, J.W. (2010) Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: Novel insights into the role of hyaluronan synthesis, *Circulation*, **122**, 2313–22, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972653.
  222. Sim, M.O., Ham, J.R., Lee, H.I., Seo, K. Il., Lee, M.K. (2014) Long-term supplementation of umbelliferone and 4-methylumbelliferone alleviates high-fat diet induced hypertriglyceridemia and hyperglycemia in mice, *Chem Biol Interact*, **216**, 9–16, doi: 10.1016/j.cbi.2014.03.003.
  223. López-Collazo, E., del Fresno, C. (2013) Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences., *Crit Care*, **17**, 242, doi: 10.1186/cc13110.
  224. Yagami, T., Koma, H., Yamamoto, Y. (2016) Pathophysiological Roles of Cyclooxygenases and Prostaglandins in the Central Nervous System., *Mol Neurobiol*, **53**, 4754–71, doi: 10.1007/s12035-015-9355-3.

225. Beurel, E., Jope, R.S. (2010) Glycogen synthase kinase-3 regulates inflammatory tolerance in astrocytes, *Neuroscience*, **169**, 1063–70, doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.05.044.
226. Beurel, E. (2011) HDAC6 regulates LPS-tolerance in astrocytes, *PLoS One*, **6**, e25804, doi: 10.1371/journal.pone.0025804.
227. Norden, D.M., Fenn, A.M., Dugan, A., Godbout, J.P. (2014) TGF $\beta$  produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation, *Glia*, **62**, 881–95, doi: 10.1002/glia.22647.
228. Iglesias, J., Morales, L., Barreto, G.E. (2017) Metabolic and Inflammatory Adaptation of Reactive Astrocytes: Role of PPARs, *Mol Neurobiol*, **54**, 2518–38, doi: 10.1007/s12035-016-9833-2.
229. Bensinger, S.J., Tontonoz, P. (2008) Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors, *Nature*, **454**, 470–7, doi: nature07202 [pii] 10.1038/nature07202.
230. Heneka, M.T., Landreth, G.E. (2007) PPARs in the brain, *Biochim Biophys Acta*, **1771**, 1031–45, doi: 10.1016/j.bbailip.2007.04.016.
231. Aleshin, S., Grabeklis, S., Hanck, T., Sergeeva, M., Reiser, G. (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma positively controls and PPARalpha negatively controls cyclooxygenase-2 expression in rat brain astrocytes through a convergence on PPARbeta/delta via mutual control of PPAR expression levels, *Mol Pharmacol*, **76**, 414–24, doi: mol.109.056010 [pii] 10.1124/mol.109.056010.
232. Moraes, L.A., Piqueras, L., Bishop-Bailey, D. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation, *Pharmacol Ther*, **110**, 371–85, doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.08.007.
233. Wahli, W., Michalik, L. (2012) PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **23**, 351–63, doi: 10.1016/j.tem.2012.05.001.
234. Gardner, O.S., Dewar, B.J., Graves, L.M. (2005) Activation of mitogen-activated protein kinases by peroxisome proliferator-activated receptor ligands: An example of nongenomic signaling, *Mol Pharmacol*, **68**, 933–41, doi: 10.1124/mol.105.012260.
235. Schnegg, C.I., Robbins, M.E. (2011) Neuroprotective Mechanisms of PPAR $\delta$ : Modulation of Oxidative Stress and Inflammatory Processes, *PPAR Res*, **2011**, doi: 10.1155/2011/373560.
236. Drew, P.D., Xu, J., Storer, P.D., Chavis, J.A., Racke, M.K. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor agonist regulation of glial activation: Relevance to CNS inflammatory disorders, *Neurochem Int*, **49**, 183–9, doi: 10.1016/j.neuint.2006.04.003.
237. Deplanque, D., Gelé, P., Pétrault, O., Six, I., Furman, C., Bouly, M., Nion, S., Dupuis, B., Leys, D., Fruchart, J.C., Cecchelli, R., Staels, B., Duriez, P., Bordet, R. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment, *J Neurosci*, **23**, 6264–71, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-15-06264.2003.
238. Sundararajan, S., Jiang, Q., Heneka, M., Landreth, G. (2006) PPARgamma as a therapeutic target in central nervous system diseases., *Neurochem Int*, **49**, 136–44, doi: 10.1016/j.neuint.2006.03.020.

239. Dana, N., Vaseghi, G., Javanmard, S.H. (2019) Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptors and toll-like receptors: A systematic review, *Adv Pharm Bull*, **9**, 12–21, doi: 10.15171/apb.2019.003.
240. FDA. (2011) Guidance for Industry Process Validation : General Principles and Practices Guidance for Industry Process Validation : General Principles and Practices, *Quality*, **22**.
241. Gavrish, G.E., Chistyakov, D. V., Sergeeva, M.G. (2021) ARGEOS: A new bioinformatic tool for detailed systematics search in GEO and arrayexpress, *Biology (Basel)*, **10**, doi: 10.3390/BIOLOGY10101026.
242. Piñero, J., Bravo, Á., Queralt-Rosinach, N., Gutiérrez-Sacristán, A., Deu-Pons, J., Centeno, E., García-García, J., Sanz, F., Furlong, L.I. (2017) DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants, *Nucleic Acids Res*, **45**, D833–9, doi: 10.1093/NAR/GKW943.
243. Breiman, L. (2001) Random forests, *Mach Learn*, **45**, 5–32, doi: 10.1023/A:1010933404324.
244. Liaw, A., Wiener, M. (2002) Classification and Regression by randomForest, *R News*, **2**, 18–22.
245. Kursa, M.B., Rudnicki, W.R. (2010) Feature Selection with the Boruta Package, *J Stat Softw*, **36**, 1–13, doi: 10.18637/JSS.V036.I11.
246. Raschka, S. (2018) MLxtend: Providing machine learning and data science utilities and extensions to Python’s scientific computing stack, *J Open Source Softw*, **3**, 638, doi: 10.21105/joss.00638.
247. Chistyakov, D.V.D.V., Nikolskaya, A.I., Goriainov, S.V.S. V., Astakhova, A.A.A.A., Sergeeva, M.G.M.G. (2020) Inhibitor of hyaluronic acid synthesis 4-methylumbelliferone as an anti-inflammatory modulator of lps-mediated astrocyte responses, *Int J Mol Sci*, **21**, 1–16, doi: 10.3390/ijms21218203.
248. Chistyakov, D. V., Astakhova, A.A., Azbukina, N. V., Goriainov, S. V., Chistyakov, V. V., Sergeeva, M.G. (2019) Cellular Model of Endotoxin Tolerance in Astrocytes: Role of Interleukin 10 and Oxylipins, *Cells*, **8**, 1553, doi: 10.3390/cells8121553.
249. Chistyakov, D. V., Azbukina, N. V., Astakhova, A.A., Polozhintsev, A.I., Sergeeva, M.G., Reiser, G. (2019) Toll-like receptors control p38 and JNK MAPK signaling pathways in rat astrocytes differently, when cultured in normal or high glucose concentrations, *Neurochem Int*, **131**, 104513, doi: 10.1016/j.neuint.2019.104513.
250. Chistyakov, D. V., Gavrish, G.E., Goriainov, S. V., Chistyakov, V. V., Astakhova, A.A., Azbukina, N. V., Sergeeva, M.G. (2020) Oxylipin profiles as functional characteristics of acute inflammatory responses in astrocytes pre-treated with IL-4, IL-10, or LPS, *Int J Mol Sci*, **21**, 1780, doi: 10.3390/ijms21051780.
251. Chistyakov, D. V., Azbukina, N. V., Astakhova, A.A., Goriainov, S. V., Chistyakov, V. V., Sergeeva, M.G. (2018) Sex-mediated differences in lps induced alterations of TNF $\alpha$ , IL-10 expression, and prostaglandin synthesis in primary astrocytes, *Int J Mol Sci*, **19**, 2793, doi: 10.3390/ijms19092793.

252. Chistyakov, D. V., Azbukina, N. V., Lopachev, A. V., Kulichenkova, K.N., Astakhova, A.A., Sergeeva, M.G. (2018) Rosiglitazone as a Modulator of TLR4 and TLR3 Signaling Pathways in Rat Primary Neurons and Astrocytes, *Int J Mol Sci*, **19**, 113, doi: 10.3390/ijms19010113.
253. Е.В. Панкевич, А.А. Астахова, Д.В. Чистяков, М.Г. Сергеева. (2017) Противовоспалительный эффект росиглитазона реализуется через модуляцию стабильности мРНК интерлейкина 10 и циклооксигеназы 2 в астроцитах *Биохимия*, №11, Т.82. стр. 1624-1634; doi: 10.1134/S0006297917110050
254. Буянова С. М., Чистяков Д.В., Астахова А.А., Сергеева М.Г. (2017) Влияние дегидроэпиандростерона на воспалительный ответ астроглиальных клеток. *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*, №5, Т.34. стр. 22-29; doi: 10.7868/S0233475517050036.
255. Astakhova, A.A., Chistyakov, D. V., Sergeeva, M.G., Reiser, G. (2018) Regulation of the ARE-binding proteins, TTP (tristetraprolin) and HuR (human antigen R), in inflammatory response in astrocytes, *Neurochem Int*, **118**, 82–90, doi: 10.1016/j.neuint.2018.04.014.
256. Astakhova, A., Chistyakov, D., Thomas, D., Geisslinger, G., Brüne, B., Sergeeva, M., Namgaladze, D. (2019) Inhibitors of Oxidative Phosphorylation Modulate Astrocyte Inflammatory Responses through AMPK-Dependent Ptg2 mRNA Stabilization, *Cells*, **8**, 1185, doi: 10.3390/cells8101185.
257. Chistyakov, D. V., Grabeklis, S., Goriainov, S. V., Chistyakov, V. V., Sergeeva, M.G., Reiser, G. (2018) Astrocytes synthesize primary and cyclopentenone prostaglandins that are negative regulators of their proliferation, *Biochem Biophys Res Commun*, **500**, 204–10, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.040.
258. Kliewer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., Lehmann, J.M. (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation, *Cell*, **83**, 813–9, doi: 10.1016/0092-8674(95)90194-9.
259. Zander, T., Kraus, J.A., Grommes, C., Schlegel, U., Feinstein, D., Klockgether, T., Landreth, G., Koenigsknecht, J., Heneka, M.T. (2002) Induction of apoptosis in human and rat glioma by agonists of the nuclear receptor PPARgamma, *J Neurochem*, **81**, 1052–60, doi: 10.1046/J.1471-4159.2002.00899.X.
260. Font-Nieves, M., Sans-Fons, M.G., Gorina, R., Bonfill-Teixidor, E., Salas-Perdomo, A., Marquez-Kisinousky, L., Santalucia, T., Planas, A.M., Salas-Pérdomo, A., Márquez-Kisinousky, L., Font-Nieves M Gorina R, Bonfill-Teixidor E, Salas-Pérdomo A, Márquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM., S.-F.M.G. (2012) Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes., *J Biol Chem.*, **287**, 6454–68, doi: 10.1074/jbc.M111.327874.
261. Yasumoto, A., Tokuoka, S.M., Kita, Y., Shimizu, T., Yatomi, Y. (2017) Multiplex quantitative analysis of eicosanoid mediators in human plasma and serum: Possible introduction into clinical testing, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **1068–1069**, 98–104, doi: 10.1016/J.JCHROMB.2017.10.014.

262. Satoh, T., Furuta, K., Tomokiyo, K., Nakatsuka, D., Tanikawa, M., Nakanishi, M., Miura, M., Tanaka, S., Koike, T., Hatanaka, H., Ikuta, K., Suzuki, M., Watanabe, Y. (2000) Facilitatory roles of novel compounds designed from cyclopentenone prostaglandins on neurite outgrowth-promoting activities of nerve growth factor, *J Neurochem*, **75**, 1092–102, doi: 10.1046/J.1471-4159.2000.0751092.X.
263. Gayarre, J., Avellano, M.I., Sánchez-Gómez, F.J., Carrasco, M.J., Cañada, F.J., Pérez-Sala, D. (2007) Modification of proteins by cyclopentenone prostaglandins is differentially modulated by GSH in vitro, *Ann N Y Acad Sci*, **1096**, 78–85, doi: 10.1196/ANNALS.1397.072.
264. Czlonkowska, A., Ciesielska, A., Gromadzka, G., Kurkowska-Jastrzebska, I. (2005) Estrogen and cytokines production - the possible cause of gender differences in neurological diseases., *Curr Pharm Des*, **11**, 1017–30, doi: 10.2174/1381612053381693.
265. Santos-Galindo, M., Acáz-Fonseca, E., Bellini, M.J., Garcia-Segura, L.M. (2011) Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide., *Biol Sex Differ*, **2**, 7, doi: 10.1186/2042-6410-2-7.
266. Potts, G.O., Creange, J.E., Harding, H.R., Schane, H.P. (1978) Trilostane, an orally active inhibitor of steroid biosynthesis, *Steroids*, **32**, 257–67, doi: 10.1016/0039-128X(78)90010-7.
267. Espallergues, J., Givalois, L., Tamsamani, J., Laruelle, C., Maurice, T. (2009) The 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor trilostane shows antidepressant properties in mice, *Psychoneuroendocrinology*, **34**, 644–59, doi: 10.1016/J.PSYNEUEN.2008.11.003.
268. Labrie, F. (1991) Intracrinology, *Mol Cell Endocrinol*, **78**, C113-8, doi: 10.1016/0303-7207(91)90116-A.
269. Fuente-Martin, E., Garcia-Caceres, C., Morselli, E., Clegg, D.J., Chowen, J.A., Finan, B., Brinton, R.D., Tschöp, M.H. (2013) Estrogen, astrocytes and the neuroendocrine control of metabolism, *Rev Endocr Metab Disord*, **14**, 331–8, doi: 10.1007/s11154-013-9263-7.
270. Schumacher, M., Weill-Engerer, S., Liere, P., Robert, F., Franklin, R.J.M., Garcia-Segura, L.M., Lambert, J.J., Mayo, W., Melcangi, R.C., Parducz, A., Suter, U., Carelli, C., Baulieu, E.E., Akwa, Y. (2003) Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system, *Prog Neurobiol*, **71**, 3–29, doi: 10.1016/j.pneurobio.2003.09.004.
271. Sundar Boyalla, S., Barbara Victor, M., Roemgens, A., Beyer, C., Arnold, S. (2011) Sex- and brain region-specific role of cytochrome c oxidase in 1-methyl-4-phenylpyridinium-mediated astrocyte vulnerability, *J Neurosci Res*, **89**, 2068–82, doi: 10.1002/jnr.22669.
272. Grollman, A.P. (1967) Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin., *Journal of Biological Chemistry*, **242**, 3226–33.
273. Croons, V., Martinet, W., Herman, A.G., Timmermans, J.-P., De Meyer, G.R.Y. (2009) The protein synthesis inhibitor anisomycin induces macrophage apoptosis in rabbit atherosclerotic plaques through p38 mitogen-activated protein kinase., *J Pharmacol Exp Ther*, **329**, 856–64, doi: jpet.108.149948 [pii]n10.1124/jpet.108.149948.

274. Al-Ahmadi, W., Al-Ghamdi, M., Al-Haj, L., Al-Saif, M., Khabar, K.S.A. (2009) Alternative polyadenylation variants of the RNA binding protein, HuR: Abundance, role of AU-rich elements and auto-Regulation, *Nucleic Acids Res*, **37**, 3612–24, doi: 10.1093/nar/gkp223.
275. Ross, J. (1995) mRNA stability in mammalian cells, *Microbiol Rev*, **59**, 423–50, doi: 10.1002/bies.950190612.
276. Huotari, N., Hömmö, T., Taimi, V., Nieminen, R., Moilanen, E., Korhonen, R. (2012) Regulation of tristetraprolin expression by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, *APMIS*, **120**, 988–99, doi: 10.1111/j.1600-0463.2012.02927.x.
277. Hammaker, D., Boyle, D.L., Topolewski, K., Firestein, G.S. (2014) Differential regulation of anti-inflammatory genes by p38 MAP kinase and MAP kinase kinase 6, *J Inflamm*, **11**, 14, doi: 10.1186/1476-9255-11-14.
278. Hochdörfer, T., Tiedje, C., Stumpo, D.J., Blackshear, P.J., Gaestel, M., Huber, M. (2013) LPS-induced production of TNF- $\alpha$  and IL-6 in mast cells is dependent on p38 but independent of TTP, *Cell Signal*, **25**, 1339–47, doi: 10.1016/j.cellsig.2013.02.022.
279. Pankevich, E.V., Chistyakov, D.V., Astakhova, A.A., Strelkova, O.S., Sergeeva, M.G. (2015) Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA degradation by rosiglitazone in C6 glioma cells in the presence of inflammation inducers, *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol*, **9**, doi: 10.1134/S1990747815050086.
280. Chistyakov, D. V., Goriainov, S. V., Astakhova, A.A., Sergeeva, M.G. (2021) High glucose shifts the oxylipin profiles in the astrocytes towards pro-inflammatory states, *Metabolites*, **11**, doi: 10.3390/metabo11050311.
281. Necela, B.M., Su, W., Thompson, E.A. (2008) Toll-like receptor 4 mediates cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and nuclear factor-kappaB in macrophages, *Immunology*, **125**, 344–58, doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02849.x.
282. Liu, W.X., Wang, T., Zhou, F., Wang, Y., Xing, J.W., Zhang, S., Gu, S.Z., Sang, L.X., Dai, C., Wang, H.L. (2015) Voluntary exercise prevents colonic inflammation in high-fat diet-induced obese mice by up-regulating PPAR- $\gamma$  activity, *Biochem Biophys Res Commun*, **459**, 475–80, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.047.
283. Liu, J., Jiang, C., Ma, X., Wang, J. (2018) Notoginsenoside Fc attenuates high glucose-induced vascular endothelial cell injury via upregulation of PPAR- $\gamma$  in diabetic Sprague-Dawley rats, *Vascul Pharmacol*, **109**, 27–35, doi: 10.1016/J.VPH.2018.05.009.
284. Zhang, X., Zhou, M., Guo, Y., Song, Z., Liu, B. (2015) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Promotes High Glucose-Induced M1 Macrophage Switching to M2 via the VDR-PPAR $\gamma$  Signaling Pathway., *Biomed Res Int*, **2015**, 157834, doi: 10.1155/2015/157834.
285. Zhang, M., Zhou, Z., Wang, J., Li, S. (2016) MiR-130b promotes obesity associated adipose tissue inflammation and insulin resistance in diabetes mice through alleviating M2 macrophage polarization via repression of PPAR- $\gamma$ , *Immunol Lett*, **180**, 1–8, doi: 10.1016/j.imlet.2016.10.004.
286. MACLOUF, J., KINDAHL, H., GRANSTRÖM, E., SAMUELSSON, B. (1980) Interactions of Prostaglandin H<sub>2</sub> and Thromboxane A<sub>2</sub> with Human Serum Albumin, *Eur J Biochem*, **109**, 561–6, doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04828.x.

287. Niederstaetter, L., Neuditschko, B., Brunmair, J., Janker, L., Bileck, A., Favero, G. Del., Gerner, C. (2021) Eicosanoid content in fetal calf serum accounts for reproducibility challenges in cell culture, *Biomolecules*, **11**, 1–13, doi: 10.3390/biom11010113.
288. Strokin, M.L., Sergeeva, M.G., Mevkh, A.T. (2000) The influence of serum fatty acid binding proteins on arachidonic acid uptake by macrophages, *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, **88**, 195–200, doi: 10.1385/ABAB:88:1-3:195.
289. Gong, P., Xu, X., Shi, J., Ni, L., Huang, Q., Xia, L., Nie, D., Lu, X., Chen, J., Shi, W. (2013) Phosphorylation of mitogen- and stress-activated protein kinase-1 in astrocytic inflammation: A possible role in inhibiting production of inflammatory cytokines, *PLoS One*, **8**, doi: 10.1371/journal.pone.0081747.
290. Ladu, M.J., Shah, J.A., Reardon, C.A., Getz, G.S., Bu, G., Hu, J., Guo, L., Van Eldik, L.J. (2000) Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures, *J Biol Chem*, **275**, 33974–80, doi: 10.1074/JBC.M000602200.
291. Sokolowska, M., Chen, L.Y., Eberlein, M., Martinez-Anton, A., Liu, Y., Alsaaty, S., Qi, H.Y., Logun, C., Horton, M., Shelhamer, J.H. (2014) Low molecular weight hyaluronan activates cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  and eicosanoid production in monocytes and macrophages, *J Biol Chem*, **289**, 4470–88, doi: 10.1074/JBC.M113.515106.
292. Marret, S., Delpech, B., Delpech, A., Asou, H., Girard, N., Courel, M. -N., Chauzy, C., Maingonnat, C., Fessard, C. (1994) Expression and effects of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hyaluronectin in newborn rat brain glial cell cultures, *J Neurochem*, **62**, 1285–95, doi: 10.1046/J.1471-4159.1994.62041285.X.
293. Hascall, V.C., Wang, A., Tammi, M., Oikari, S., Tammi, R., Passi, A., Vigetti, D., Hanson, R.W., Hart, G.W. (2014) The dynamic metabolism of hyaluronan regulates the cytosolic concentration of UDP-GlcNAc, *Matrix Biology*, **35**, 14–7, doi: 10.1016/j.matbio.2014.01.014.
294. Ishizuka, S., Askew, E.B., Ishizuka, N., Knudson, C.B., Knudson, W. (2016) 4-Methylumbelliferone diminishes catabolically activated articular chondrocytes and cartilage explants via a mechanism independent of hyaluronan inhibition, *Journal of Biological Chemistry*, **291**, 12087–104, doi: 10.1074/jbc.M115.709683.
295. Cho, H., Matsumoto, S., Fujita, Y., Kuroda, A., Menju, T., Sonobe, M., Kondo, N., Torii, I., Nakano, T., Lara, P.N., Gandara, D.R., Date, H., Hasegawa, S. (2017) Trametinib plus 4-Methylumbelliferone Exhibits Antitumor Effects by ERK Blockade and CD44 Downregulation and Affects PD-1 and PD-L1 in Malignant Pleural Mesothelioma, *Journal of Thoracic Oncology*, **12**, 477–90, doi: 10.1016/j.jtho.2016.10.023.
296. Kretschmer, I., Freudenberger, T., Twarock, S., Fischer, J.W. (2015) Synergistic effect of targeting the epidermal growth factor receptor and hyaluronan synthesis in oesophageal squamous cell carcinoma cells, *Br J Pharmacol*, **172**, 4560–74, doi: 10.1111/bph.13240.
297. Lokeshwar, V.B., Lopez, L.E., Munoz, D., Chi, A., Shirodkar, S.P., Lokeshwar, S.D., Escudero, D.O., Dhir, N., Altman, N. (2010) Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells, *Cancer Res*, **70**, 2613–23, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3185.

298. Uchakina, O.N., Ban, H., McKallip, R.J. (2013) Targeting hyaluronic acid production for the treatment of leukemia: Treatment with 4-methylumbelliferone leads to induction of MAPK-mediated apoptosis in K562 leukemia, *Leuk Res*, **37**, 1294–301, doi: 10.1016/j.leukres.2013.07.009.
299. Kultti, A., Pasonen-Seppänen, S., Jauhiainen, M., Rilla, K.J., Kärnä, R., Pyöriä, E., Tammi, R.H., Tammi, M.I. (2009) 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3, *Exp Cell Res*, **315**, 1914–23, doi: 10.1016/j.yexcr.2009.03.002.
300. Vigetti, D., Ori, M., Viola, M., Genasetti, A., Karousou, E., Rizzi, M., Pallotti, F., Nardi, I., Hascall, V.C., De Luca, G., Passi, A. (2006) Molecular cloning and characterization of UDP-glucose dehydrogenase from the amphibian *Xenopus laevis* and its involvement in hyaluronan synthesis, *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 8254–63, doi: 10.1074/jbc.M508516200.
301. Vigetti, D., Rizzi, M., Viola, M., Karousou, E., Genasetti, A., Clerici, M., Bartolini, B., Hascall, V.C., De Luca, G., Passi, A. (2009) The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells, *Glycobiology*, **19**, 537–46, doi: 10.1093/glycob/cwp022.
302. Heurtaux, T., Benani, A., Moulin, D., Muller, N., Netter, P., Minn, A. (2006) Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes, *Neuropharmacology*, **50**, 317–28, doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.09.007.
303. Fischer, J.W., Schrör, K. (2007) Regulation of hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins: Implications for atherosclerosis, *Thromb Haemost*, **98**, 287–95, doi: 10.1160/TH07-02-0155/ID/JR0155-3/BIB.
304. Hartmann, K., Sepulveda-Falla, D., Rose, I.V.L., Madore, C., Muth, C., Matschke, J., Butovsky, O., Liddelow, S., Glatzel, M., Krasemann, S. (2019) Complement 3+ astrocytes are highly abundant in prion diseases, but their abolishment led to an accelerated disease course and early dysregulation of microglia, *Acta Neuropathol Commun*, **7**, 83, doi: 10.1186/s40478-019-0735-1.
305. Rus, H.G., Kim, L.M., Niculescu, F.I., Shin, M.L. (1992) Induction of C3 expression in astrocytes is regulated by cytokines and Newcastle disease virus, *Journal of Immunology*, **148**, 928–33.
306. Puschmann, T.B., Dixon, K.J., Turnley, A.M. (2011) Species differences in reactivity of mouse and rat astrocytes in vitro, *Neurosignals*, **18**, 152–63, doi: 10.1159/000321494.
307. Ahlemeyer, B., Kehr, K., Richter, E., Hirz, M., Baumgart-Vogt, E., Herden, C. (2013) Phenotype, differentiation, and function differ in rat and mouse neocortical astrocytes cultured under the same conditions, *J Neurosci Methods*, **212**, 156–64, doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.09.016.
308. Clarke, L.E., Liddelow, S.A., Chakraborty, C., Münch, A.E., Heiman, M., Barres, B.A. (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **115**, E1896–905, doi: 10.1073/pnas.1800165115.
309. Tarassishin, L., Loudig, O., Bauman, A., Shafit-Zagardo, B., Suh, H.S., Lee, S.C. (2011) Interferon regulatory factor 3 inhibits astrocyte inflammatory gene expression

- through suppression of the proinflammatory miR-155 and miR-155, *Glia*, **59**, 1911–22, doi: 10.1002/glia.21233.
310. Terashvili, M., Sarkar, P., Nostrand, M. V., Falck, J.R., Harder, D.R. (2012) The protective effect of astrocyte-derived 14,15-epoxyeicosatrienoic acid on hydrogen peroxide-induced cell injury in astrocyte-dopaminergic neuronal cell line co-culture, *Neuroscience*, **223**, 68–76, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.07.045.
  311. Su Wol Chung., Bok Yun Kang., Seung Hyun Kim., Youngmi Kim Pak., Cho, D., Trinchieri, G., Tae Sung Kim. (2000) Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and nuclear factor- $\kappa$ B, *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 32681–7, doi: 10.1074/jbc.m002577200.
  312. Lobo-Silva, D., Carriche, G.M., Castro, A.G., Roque, S., Saraiva, M. (2016) Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation, *J Neuroinflammation*, **13**, 297, doi: 10.1186/s12974-016-0763-8.
  313. Ledebøer, A., Brevé, J.J.P., Wierinckx, A., van der Jagt, S., Bristow, A.F., Leysen, J.E., Tilders, F.J.H., Van Dam, A.-M. (2002) Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells., *Eur J Neurosci*, **16**, 1175–85.
  314. Guryleva, M. V., Chistyakov, D. V., Lopachev, A. V., Goriainov, S. V., Astakhova, A.A., Timoshina, Y.A., Khutorova, A. V., Fedorova, T.N., Sergeeva, M.G. (2021) Modulation of the Primary Astrocyte-Enriched Cultures' Oxylin Profiles Reduces Neurotoxicity, *Metabolites*, **11**, doi: 10.3390/METABO11080498.
  315. Van Leyen, K., Arai, K., Jin, G., Kenyon, V., Gerstner, B., Rosenberg, P.A., Holman, T.R., Lo, E.H. (2008) Novel lipoxygenase inhibitors as neuroprotective reagents, *J Neurosci Res*, **86**, 904–9, doi: 10.1002/jnr.21543.
  316. Arai, K., Nishiyama, N., Matsuki, N., Ikegaya, Y. (2001) Neuroprotective effects of lipoxygenase inhibitors against ischemic injury in rat hippocampal slice cultures, *Brain Res*, **904**, 167–72, doi: 10.1016/S0006-8993(01)02491-X.
  317. Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. (2014) Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay, *Biomed Res Int*, **2014**, doi: 10.1155/2014/761264.
  318. Silva, B., de Miranda, A., Rodrigues, F., Malheiros Silveira, A., de Souza Resende, G., Dutra Moraes, M., Pinheiro de Oliveira, A., Parreiras, P., Barcelos, L., Teixeira, M., Machado, F., Teixeira, A., Rachid, M. (2015) The 5-lipoxygenase (5-LOX) Inhibitor Zileuton Reduces Inflammation and Infarct Size with Improvement in Neurological Outcome Following Cerebral Ischemia, *Curr Neurovasc Res*, **12**, 398–403, doi: 10.2174/1567202612666150812150606.
  319. Tu, X.K., Yang, W.Z., Wang, C.H., Shi, S.S., Zhang, Y.L., Chen, C.M., Yang, Y.K., Jin, C.D., Wen, S. (2010) Zileuton reduces inflammatory reaction and brain damage following permanent cerebral ischemia in rats, *Inflammation*, **33**, 344–52, doi: 10.1007/s10753-010-9191-6.
  320. Liddelow, S.A., Barres, B.A. (2017) Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential, *Immunity*, **46**, 957–67, doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.006.

321. Adili, R., Tourdot, B.E., Mast, K., Yeung, J., Freedman, J.C., Green, A., Luci, D.K., Jadhav, A., Simeonov, A., Maloney, D.J., Holman, T.R., Holinstat, M. (2017) First selective 12-LOX inhibitor, ML355, impairs thrombus formation and vessel occlusion in vivo with minimal effects on hemostasis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **37**, 1828–39, doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309868.
322. Rossi, A., Pergola, C., Koeberle, A., Hoffmann, M., Dehm, F., Bramanti, P., Cuzzocrea, S., Werz, O., Sautebin, L. (2010) The 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, suppresses prostaglandin biosynthesis by inhibition of arachidonic acid release in macrophages, *Br J Pharmacol*, **161**, 555–70, doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00930.x.
323. Luci, D., J. Brian Jameson, I., Yasgar, A., Diaz, G., Joshi, N., Kantz, A., Markham, K., Perry, S., Kuhn, N., Yeung, J., Schultz, L., Holinstat, M., Nadler, J., Taylor-Fishwick, D.A., Jadhav, A., Simeonov, A., Holman, T.R., Maloney, D.J. (2014) in *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*, National Center for Biotechnology Information (US).
324. Pihlaja, R., Haaparanta-Solin, M., Rinne, J.O. (2017) The anti-inflammatory effects of lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibitors in inflammation-induced human fetal glia cells and the  $\alpha\beta$  degradation capacity of human fetal astrocytes in an ex vivo assay, *Front Neurosci*, **11**, doi: 10.3389/fnins.2017.00299.
325. Liu, X., Sims, H.F., Jenkins, C.M., Guan, S., Diltthey, B.G., Gross, R.W. (2020) 12-LOX catalyzes the oxidation of 2-arachidonoyl-lysolipids in platelets generating eicosanoid-lysolipids that are attenuated by iPLA2 $\gamma$  knockout, *Journal of Biological Chemistry*, **295**, 5307–20, doi: 10.1074/jbc.RA119.012296.
326. Takadera, T., Shiraishi, Y., Ohyashiki, T. (2004) Prostaglandin E2 induced caspase-dependent apoptosis possibly through activation of EP2 receptors in cultured hippocampal neurons, *Neurochem Int*, **45**, 713–9, doi: 10.1016/j.neuint.2004.02.005.
327. Chen, S.H., Sung, Y.F., Oyarzabal, E.A., Tan, Y.M., Leonard, J., Guo, M., Li, S., Wang, Q., Chu, C.H., Chen, S.L., Lu, R.B., Hong, J.S. (2018) Physiological Concentration of Prostaglandin E2 Exerts Anti-inflammatory Effects by Inhibiting Microglial Production of Superoxide Through a Novel Pathway, *Mol Neurobiol*, **55**, 8001–13, doi: 10.1007/s12035-018-0965-4.
328. Jouvène, C., Fourmaux, B., GéoÛn, A., Balas, L., Durand, T., Lagarde, M., Létisse, M., Guichardant, M. (2018) Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Free and Esterified Oxygenated Derivatives from Docosahexaenoic Acid in Rat Brain, *Lipids*, **53**, 103–16, doi: 10.1002/lipd.12006.
329. Francos-Quijorna, I., Santos-Nogueira, E., Gronert, K., Sullivan, A.B., Kopp, M.A., Brommer, B., David, S., Schwab, J.M., López-Vales, R. (2017) Maresin 1 promotes inflammatory resolution, neuroprotection, and functional neurological recovery after spinal cord injury, *Journal of Neuroscience*, **37**, 11731–43, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1395-17.2017.
330. Fredman, G., Hellmann, J., Proto, J.D., Kuriakose, G., Colas, R.A., Dorweiler, B., Connolly, E.S., Solomon, R., Jones, D.M., Heyer, E.J., Spite, M., Tabas, I. (2016) An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques, *Nat Commun*, **7**, doi: 10.1038/ncomms12859.

331. Serhan, C.N., de la Rosa, X., Jouvene, C. (2019) Novel mediators and mechanisms in the resolution of infectious inflammation: evidence for vagus regulation, *J Intern Med*, 240–58, doi: 10.1111/joim.12871.
332. Chistyakov, D. V., Astakhova, A.A., Goriainov, S. V., Sergeeva, M.G. (2020) Comparison of PPAR ligands as modulators of resolution of inflammation, via their influence on cytokines and oxylipins release in astrocytes, *Int J Mol Sci*, **21**, 1–16, doi: 10.3390/ijms21249577.
333. Shao, B., Li, C., Yang, H., Shen, A., Wu, X., Yuan, Q., Kang, L., Liu, Z., Zhang, G., Lu, X., Cheng, C. (2011) The relationship between Src-suppressed C kinase substrate and beta-1,4 galactosyltransferase-I in the process of lipopolysaccharide-induced TNF-alpha secretion in rat primary astrocytes, *Cell Mol Neurobiol*, **31**, 1047–56, doi: 10.1007/s10571-011-9704-3.
334. Carpentier, P.A., Getts, M.T., Miller, S.D. (2008) Pro-inflammatory functions of astrocytes correlate with viral clearance and strain-dependent protection from TMEV-induced demyelinating disease, *Virology*, **375**, 24–36, doi: 10.1016/j.virol.2008.01.024.
335. Renaud, A.E., Spengler, R.N. (2002) Tumor necrosis factor expressed by primary hippocampal neurons and SH-SY5Y cells is regulated by  $\beta$ 2-adrenergic receptor activation, *J Neurosci Res*, **67**, 264–74, doi: 10.1002/jnr.10101.
336. Liu, T., Clark, R.K., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Barone, F.C., Feuerstein, G.Z. (1994) Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons., *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, **25**, 1481–8, doi: 10.1161/01.STR.25.7.1481.
337. Terrando, N., Monaco, C., Ma, D., Foxwell, B.M.J., Feldmann, M., Maze, M. (2010) Tumor necrosis factor-alpha triggers a cytokine cascade yielding postoperative cognitive decline, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 20518–22, doi: 10.1073/pnas.1014557107.
338. Zhou, Z., Peng, X., Insolera, R., Fink, D.J., Mata, M. (2009) IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury, *Exp Neurol*, **220**, 183–90, doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.018.
339. Hos, D., Bucher, F., Regenfuss, B., Dreisow, M.L., Bock, F., Heindl, L.M., Eming, S.A., Cursiefen, C. (2016) IL-10 Indirectly Regulates Corneal Lymphangiogenesis and Resolution of Inflammation via Macrophages, *American Journal of Pathology*, **186**, 159–71, doi: 10.1016/j.ajpath.2015.09.012.
340. Normando, E.M., Davis, B.M., De Groef, L., Nizari, S., Turner, L.A., Ravindran, N., Pahlitzsch, M., Brenton, J., Malaguarnera, G., Guo, L., Somavarapu, S., Cordeiro, M.F. (2016) The retina as an early biomarker of neurodegeneration in a rotenone-induced model of Parkinson's disease: evidence for a neuroprotective effect of rosiglitazone in the eye and brain, *Acta Neuropathol Commun*, **4**, 86, doi: 10.1186/s40478-016-0346-z.
341. Liu, H., Rose, M.E., Culver, S., Ma, X., Dixon, C.E., Graham, S.H. (2016) Rosiglitazone attenuates inflammation and CA3 neuronal loss following traumatic brain injury in rats, *Biochem Biophys Res Commun*, **472**, 648–55, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.003.
342. Nakayama, M., Uchimura, K., Zhu, R.L., Nagayama, T., Rose, M.E., Stetler, R.A., Isakson, P.C., Chen, J., Graham, S.H. (1998) Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10954–9, doi: 10.1073/pnas.95.18.10954.

343. Nogawa, S., Zhang, F., Ross, M.E., Iadecola, C. (1997) Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage., *J Neurosci*, **17**, 2746–55.
344. McCullough, L. (2004) Neuroprotective Function of the PGE2 EP2 Receptor in Cerebral Ischemia, *Journal of Neuroscience*, **24**, 257–68, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4485-03.2004.
345. Kim, E.J., Kwon, K.J., Park, J.Y., Lee, S.H., Moon, C.H., Baik, E.J. (2002) Neuroprotective effects of prostaglandin E2 or cAMP against microglial and neuronal free radical mediated toxicity associated with inflammation, *J Neurosci Res*, **70**, 97–107, doi: 10.1002/jnr.10373.
346. Defaux, A., Zurich, M.G., Braissant, O., Honegger, P., Monnet-Tschudi, F. (2009) Effects of the PPAR-beta agonist GW501516 in an in vitro model of brain inflammation and antibody-induced demyelination, *J Neuroinflammation*, **6**, doi: 10.1186/1742-2094-6-15.
347. Matsunobu, T., Okuno, T., Yokoyama, C., Yokomizo, T. (2013) Thromboxane A synthase-independent production of 12- hydroxyheptadecatrienoic acid, a BLT2 ligand, *J Lipid Res*, **54**, 2979–87, doi: 10.1194/jlr.M037754.
348. Van’T Erve, T.J., Lih, F.B., Kadiiska, M.B., Deterding, L.J., Eling, T.E., Mason, R.P. (2015) Reinterpreting the best biomarker of oxidative stress: The 8-iso-PGF2 $\alpha$ /PGF2 $\alpha$  ratio distinguishes chemical from enzymatic lipid peroxidation, *Free Radic Biol Med*, **83**, 245–51, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.004.
349. Omeragic, A., Kara-Yacoubian, N., Kelschenbach, J., Sahin, C., Cummins, C.L., Volk, D.J., Bendayan, R. (2019) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma agonists exhibit anti-inflammatory and antiviral effects in an EcoHIV mouse model, *Sci Rep*, **9**, doi: 10.1038/s41598-019-45878-6.
350. Astakhova, A.A., Chistyakov, D. V., Pankevich, E. V., Sergeeva, M.G. (2015) Regulation of cyclooxygenase 2 expression by agonists of PPAR nuclear receptors in the model of endotoxin tolerance in astrocytes., *Biochemistry (Mosc)*, **80**, 1262–70, doi: 10.1134/S0006297915100065.
351. Kaminska, B., Gozdz, A., Zawadzka, M., Ellert-Miklaszewska, A., Lipko, M. (2009) MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target, *Anat Rec (Hoboken)*, **292**, 1902–13, doi: 10.1002/ar.21047.
352. Sheng, W., Zong, Y., Mohammad, A., Ajit, D., Cui, J., Han, D., Hamilton, J.L., Simonyi, A., Sun, A.Y., Gu, Z., Hong, J.-S., Weisman, G.A., Sun, G.Y. (2011) Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and up-regulation of ERK1/2, iNOS and sPLA<sub>2</sub>-IIA expression in astrocytes and microglia., *J Neuroinflammation*, **8**, 121, doi: 10.1186/1742-2094-8-121.
353. Xu, J., Chavis, J.A., Racke, M.K., Drew, P.D. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of astrocytes, *J Neuroimmunol*, **176**, 95–105, doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.04.019.
354. Storer, P.D., Xu, J., Chavis, J., Drew, P.D. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit the activation of microglia and astrocytes: Implications for multiple sclerosis, *J Neuroimmunol*, **161**, 113–22, doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.12.015.

355. Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P., Evans, R.M. (2001) PPAR- $\gamma$  dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation, *Nat Med*, **7**, 48–52, doi: 10.1038/83336.
356. Zhang, C., Deng, J., Liu, D., Tuo, X., Yu, Y., Yang, H., Wang, N. (2018) Nuciferine inhibits proinflammatory cytokines via the PPARs in LPS-induced RAW264.7 cells, *Molecules*, **23**, doi: 10.3390/molecules23102723.
357. Zizzo, G., Cohen, P.L. (2015) The PPAR- $\gamma$  antagonist GW9662 elicits differentiation of M2c-like cells and upregulation of the MerTK/Gas6 axis: A key role for PPAR- $\gamma$  in human macrophage polarization, *Journal of Inflammation (United Kingdom)*, **12**, doi: 10.1186/s12950-015-0081-4.
358. Rodríguez-Calvo, R., Serrano, L., Coll, T., Moullan, N., Sánchez, R.M., Merlos, M., Palomer, X., Laguna, J.C., Michalik, L., Wahli, W., Vázquez-Carrera, M. (2008) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor- $\kappa$ B activity via extracellular signal-related kinase 1/2, *Diabetes*, **57**, 2149–57, doi: 10.2337/db08-0176.
359. Huster, D., Khne, A., Bhattacharjee, A., Raines, L., Jantsch, V., Noe, J., Schirrmeister, W., Sommerer, I., Sabri, O., Berr, F., Mssner, J., Stieger, B., Caca, K., Lutsenko, S. (2012) Diverse functional properties of wilson disease ATP7B variants, *Gastroenterology*, **142**, 947-956.e5, doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.048.
360. Bull, P.C., Thomas, G.R., Rommens, J.M., Forbes, J.R., Cox, D.W. (1993) The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the menkes gene, *Nat Genet*, **5**, 327–37, doi: 10.1038/ng1293-327.
361. Woimant, F., Djebrani-Oussedik, N., Poujois, A. (2019) New tools for Wilson’s disease diagnosis: exchangeable copper fraction, *Ann Transl Med*, **7**, S70–S70, doi: 10.21037/atm.2019.03.02.
362. Ala, A., Walker, A.P., Ashkan, K., Dooley, J.S., Schilsky, M.L. (2007) Wilson’s disease, *Lancet*, **369**, 397–408, doi: 10.1016/S0140-6736(07)60196-2.
363. Kieffer, D.A., Medici, V. (2017) Wilson disease: At the crossroads between genetics and epigenetics—A review of the evidence, *Liver Res*, **1**, 121–30, doi: 10.1016/j.livres.2017.08.003.
364. Mordaunt, C.E., Kieffer, D.A., Shibata, N.M., Czlonkowska, A., Litwin, T., Weiss, K.H., Zhu, Y., Bowlus, C.L., Sarkar, S., Cooper, S., Wan, Y.J.Y., Ali, M.R., LaSalle, J.M., Medici, V. (2019) Epigenomic signatures in liver and blood of Wilson disease patients include hypermethylation of liver-specific enhancers, *Epigenetics Chromatin*, **12**, 10, doi: 10.1186/s13072-019-0255-z.
365. Mazi, T.A., Sarode, G. V., Czlonkowska, A., Litwin, T., Kim, K., Shibata, N.M., Medici, V. (2019) Dysregulated choline, methionine, and aromatic amino acid metabolism in patients with wilson disease: Exploratory metabolomic profiling and implications for hepatic and neurologic phenotypes, *Int J Mol Sci*, **20**, doi: 10.3390/ijms20235937.
366. Sarode, G. V., Kim, K., Kieffer, D.A., Shibata, N.M., Litwin, T., Czlonkowska, A., Medici, V. (2019) Metabolomics profiles of patients with Wilson disease reveal a distinct metabolic signature., *Metabolomics*, **15**, 43, doi: 10.1007/s11306-019-1505-6.
367. Ryan, A., Nevitt, S.J., Tuohy, O., Cook, P. (2019) Biomarkers for diagnosis of Wilson’s disease., *Cochrane Database Syst Rev*, doi: 10.1002/14651858.CD012267.pub2.

368. Gaetke, L.M., Chow, C.K. (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients, *Toxicology*, 147–63, doi: 10.1016/S0300-483X(03)00159-8.
369. Du, C., Fujii, Y., Ito, M., Harada, M., Moriyama, E., Shimada, R., Ikemoto, A., Okuyama, H. (2004) Dietary polyunsaturated fatty acids suppress acute hepatitis, alter gene expression and prolong survival of female Long-Evans Cinnamon rats, a model of Wilson disease, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **15**, 273–80, doi: 10.1016/j.jnutbio.2003.11.005.
370. Wooton-Kee, C.R., Jain, A.K., Wagner, M., Grusak, M.A., Finegold, M.J., Lutsenko, S., Moore, D.D. (2015) Elevated copper impairs hepatic nuclear receptor function in Wilson's disease, *Journal of Clinical Investigation*, **125**, 3449–60, doi: 10.1172/JCI78991.
371. Hamilton, J.P., Koganti, L., Muchenditsi, A., Pendyala, V.S., Huso, D., Hankin, J., Murphy, R.C., Huster, D., Merle, U., Mangels, C., Yang, N., Potter, J.J., Mezey, E., Lutsenko, S. (2016) Activation of liver X receptor/retinoid X receptor pathway ameliorates liver disease in *Atp7B*<sup>-/-</sup> (Wilson disease) mice, *Hepatology*, **63**, 1828–41, doi: 10.1002/hep.28406.
372. Gromadzka, G., Kruszyńska, M., Wierzbicka, D., Litwin, T., Dziezyc, K., Wierzchowska-Ciok, A., Chabik, G., Członkowska, A. (2015) Gene variants encoding proteins involved in antioxidant defense system and the clinical expression of Wilson disease, *Liver International*, **35**, 215–22, doi: 10.1111/liv.12493.
373. Nakamura, N., Kumasaka, R., Osawa, H., Yamabe, H., Shirato, K.I., Fujita, T., Murakami, R.I., Shimada, M., Nakamura, M., Okumura, K., Hamazaki, K., Hamazaki, T. (2005) Effects of eicosapentaenoic acids on oxidative stress and plasma fatty acid composition in patients with lupus nephritis, *In Vivo (Brooklyn)*, **19**, 879–82.
374. Payahoo, L., Khajebishak, Y., Jafarabadi, M.A., Ostadrahimi, A. (2018) Oleoylethanolamide supplementation reduces inflammation and oxidative stress in obese people: A clinical trial, *Adv Pharm Bull*, **8**, 479–87, doi: 10.15171/apb.2018.056.
375. Calder, P.C. (2001) Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity, *Lipids*, **36**, 1007–24, doi: 10.1007/s11745-001-0812-7.
376. Grygiel-Górniak, B. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: Nutritional and clinical implications - A review, *Nutr J*, **13**, 17, doi: 10.1186/1475-2891-13-17.
377. Nagasaka, H., Miida, T., Inui, A., Inoue, I., Tsukahara, H., Komatsu, H., Hiejima, E., Fujisawa, T., Yorifuji, T., Hiranao, K. ichi., Okajima, H., Inomata, Y. (2012) Fatty liver and anti-oxidant enzyme activities along with peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$  and  $\alpha$  expressions in the liver of Wilson's disease, *Mol Genet Metab*, **107**, 542–7, doi: 10.1016/j.ymgme.2012.08.004.
378. He, K., Chen, Z., Ma, Y., Pan, Y. (2011) Identification of high-copper-responsive target pathways in *Atp7b* knockout mouse liver by GSEA on microarray data sets, *Mammalian Genome*, **22**, 703–13, doi: 10.1007/s00335-011-9359-x.
379. Fu, J., Oveisi, F., Gaetani, S., Lin, E., Piomelli, D. (2005) Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR- $\alpha$  agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats, *Neuropharmacology*, **48**, 1147–53, doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.02.013.

380. Fang, X., Hu, S., Xu, B., Snyder, G.D., Harmon, S., Yao, J., Liu, Y., Sangras, B., Falck, J.R., Weintraub, N.L., Spector, A.A. (2006) 14,15-Dihydroxyicosatrienoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ , *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **290**, H55-63, doi: 10.1152/ajpheart.00427.2005.
381. Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G.A., Chen, H., Evans, R.M. (1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR $\gamma$ , *Cell*, **93**, 229–40, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81574-3.
382. Burstein, S.H. (2020) The chemistry, biology and pharmacology of the cyclopentenone prostaglandins., *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **148**, 106408, doi: 10.1016/j.prostaglandins.2020.106408.
383. Mangino, M., Roederer, M., Beddall, M.H., Nestle, F.O., Spector, T.D. (2017) Innate and adaptive immune traits are differentially affected by genetic and environmental factors, *Nat Commun*, **8**, 1–7, doi: 10.1038/ncomms13850.
384. Azbukina, N. V., Chistyakov, D. V., Goriainov, S. V., Kotelin, V.I., Fedoseeva, E. V., Petrov, S.Y., Sergeeva, M.G., Iomdina, E.N., Zernii, E.Y. (2021) Targeted lipidomic analysis of aqueous humor reveals signaling lipid-mediated pathways in primary open-angle glaucoma, *Biology (Basel)*, **10**, doi: 10.3390/biology10070658.
385. Weinreb, R.N., Aung, T., Medeiros, F.A. (2014) The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review, *JAMA*, **311**, 1901–11, doi: 10.1001/JAMA.2014.3192.
386. Leske, M.C. (2007) Open-angle glaucoma -- an epidemiologic overview, *Ophthalmic Epidemiol*, **14**, 166–72, doi: 10.1080/09286580701501931.
387. Weinreb, R.N., Tee Khaw, P. (2004) Primary open-angle glaucoma, *Lancet*, **363**, 1711–20, doi: 10.1016/S0140-6736(04)16257-0.
388. Vohra, R., Tsai, J.C., Kolko, M. (2013) The role of inflammation in the pathogenesis of glaucoma, *Surv Ophthalmol*, **58**, 311–20, doi: 10.1016/J.SURVOPHTHAL.2012.08.010.
389. Chistyakov, D. V., Azbukina, N. V., Astakhova, A.A., Goriainov, S. V., Chistyakov, V. V., Tiulina, V. V., Baksheeva, V.E., Kotelin, V.I., Fedoseeva, E. V., Zamyatnin, A.A., Philippov, P.P., Kiseleva, O.A., Bessmertny, A.M., Senin, I.I., Iomdina, E.N., Sergeeva, M.G., Zernii, E.Y. (2020) Comparative lipidomic analysis of inflammatory mediators in the aqueous humor and tear fluid of humans and rabbits, *Metabolomics*, **16**, 27, doi: 10.1007/s11306-020-1650-y.
390. Chistyakov, D.V., Baksheeva, V.E., Tiulina, V.V., Goriainov, S.V., Azbukina, N.V., Gancharova, O.S., Arifulin, E.A., Komarov, S.V., Chistyakov, V.V., Tikhomirova, N.K., Zamyatnin, A.A., Philippov, P.P., Senin, I.I., Sergeeva, M.G., Zernii, E.Y. (2020) Mechanisms and treatment of light-induced retinal degeneration-associated inflammation: Insights from biochemical profiling of the aqueous humor, *Int J Mol Sci*, **21**, doi: 10.3390/ijms21030704.
391. Chistyakov, D. V., Gancharova, O.S., Baksheeva, V.E., Tiulina, V. V., Goriainov, S. V., Azbukina, N. V., Tsarkova, M.S., Zamyatnin, A.A., Philippov, P.P., Sergeeva, M.G., Senin, I.I., Zernii, E.Y. (2020) Inflammation in dry eye syndrome: Identification and targeting of oxylipin-mediated mechanisms, *Biomedicines*, **8**, doi: 10.3390/BIO-MEDICINES8090344.

392. Sakai, Y., Tanaka, T., Seki, M., Okuyama, S., Fukuchi, T., Yamagata, K., Takei, N., Nawa, H., Abe, H. (2009) Cyclooxygenase-2 plays a critical role in retinal ganglion cell death after transient ischemia: real-time monitoring of RGC survival using Thy-1-EGFP transgenic mice, *Neurosci Res*, **65**, 319–25, doi: 10.1016/J.NEU-RES.2009.08.008.
393. Doucette, L.P., Walter, M.A. (2017) Prostaglandins in the eye: Function, expression, and roles in glaucoma, *Ophthalmic Genet*, **38**, 108–16, doi: 10.3109/13816810.2016.1164193.
394. Lütjen-Drecoll, E., Tamm, E. (1988) Morphological study of the anterior segment of cynomolgus monkey eyes following treatment with prostaglandin F2 alpha, *Exp Eye Res*, **47**, 761–9, doi: 10.1016/0014-4835(88)90043-7.
395. Schmidl, D., Schmetterer, L., Garhöfer, G., Popa-Cherecheanu, A. (2015) Pharmacotherapy of Glaucoma, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, **31**, 63, doi: 10.1089/JOP.2014.0067.
396. Umeno, A., Tanito, M., Kaidzu, S., Takai, Y., Horie, M., Yoshida, Y. (2019) Comprehensive measurements of hydroxylinoleate and hydroxyarachidonate isomers in blood samples from primary open-angle glaucoma patients and controls, *Sci Rep*, **9**, doi: 10.1038/S41598-018-36952-6.
397. Pieragostino, D., Agnifili, L., Fasanella, V., D’Aguanno, S., Mastropasqua, R., Di Ilio, C., Sacchetta, P., Urbani, A., Del Boccio, P. (2013) Shotgun proteomics reveals specific modulated protein patterns in tears of patients with primary open angle glaucoma naïve to therapy, *Mol Biosyst*, **9**, 1108–16, doi: 10.1039/C3MB25463A.
398. Mastropasqua, R., Agnifili, L., Mastropasqua, L. (2019) Structural and Molecular Tear Film Changes in Glaucoma, *Curr Med Chem*, **26**, 4225–40, doi: 10.2174/0929867325666181009153212.
399. Lynes, M.D., Leiria, L.O., Lundh, M., Bartelt, A., Shamsi, F., Huang, T.L., Takahashi, H., Hirshman, M.F., Schlein, C., Lee, A., Baer, L.A., May, F.J., Gao, F., Narain, N.R., Chen, E.Y., Kiebish, M.A., Cypess, A.M., Blüher, M., Goodyear, L.J., Hotamisligil, G.S., Stanford, K.I., Tseng, Y.H. (2017) The cold-induced lipokine 12,13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue, *Nat Med*, **23**, 631–7, doi: 10.1038/NM.4297.
400. Tie, J., Chen, D., Guo, J., Liao, S., Luo, X., Zhang, Y., Guo, R., Xu, C., Huang, D., Zhang, Y., Wang, J. (2020) Transcriptome-wide study of the response of human trabecular meshwork cells to the substrate stiffness increase, *J Cell Biochem*, **121**, 3112–23, doi: 10.1002/JCB.29578.
401. Yasuda, M., Tanaka, Y., Omodaka, K., Nishiguchi, K.M., Nakamura, O., Tsuda, S., Nakazawa, T. (2016) Transcriptome profiling of the rat retina after optic nerve transection, *Sci Rep*, **6**, doi: 10.1038/SREP28736.
402. Mirzaei, M., Gupta, V.B., Chick, J.M., Greco, T.M., Wu, Y., Chitranshi, N., Wall, R., Vander., Hone, E., Deng, L., Dheer, Y., Abbasi, M., Rezaeian, M., Braidy, N., You, Y., Salekdeh, G.H., Haynes, P.A., Molloy, M.P., Martins, R., Cristea, I.M., Gygi, S.P., Graham, S.L., Gupta, V.K. (2017) Age-related neurodegenerative disease associated pathways identified in retinal and vitreous proteome from human glaucoma eyes, *Sci Rep*, **7**, doi: 10.1038/S41598-017-12858-7.

403. Vasiliou, V., Gonzalez, F.J. (2008) Role of CYP1B1 in glaucoma, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **48**, 333–58, doi: 10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.48.061807.154729.
404. He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X. (2017) Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species, *Cell Physiol Biochem*, **44**, 532–53, doi: 10.1159/000485089.
405. Hildreth, K., Kodani, S.D., Hammock, B.D., Zhao, L. (2020) Cytochrome P450-derived linoleic acid metabolites EpOMEs and DiHOMEs: a review of recent studies, *J Nutr Biochem*, **86**, doi: 10.1016/J.JNUTBIO.2020.108484.
406. Nieman, D.C., Shanely, R.A., Luo, B., Meaney, M.P., Dew, D.A., Pappan, K.L. (2014) Metabolomics approach to assessing plasma 13- and 9-hydroxy-octadecadienoic acid and linoleic acid metabolite responses to 75-km cycling, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **307**, doi: 10.1152/AJPREGU.00092.2014.
407. M, G., RG, P., RK, L., SK, B. (2010) Aqueous humor dynamics: a review, *Open Ophthalmol J*, **4**, 52–9, doi: 10.2174/1874364101004010052.
408. Izzotti, A., Bagnis, A., Saccà, S.C. (2006) The role of oxidative stress in glaucoma, *Mutat Res*, **612**, 105–14, doi: 10.1016/J.MRREV.2005.11.001.
409. Funke, S., Perumal, N., Beck, S., Gabel-Scheurich, S., Schmelter, C., Teister, J., Gerbig, C., Gramlich, O.W., Pfeiffer, N., Grus, F.H. (2016) Glaucoma related Proteomic Alterations in Human Retina Samples, *Sci Rep*, **6**, doi: 10.1038/SREP29759.
410. Vranka, J.A., Staverosky, J.A., Reddy, A.P., Wilmarth, P.A., David, L.L., Acott, T.S., Russell, P., Raghunathan, V.K. (2018) Biomechanical Rigidity and Quantitative Proteomics Analysis of Segmental Regions of the Trabecular Meshwork at Physiologic and Elevated Pressures, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **59**, 246–59, doi: 10.1167/IOVS.17-22759.
411. Yamashita, A., Hayashi, Y., Matsumoto, N., Nemoto-Sasaki, Y., Koizumi, T., Inagaki, Y., Oka, S., Tanikawa, T., Sugiura, T. (2017) Coenzyme-A-Independent Transacylation System; Possible Involvement of Phospholipase A2 in Transacylation, *Biology (Basel)*, **6**, doi: 10.3390/BIOLOGY6020023.
412. Rönkkö, S., Rekonen, P., Kaarniranta, K., Puustjärvi, T., Teräsvirta, M., Uusitalo, H. (2007) Phospholipase A2 in chamber angle of normal eyes and patients with primary open angle glaucoma and exfoliation glaucoma, *Mol Vis*, **13**, 408.
413. Rosenbaum, J.T., Boney, R.S., Samples, J.R., Valone, F.H. (1991) Synthesis of platelet activating factor by ocular tissue from inflamed eyes, *Arch Ophthalmol*, **109**, 410–3, doi: 10.1001/ARCHOPHT.1991.01080030112049.
414. Jager, G. V., van Delft, J.L., van Haeringen, N.J., Verbeij, N.L.J., Braquet, P. (1993) Antagonist of platelet-activating factor prevents prostaglandin E2 induced ocular hypertension in rabbits, *Prostaglandins*, **45**, 97–105, doi: 10.1016/0090-6980(93)90093-M.
415. Schachtschabel, U., Lindsey, J.D., Weinreb, R.N. (2000) The mechanism of action of prostaglandins on uveoscleral outflow, *Curr Opin Ophthalmol*, **11**, 112–5, doi: 10.1097/00055735-200004000-00008.
416. Moschos, M.M., Nitoda, E., Chatziralli, I.P., Panos, G.D., Demopoulos, C.A. (2016) Impact of prostaglandin glaucoma drops on platelet-activating factor action: an in vitro study, *Drug Des Devel Ther*, **10**, 3977–81, doi: 10.2147/DDDT.S117806.

417. Park, B., Corson, T.W. (2019) Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition for Ocular Diseases: Vision for the Future, *Front Pharmacol*, **10**, doi: 10.3389/FPHAR.2019.00095.
418. Hayes, M.T. (2019) Parkinson's Disease and Parkinsonism, *Am J Med*, **132**, 802–7, doi: 10.1016/J.AMJMED.2019.03.001.
419. Maiti, P., Manna, J., Dunbar, G.L., Maiti, P., Dunbar, G.L. (2017) Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments, *Translational Neurodegeneration 2017 6:1*, **6**, 1–35, doi: 10.1186/S40035-017-0099-Z.
420. Goetz, C.G., Poewe, W., Rascol, O., Sampaio, C., Stebbins, G.T., Counsell, C., Giladi, N., Holloway, R.G., Moore, C.G., Wenning, G.K., Yahr, M.D., Seidl, L. (2004) Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: Status and recommendations, *Movement Disorders*, **19**, 1020–8, doi: 10.1002/mds.20213.
421. Chiurchiù, V., Tiberi, M., Matteocci, A., Fazio, F., Siffeti, H., Saracini, S., Mercuri, N.B., Sancesario, G. (2022) Lipidomics of Bioactive Lipids in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Where Are We?, *Int J Mol Sci*, **23**, doi: 10.3390/IJMS23116235.
422. Pajares, M., I Rojo, A., Manda, G., Boscá, L., Cuadrado, A. (2020) Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications, *Cells*, **9**, doi: 10.3390/CELLS9071687.
423. Gonzalez-Riano, C., Saiz, J., Barbas, C., Bergareche, A., Huerta, J.M., Ardanaz, E., Konjevod, M., Mondragon, E., Erro, M.E., Chirlaque, M.D., Abilleira, E., Goñi-Irigoyen, F., Amiano, P. (2021) Prognostic biomarkers of Parkinson's disease in the Spanish EPIC cohort: a multiplatform metabolomics approach, *NPJ Parkinsons Dis*, **7**, doi: 10.1038/S41531-021-00216-4.
424. More, S.V., Choi, D.K. (2015) Promising cannabinoid-based therapies for Parkinson's disease: motor symptoms to neuroprotection, *Mol Neurodegener*, **10**, doi: 10.1186/S13024-015-0012-0.
425. Giuffrida, A., Parsons, L.H., Kerr, T.M., Rodríguez De Fonseca, F., Navarro, M., Piomelli, D. (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum, *Nat Neurosci*, **2**, 358–63, doi: 10.1038/7268.
426. Armstrong, M.J., Okun, M.S. (2020) Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review, *JAMA*, **323**, 548–60, doi: 10.1001/JAMA.2019.22360.
427. 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 (Basel)*, **14**, 4663, doi: 10.3390/cancers14194663.
428. Jonasdottir, H.S., Brouwers, H., Toes, R.E.M., Ioan-Facsinay, A., Giera, M. (2018) Effects of anticoagulants and storage conditions on clinical oxylipid levels in human plasma, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, **1863**, 1511–22, doi: 10.1016/j.bbalip.2018.10.003.
429. Ascherio, A., Schwarzschild, M.A. (2016) The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention, *Lancet Neurol*, **15**, 1257–72, doi: 10.1016/S1474-4422(16)30230-7.

430. Metcalfe-Roach, A., Yu, A.C., Golz, E., Cirstea, M., Sundvick, K., Kliger, D., Foulger, L.H., Mackenzie, M., Finlay, B.B., Appel-Cresswell, S. (2021) MIND and Mediterranean Diets Associated with Later Onset of Parkinson's Disease, *Movement Disorders*, **36**, 977–84, doi: 10.1002/mds.28464.
431. Sadeghi, I., Gispert, J.D., Palumbo, E., Muñoz-Aguirre, M., Wucher, V., D'Argenio, V., Santpere, G., Navarro, A., Guigo, R., Vilor-Tejedor, N. (2022) Brain transcriptomic profiling reveals common alterations across neurodegenerative and psychiatric disorders, *Comput Struct Biotechnol J*, **20**, 4549–61, doi: 10.1016/j.csbj.2022.08.037.
432. Bartels, A., Leenders, K. (2010) Cyclooxygenase and neuroinflammation in Parkinson's disease neurodegeneration, *Curr Neuropharmacol*, **8**, 62–8, doi: 10.2174/157015910790909485.
433. Tian, Y., Gou, J., Zhang, H., Lu, J., Jin, Z., Jia, S., Bai, L. (2021) The anti-inflammatory effects of 15-HETE on osteoarthritis during treadmill exercise, *Life Sci*, **273**, doi: 10.1016/J.LFS.2021.119260.
434. Gao, X., Chen, H., Schwarzschild, M.A., Ascherio, A. (2011) Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease, *Neurology*, **76**, 863–9, doi: 10.1212/WNL.0b013e31820f2d79.
435. Fyfe, I. (2020) Aspirin and ibuprofen could lower risk of LRRK2 Parkinson disease, *Nat Rev Neurol*, **16**, 460, doi: 10.1038/s41582-020-0394-7.
436. Poly, T.N., Islam, M.M. (Rubel), Yang, H.C., Li, Y.C.J. (2019) Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease in the elderly population: a meta-analysis, *Eur J Clin Pharmacol*, **75**, 99–108, doi: 10.1007/s00228-018-2561-y.
437. Tansey, M.G., Wallings, R.L., Houser, M.C., Herrick, M.K., Keating, C.E., Joers, V. (2022) Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease, *Nat Rev Immunol*, **22**, 657–73, doi: 10.1038/S41577-022-00684-6.
438. Razavi, S.M., Khayatan, D., Arab, Z.N., Momtaz, S., Zare, K., Jafari, R.M., Dehpour, A.R., Abdolghaffari, A.H. (2021) Licofelone, a potent COX/5-LOX inhibitor and a novel option for treatment of neurological disorders, *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **157**, 106587, doi: 10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2021.106587.
439. Krashia, P., Cordella, A., Nobili, A., La Barbera, L., Federici, M., Leuti, A., Campanelli, F., Natale, G., Marino, G., Calabrese, V., Vedele, F., Ghiglieri, V., Picconi, B., Di Lazzaro, G., Schirinzi, T., Sancesario, G., Casadei, N., Riess, O., Bernardini, S., Pisani, A., Calabresi, P., Viscomi, M.T., Serhan, C.N., Chiurchiù, V., D'Amelio, M., Mercuri, N.B. (2019) Blunting neuroinflammation with resolvin D1 prevents early pathology in a rat model of Parkinson's disease, *Nat Commun*, **10**, doi: 10.1038/S41467-019-11928-W.
440. Chistyakov, D. V., Guryleva, M. V., Stepanova, E.S., Makarenkova, L.M., Ptitsyna, E. V., Goriainov, S. V., Nikolskaya, A.I., Astakhova, A.A., Klimenko, A.S., Bezborodova, O.A., Rasskazova, E.A., Potanina, O.G., Abramovich, R.A., Nemtsova, E.R., Sergeeva, M.G. (2022) Multi-Omics Approach Points to the Importance of Oxylipins Metabolism in Early-Stage Breast Cancer, *Cancers (Basel)*, **14**, doi: 10.3390/CANCERS14082041.
441. Polyak, K. (2011) Heterogeneity in breast cancer, *J Clin Invest*, **121**, 3786–8, doi: 10.1172/JCI60534.

442. De Silva, S., Tennekoon, K.H., Karunanayake, E.H. (2019) Overview of the genetic basis toward early detection of breast cancer, *Breast Cancer (Dove Med Press)*, **11**, 71–80, doi: 10.2147/BCTT.S185870.
443. Sager, M., Yeat, N.C., Pajaro-Van Der Stadt, S., Lin, C., Ren, Q., Lin, J. (2015) Transcriptomics in cancer diagnostics: developments in technology, clinical research and commercialization, *Expert Rev Mol Diagn*, **15**, 1589–603, doi: 10.1586/14737159.2015.1105133.
444. Yang, L., Wang, Y., Cai, H., Wang, S., Shen, Y., Ke, C. (2020) Application of metabolomics in the diagnosis of breast cancer: a systematic review, *J Cancer*, **11**, 2540–51, doi: 10.7150/JCA.37604.
445. Apaya, M.K., Shiau, J.Y., Liao, G.S., Liang, Y.J., Chen, C.W., Yang, H.C., Chu, C.H., Yu, J.C., Shyur, L.F. (2019) Integrated omics-based pathway analyses uncover CYP epoxygenase-associated networks as theranostic targets for metastatic triple negative breast cancer, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, **38**, doi: 10.1186/s13046-019-1187-y.
446. O’Flaherty, J.T., Wooten, R.E., Samuel, M.P., Thomas, M.J., Levine, E.A., Case, L.D., Akman, S.A., Edwards, I.J. (2013) Fatty Acid Metabolites in Rapidly Proliferating Breast Cancer, *PLoS One*, **8**, doi: 10.1371/journal.pone.0063076.
447. Wu, C.C., Gupta, T., Garcia, V., Ding, Y., Schwartzman, M.L. (2014) 20-HETE and blood pressure regulation: clinical implications, *Cardiol Rev*, **22**, 1–12, doi: 10.1097/CRD.0B013E3182961659.
448. Lowe, H., Toyang, N., Steele, B., Bryant, J., Ngwa, W. (2021) The Endocannabinoid System: A Potential Target for the Treatment of Various Diseases, *Int J Mol Sci*, **22**, doi: 10.3390/IJMS22179472.
449. Sailler, S., Schmitz, K., Jäger, E., Ferreiros, N., Wicker, S., Zschiebsch, K., Pickert, G., Geisslinger, G., Walter, C., Tegeder, I., Lötsch, J. (2014) Regulation of circulating endocannabinoids associated with cancer and metastases in mice and humans, *Oncoscience*, **1**, 272, doi: 10.18632/ONCOSCIENCE.33.
450. Lenihan-Geels, G., Bishop, K.S., Ferguson, L.R. (2016) Cancer Risk and Eicosanoid Production: Interaction between the Protective Effect of Long Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Intake and Genotype, *J Clin Med*, **5**, doi: 10.3390/JCM5020025.
451. Siezen, C.L.E., Bueno-De-Mesquita, H.B., Peeters, P.H.M., Kram, N.R., Van Doeseelaar, M., Van Kranen, H.J. (2006) Polymorphisms in the genes involved in the arachidonic acid-pathway, fish consumption and the risk of colorectal cancer, *Int J Cancer*, **119**, 297–303, doi: 10.1002/IJC.21858.
452. Kleinstein, S.E., Heath, L., Makar, K.W., Poole, E.M., Seufert, B.L., Slattery, M.L., Xiao, L., Duggan, D.J., Hsu, L., Curtin, K., Koepf, L., Muehling, J., Taverna, D., Caan, B.J., Carlson, C.S., Potter, J.D., Ulrich, C.M. (2013) Genetic variation in the lipoxigenase pathway and risk of colorectal neoplasia, *Genes Chromosomes Cancer*, **52**, 437–49, doi: 10.1002/GCC.22042.
453. Hester, A.G., Murphy, R.C., Uhlsom, C.J., Ivester, P., Lee, T.C., Sergeant, S., Miller, L.R., Howard, T.D., Mathias, R.A., Chilton, F.H. (2014) Relationship between a common variant in the fatty acid desaturase (FADS) cluster and eicosanoid generation in humans, *J Biol Chem*, **289**, 22482–9, doi: 10.1074/JBC.M114.579557.

454. Buczynski, M.W., Dumlao, D.S., Dennis, E.A. (2009) Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology, *J Lipid Res*, **50**, 1015–38, doi: 10.1194/JLR.R900004-JLR200.
455. Desvergne, B., Michalik, L., Wahli, W. (2006) Transcriptional regulation of metabolism, *Physiol Rev*, **86**, 465–514, doi: 10.1152/physrev.00025.2005.
456. Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, Á., Gallardo-Pérez, J.C., Pacheco-Velázquez, S.C., Belmont-Díaz, J.A., Robledo-Cadena, D.X., Vargas-Navarro, J.L., de la Peña, N.A.C., Saavedra, E., Moreno-Sánchez, R. (2019) Transcriptional Regulation of Energy Metabolism in Cancer Cells, *Cells*, **8**, doi: 10.3390/CELLS8101225.
457. Mardis, E.R. (2016) The challenges of big data, *Dis Model Mech*, **9**, 483–5, doi: 10.1242/DMM.025585.
458. Hossain, M.A., Saiful Islam, S.M., Quinn, J.M.W., Huq, F., Moni, M.A. (2019) Machine learning and bioinformatics models to identify gene expression patterns of ovarian cancer associated with disease progression and mortality, *J Biomed Inform*, **100**, doi: 10.1016/j.jbi.2019.103313.
459. Geman, D., D'Avignon, C., Naiman, D.Q., Winslow, R.L. (2004) Classifying gene expression profiles from pairwise mRNA comparisons, *Stat Appl Genet Mol Biol*, **3**, doi: 10.2202/1544-6115.1071.
460. Acharjee, A., Larkman, J., Xu, Y., Cardoso, V.R., Gkoutos, G. V. (2020) A random forest based biomarker discovery and power analysis framework for diagnostics research, *BMC Med Genomics*, **13**, doi: 10.1186/s12920-020-00826-6.
461. Liu, S., Xu, C., Zhang, Y., Liu, J., Yu, B., Liu, X., Dehmer, M. (2018) Feature selection of gene expression data for Cancer classification using double RBF-kernels, *BMC Bioinformatics*, **19**, doi: 10.1186/s12859-018-2400-2.
462. Koboldt, D.C., Fulton, R.S., McLellan, M.D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J.F., Fulton, L.L., Dooling, D.J., Ding, L., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Ally, A., Balasundaram, M., Butterfield, Y.S.N., Carlsen, R., Carter, C., Chu, A., Chuah, E., Chun, H.J.E., Coope, R.J.N., Dhalla, N., Guin, R., Hirst, C., Hirst, M., Holt, R.A., Lee, D., Li, H.I., Mayo, M., Moore, R.A., Mungall, A.J., Pleasance, E., Robertson, A.G., Schein, J.E., Shafiei, A., Sipahimalani, P., Slobodan, J.R., Stoll, D., Tam, A., Thiessen, N., Varhol, R.J., Wye, N., Zeng, T., Zhao, Y., Birol, I., Jones, S.J.M., Marra, M.A., Cherniack, A.D., Saksena, G., Onofrio, R.C., Pho, N.H., Carter, S.L., Schumacher, S.E., Tabak, B., Hernandez, B., Gentry, J., Nguyen, H., Crenshaw, A., Ardlie, K., Beroukhi, R., Winckler, W., Getz, G., Gabriel, S.B., Meyerson, M., Chin, L., Kuchelapati, R., Hoadley, K.A., Auman, J.T., Fan, C., Turman, Y.J., Shi, Y., Li, L., Topal, M.D., He, X., Chao, H.H., Prat, A., Silva, G.O., Iglesia, M.D., Zhao, W., Usary, J., Berg, J.S., Adams, M., Booker, J., Wu, J., Gulabani, A., Bodenheimer, T., Hoyle, A.P., Simons, J. V., Soloway, M.G., Mose, L.E., Jefferys, S.R., Balu, S., Parker, J.S., Hayes, D.N., Perou, C.M., Malik, S., Mahurkar, S., Shen, H., Weisenberger, D.J., Triche, T., Lai, P.H., Bootwalla, M.S., Maglinte, D.T., Berman, B.P., Van Den Berg, D.J., Baylin, S.B., Laird, P.W., Creighton, C.J., Donehower, L.A., Noble, M., Voet, D., Gehlenborg, N., Di Cara, D., Zhang, J., Zhang, H., Wu, C.J., Yingchun Liu, S., Lawrence, M.S., Zou, L., Sivachenko, A., Lin, P., Stojanov, P., Jing, R., Cho, J., Sinha, R., Park, R.W., Nazaire, M.D., Robinson, J., Thorvaldsdottir, H., Mesirov, J., Park, P.J., Reynolds, S.,

- Kreisberg, R.B., Bernard, B., Bressler, R., Erkkila, T., Lin, J., Thorsson, V., Zhang, W., Shmulevich, I., Ciriello, G., Weinhold, N., Schultz, N., Gao, J., Cerami, E., Gross, B., Jacobsen, A., Sinha, R., Aksoy, B.A., Antipin, Y., Reva, B., Shen, R., Taylor, B.S., Ladanyi, M., Sander, C., Anur, P., Spellman, P.T., Lu, Y., Liu, W., Verhaak, R.R.G., Mills, G.B., Akbani, R., Zhang, N., Broom, B.M., Casasent, T.D., Wakefield, C., Unruh, A.K., Baggerly, K., Coombes, K., Weinstein, J.N., Haussler, D., Benz, C.C., Stuart, J.M., Benz, S.C., Zhu, J., Szeto, C.C., Scott, G.K., Yau, C., Paull, E.O., Carlin, D., Wong, C., Sokolov, A., Thusberg, J., Mooney, S., Ng, S., Goldstein, T.C., Ellrott, K., Grifford, M., Wilks, C., Ma, S., Craft, B., Yan, C., Hu, Y., Meerzaman, D., Gastier-Foster, J.M., Bowen, J., Ramirez, N.C., Black, A.D., Pyatt, R.E., White, P., Zmuda, E.J., Frick, J., Lichtenberg, T.M., Brookens, R., George, M.M., Gerken, M.A., Harper, H.A., Leraas, K.M., Wise, L.J., Tabler, T.R., McAllister, C., Barr, T., Hart-Kothari, M., Tarvin, K., Saller, C., Sandusky, G., Mitchell, C., Iacocca, M. V., Brown, J., Rabeno, B., Czerwinski, C., Petrelli, N., Dolzhansky, O., Abramov, M., Voronina, O., Potapova, O., Marks, J.R., Suchorska, W.M., Murawa, D., Kycler, W., Ibbs, M., Korski, K., Spychała, A., Murawa, P., Brzeziński, J.J., Perz, H., Łażniak, R., Teresiak, M., Tatka, H., Leporowska, E., Bogusz-Czerniewicz, M., Malicki, J., Mackiewicz, A., Wiznerowicz, M., Van Le, X., Kohl, B., Viet Tien, N., Thorp, R., Van Bang, N., Sussman, H., Phu, B.D., Hajek, R., Hung, N.P., Phuong, T.V.T., Thang, H.Q., Khan, K.Z., Penny, R., Mallery, D., Curley, E., Shelton, C., Yena, P., Ingle, J.N., Couch, F.J., Lingle, W.L., King, T.A., Gonzalez-Angulo, A.M., Dyer, M.D., Liu, S., Meng, X., Patangan, M., Waldman, F., Stöppler, H., Rathmell, W.K., Thorne, L., Huang, M., Boice, L., Hill, A., Morrison, C., Gaudioso, C., Bshara, W., Daily, K., Egea, S.C., Pegram, M.D., Gomez-Fernandez, C., Dhir, R., Bhargava, R., Brufsky, A., Shriver, C.D., Hooke, J.A., Campbell, J.L., Mural, R.J., Hu, H., Somiari, S., Larson, C., Deyarmin, B., Kvecher, L., Kovatich, A.J., Ellis, M.J., Stricker, T., White, K., Olopade, O., Luo, C., Chen, Y., Bose, R., Chang, L.W., Beck, A.H., Pihl, T., Jensen, M., Sfeir, R., Kahn, A., Chu, A., Kothiyal, P., Wang, Z., Snyder, E., Pontius, J., Ayala, B., Backus, M., Walton, J., Baboud, J., Berton, D., Nicholls, M., Srinivasan, D., Raman, R., Girshik, S., Kigonya, P., Alonso, S., Sanbhadti, R., Barletta, S., Pot, D., Sheth, M., Demchok, J.A., Shaw, K.R.M., Yang, L., Eley, G., Ferguson, M.L., Tarnuzzer, R.W., Zhang, J., Dillon, L.A.L., Buetow, K., Fielding, P., Ozenberger, B.A., Guyer, M.S., Sofia, H.J., Palchik, J.D. (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours, *Nature*, **490**, 61–70, doi: 10.1038/NATURE11412.
463. Sørlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10869–74, doi: 10.1073/pnas.191367098.
464. Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S.S., Ress, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., Fluge, Ø., Pergammenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*, **406**, 747–52, doi: 10.1038/35021093.

465. Malachi, T., Chaimoff, C., Feller, N., Halbrecht, I. (1981) Prostaglandin E2 and cyclic AMP in tumor and plasma of breast cancer patients, *J Cancer Res Clin Oncol*, **102**, 71–9, doi: 10.1007/BF00410536.
466. Schmid, P.C., Wold, L.E., Krebsbach, R.J., Berdyshev, E. V., Schmid, H.H.O. (2002) Anandamide and other N-acylethanolamines in human tumors, *Lipids*, **37**, 907–12, doi: 10.1007/S11745-002-0978-Z.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### ПРИЛОЖЕНИЕ А

Дополнительные материалы по характеристике профиля оксипинов при различных клеточных обработках

**Таблица А.1.** Среднее +/- СО ПНЖК и оксипинов (нг/мг белка) для клеток культивируемых в среде с нормальной глюкозой (5,5 mM) или повышенной (22,5 mM) концентрацией глюкозы при различных обработках.

Обработка	NG клетки, нг/мг	HG клетки, нг/мг	NG + LPS, нг/мг	HG + LPS, нг/мг	Метаболический путь (ПНЖК)
EPA	24,8±2,3	56,4±3,5	23,6±1,1	57±7,15	
DHA	306±22	490±68,6	278±25,6	477±62,8	
AA	7,34±0,14	22±2,15	7,5±0,99	22,6±3,24	
12-HHT	0,08±0,01	0,03±0,01	0,07±0,01	0,12±0,01	COX (AA)
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	0,1±0,04	0,39±0,07	0,78±0,4	0,52±0,04	COX (AA)
PGA <sub>2</sub>	0,04±0,01	0,25±0,03	0,12±0,07	0,46±0,12	COX (AA)
PGE <sub>2</sub>	0,19±0,05	6,16±0,32	1,3±0,4	10,6±1,9	COX (AA)
PGD <sub>2</sub>	0,08±0,03	0,28±0,06	0,56±0,03	2,01±0,15	COX (AA)
PGF <sub>2α</sub>	0,07±0,01	0,25±0,05	0,16±0,05	0,4±0,06	COX (AA)
TXB <sub>2</sub>	0,09±0,01	0,18±0,01	0,43±0,15	0,83±0,06	COX (AA)
11-HETE	0,33±0,01	1,48±0,12	0,63±0,15	3,4±0,17	COX (AA)
13-HDoHE	0,15±0,09	0,19±0,01	0,11±0,01	0,3±0,02	COX (DHA)
12-HETE	0,35±0,14	0,61±0,08	0,35±0,08	0,68±0,11	LOX (AA)
5-HETE	0,27±0,06	0,43±0,06	0,23±0,05	0,36±0,01	LOX (AA)
13-HODE	0,5±0,24	0,54±0,08	0,47±0,04	0,48±0,19	LOX (LA)
13-KODE	0,07±0,05	0,02±0,02	0,07±0,06	0,06±0,02	LOX (LA)
9-HODE	0,28±0,19	0,3±0,08	0,3±0,11	0,29±0,12	LOX (LA)
9-KODE	0,08±0,06	0,12±0,06	0,06±0,03	0,07±0,04	LOX (LA)
16-HDoHE	0,19±0,07	0,19±0,06	0,1±0,05	0,15±0,04	LOX (DHA)
4-HDoHE	0,33±0,02	0,54±0,05	0,29±0,19	0,56±0,16	LOX (DHA)
8-HDoHE	0,13±0,01	0,33±0,15	0,22±0,17	0,35±0,14	LOX (DHA)
14-HDoHE	0,08±0,04	0,2±0,03	0,09±0,05	0,18±0,06	LOX (DHA)
17-HDoHE	0	0,05±0,03	0,08±0,03	0,04±0,02	LOX (DHA)
10-HDoHE	0,12±0,06	0,15±0,01	0,07±0,05	0,17±0,01	LOX (DHA)

**Таблица А.2.** Среднее +/- стандартное отклонение ПНЖК и оксипинов, высвобожденных из астроцитов, обработанных ML355 и Зилеутоном отдельно или в комбинации с LPS в течение 24 ч, в сравнении с контролем

№	LPS 24h	ML355	ML355 + LPS 24h	Зилеутон	Зилеутон + LPS 24h
EPA	0,21±0,04	1,21±0,34	0,27±0,06	2,02±0,39	0,22±0,03
DHA	0,35±0,04	1,10±0,02	0,31±0,01	1,28±0,39	0,35±0,02
AA	0,26±0,03	1,20±0,27	0,30±0,04	1,34±0,41	0,28±0,01
12-HHT	11,29±4,06	6,71±0,20	16,65±5,44	4,36±1,05	1,43±1,44
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	35,34±3,57	1,31±0,23	18,48±2,10	0,90±0,16	4,86±0,22
PGA <sub>2</sub> +PGJ <sub>2</sub>	24,45±2,12	1,21±0,43	11,77±2,46	0,95±0,23	3,50±0,22
PGE <sub>2</sub>	249,89±54,64	6,53±2,89	61,85±14,20	3,68±1,03	11,94±1,60
PGD <sub>2</sub>	36,13±5,35	1,47±0,45	16,01±2,20	0,98±0,20	3,68±0,64
PGF <sub>2α</sub>	15,09±6,65	1,50±0,20	2,84±0,80	1,28±0,31	1,44±0,47
TXB <sub>2</sub>	9,74±0,93	1,09±0,13	7,12±0,24	0,84±0,21	3,04±0,12
11-HETE	8,50±0,50	0,86±0,22	4,27±0,75	0,85±0,23	1,06±0,17
13-HDoHE	3,85±0,21	0,78±0,12	1,17±0,40	0,92±0,11	1,20±0,34

14,15-DHET	1,19±0,26	0,82±0,39	0,94±0,28	0,74±0,28	0,68±0,16
17,18-DiHETE	1,12±0,07	1,09±0,16	0,94±0,05	0,83±0,37	1,23±0,02
12,13-DiHOME	0,93±0,27	1,24±0,43	1,22±0,39	1,70±0,26	1,16±0,02
9,10-DiHOME	1,17±0,58	1,37±0,81	1,28±0,27	2,01±0,60	1,04±0,01
20-HDoHE	1,78±0,44	1,17±0,19	1,47±0,14	1,18±0,19	1,09±0,24
12-HETE	0,65±0,19	0,84±0,07	0,62±0,14	1,11±0,14	0,36±0,08
5-HETE	0,43±0,36	1,28±0,47	0,19±0,21	1,31±0,21	0,31±0,13
13-HODE	1,94±1,43	1,06±0,34	1,32±0,20	1,31±0,20	1,18±0,01
13-KODE	1,62±0,65	1,43±0,52	1,20±0,45	0,51±0,18	0,93±0,09
9-HODE	2,09±2,42	1,05±0,33	1,52±0,26	1,30±0,11	0,99±0,21
9-KODE	1,17±0,56	1,37±0,63	1,52±0,11	1,61±0,20	1,21±0,12
16-HDoHE	1,12±0,16	0,87±0,10	0,91±0,21	0,91±0,17	0,68±0,12
4-HDoHE	0,24±0,12	1,06±0,35	0,52±0,06	0,73±0,13	0,53±0,35
8-HDoHE	0,28±0,18	1,51±0,51	0,54±0,18	0,91±0,17	0,27±0,16
14-HDoHE	2,06±1,32	2,87±0,75	6,67±1,27	3,81±1,04	1,94±0,03
17-HDoHE	1,05±0,53	1,13±0,28	1,39±0,36	0,51±0,11	0,23±0,04
11-HDoHE	1,24±0,45	0,89±0,36	0,70±0,21	0,95±0,13	1,03±0,07

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Дополнительные материалы по характеристике профилей оксилипинов крови у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова

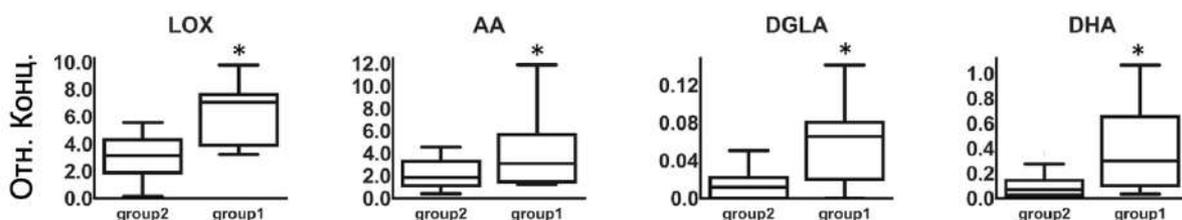
Таблица Б.1. Параметры идентифицированных липидов.

Соединение	CAS номер	Время удерживания (мин)	Целевой (m/z)	ион +/-	Внутренний стандарт
TXB <sub>2</sub>	54397-85-2	9,465	369,2	195,1 (-)	TXB <sub>2</sub> -d4
PGF <sub>2α</sub>	551-11-1	10,27	353,2	193,1 (-)	PGF <sub>2α</sub> -d4
PGE <sub>2</sub>	363-24-6	10,7	351,2	271,2 (-)	PGE <sub>2</sub> -d4
PGD <sub>2</sub>	41598-07-6	11,1	351,2	271,2 (-)	PGD <sub>2</sub> -d4
LTE <sub>4</sub>	75715-89-8	12,72	440,3	189,1 (+)	LTC <sub>4</sub> -d5
PGA <sub>2</sub>	13345-50-1	13,02	333,2	271,2 (-)	PGD <sub>2</sub> -d4
17,18-DiHETE	116477-53-3	13,94	335,2	247,2 (-)	LTB <sub>4</sub> -d4
LTB <sub>4</sub>	71160-24-2	14,12	335,2	195,1 (-)	LTB <sub>4</sub> -d4
12,13-DiHOME	263399-35-5	14,46	313,2	183,1 (-)	LTB <sub>4</sub> -d4
9,10-DiHOME	263399-34-4	14,63	313,2	201,2 (-)	LTB <sub>4</sub> -d4
12-keto-LTB <sub>4</sub>	136696-10-1	14,74	333,2	179,1 (-)	LTB <sub>4</sub> -d4
14,15-DHET	77667-09-5	15,04	337,2	207,2 (-)	LTB <sub>4</sub> -d4
12-HHT	54397-84-1	15,155	279,2	179,1 (-)	LTB <sub>4</sub> -d4
11,12-DHET	192461-95-3	15,36	337,2	167,1 (-)	LTB <sub>4</sub> -d4
8,9-DHET	192461-96-4	15,54	337,2	127,1 (-)	LTB <sub>4</sub> -d4
9-HOTrE	89886-42-0	15,66	293,2	171,1 (-)	LTB <sub>4</sub> -d4
20-carboxy-AA	79551-84-1	15,67	333,2	297,2 (-)	LTB <sub>4</sub> -d4
19-HETE	115461-40-0	15,95	319,2	275,2 (-)	LTB <sub>4</sub> -d4
12-HEPE	81187-21-5	16,385	317,2	179,1 (-)	15-HETE-d8
5-HEPE	83952-40-3	16,45	317,2	115,1 (-)	15-HETE-d8
Lyso-PAF	52691-62-0	16,49	482,3	104,2 (+)	PAF-d4
13-HODE	73804-64-5	16,6	295,2	195,1 (-)	15-HETE-d8
9-HODE	98524-19-7	16,6	295,2	171,1 (-)	15-HETE-d8
20-HdoHE	90906-41-5	16,77	343,2	241,2 (-)	15-HETE-d8
15-HETE	73836-87-0	16,93	319,2	219,2 (-)	15-HETE-d8
13-KODE	54739-30-9	17	293,2	113,1 (-)	15-HETE-d8
16-HdoHE	90780-51-1	17,05	343,2	233,2 (-)	12-HETE-d8

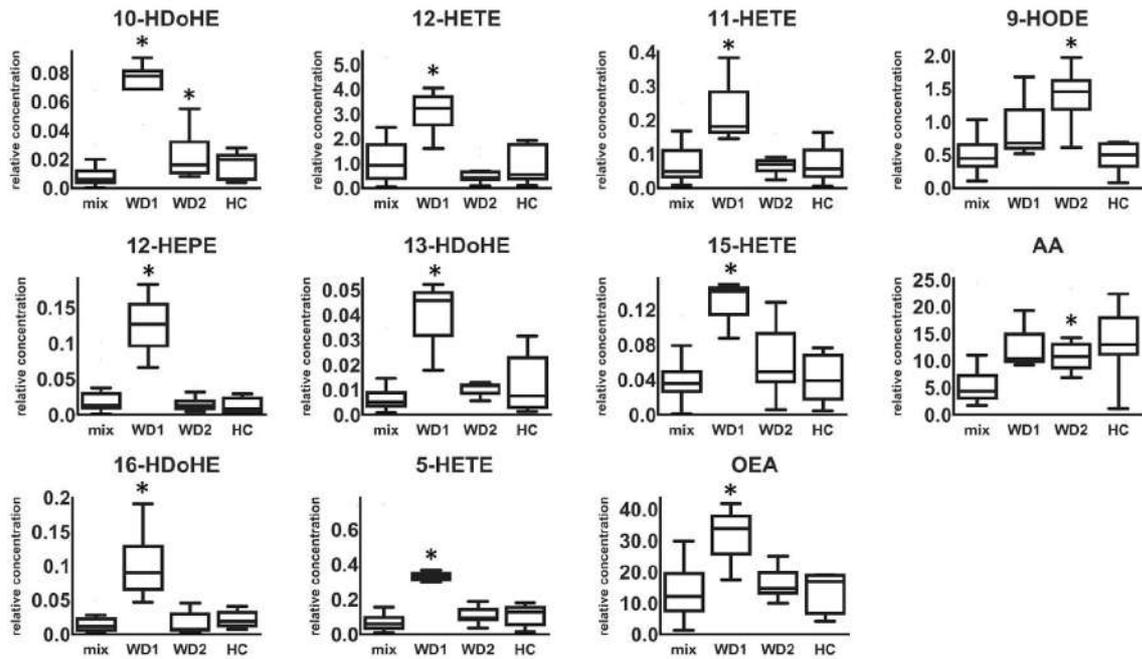
9-KODE	54232-59-6	17,12	293,2	185,1	(-)	12-HETE-d8
11-HETE	73804-65-6	17,125	319,2	167,1	(-)	12-HETE-d8
13-HdoHE	90780-53-3	17,15	343,2	193,1	(-)	12-HETE-d8
10-HdoHE	90780-50-0	17,2	343,2	153,1	(-)	12-HETE-d8
8-HETE	79495-84-4	17,2	319,2	155,1	(-)	12-HETE-d8
14-HdoHE	87042-40-8	17,24	343,2	205,2	(-)	12-HETE-d8
12-HETE	54397-83-0	17,28	319,2	179,1	(-)	12-HETE-d8
8-HDoHE	90780-54-4	17,37	343,2	109,1	(-)	5-HETE-d8
5-HETE	70608-72-9	17,38	319,2	115,1	(-)	5-HETE-d8
15-HETrE	92693-02-2	17,44	321,2	221,2	(-)	5-HETE-d8
4-HDoHE	90906-40-4	17,67	343,2	101,1	(-)	5-HETE-d8
AEA	94421-68-8	18,21	348,2	62,1	(+)	OEA-d4
OEA	111-58-0	19,14	326,2	62,1	(+)	OEA-d4
EPA	10417-94-4	19,415	301,2	257,2	(-)	EPA-d5
DHA	6217-54-5	20,16	327,2	283,2	(-)	DHA-d5
AA	506-32-1	20,32	303,2	303,2	(-)	AA-d8

**Таблица Б.2.** Значения AUC (Area Under Curve) и р-значение для разного количества компонентов.

пcomp	AUC	р-значение
пcomp1	0,7917000	0,00086591
пcomp2	0,8958	6,172e-06
пcomp3	0,9097	2,883e-06
пcomp4	0,8785	1,545e-05
пcomp5	0,8611	3,725e-05



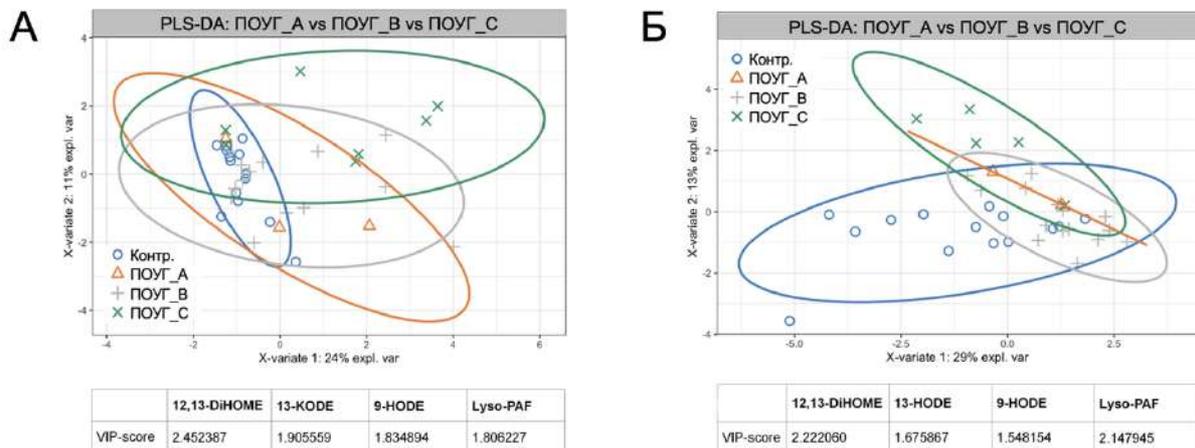
**Рис. Б.1.** Относительные концентрации суммированных метаболитов, которые значительно изменились между группой 1 и группой 2 больных БВК. Концентрации соединений суммировали в зависимости от их предшественников-кислот (AA, DHA, EPA, ALA, DGLA, EA, EPA) или от того, через какие метаболические пути они были получены (COX, CYP, LOX или неферментативные ROS). Здесь показаны только те соединения, которые значительно различаются между группами. Парное сравнение скорректированных средних проводилось с учетом возраста и пола пациентов. \*- $p < 0,05$  (с поправкой на множественное тестирование).



**Рис. Б.2.** Относительные концентрации отдельных метаболитов, достоверно изменившиеся в группах БВК1 и/или БВК2 по сравнению с КГ. Парное сравнение скорректированных средних проводилось с учетом возраста и пола пациентов. \* -  $p < 0,05$  (с поправкой на множественное тестирование).

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

### Дополнительные материалы по характеристике профилей оксипинов слезы и внутриглазной жидкости пациентов с первичной открытоугольной глаукомой



**Рис. В.1.** Изменения содержания сигнальных липидов во ВГЖ (А) и СЖ (Б) пациентов с ПОУГ в зависимости от стадии/ВГД. На осях указана объясненная дисперсия каждого компонента. Учитываются показатели важности переменных в прогнозе (VIP), превышающие значение отсечки 1,5.

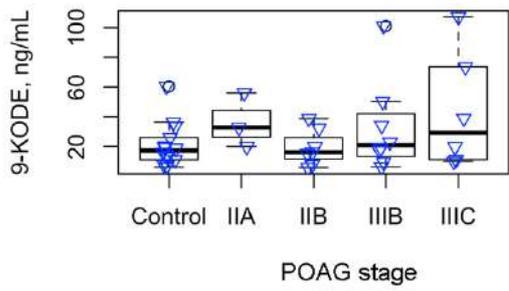
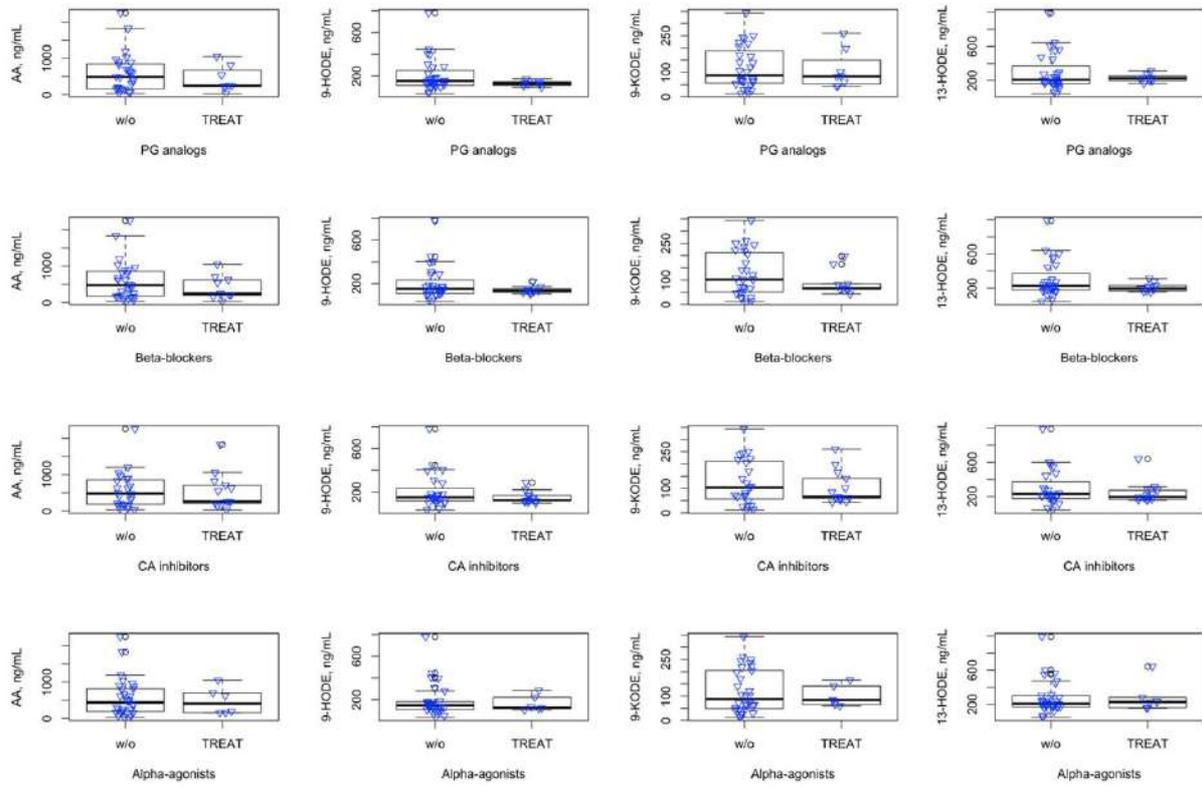
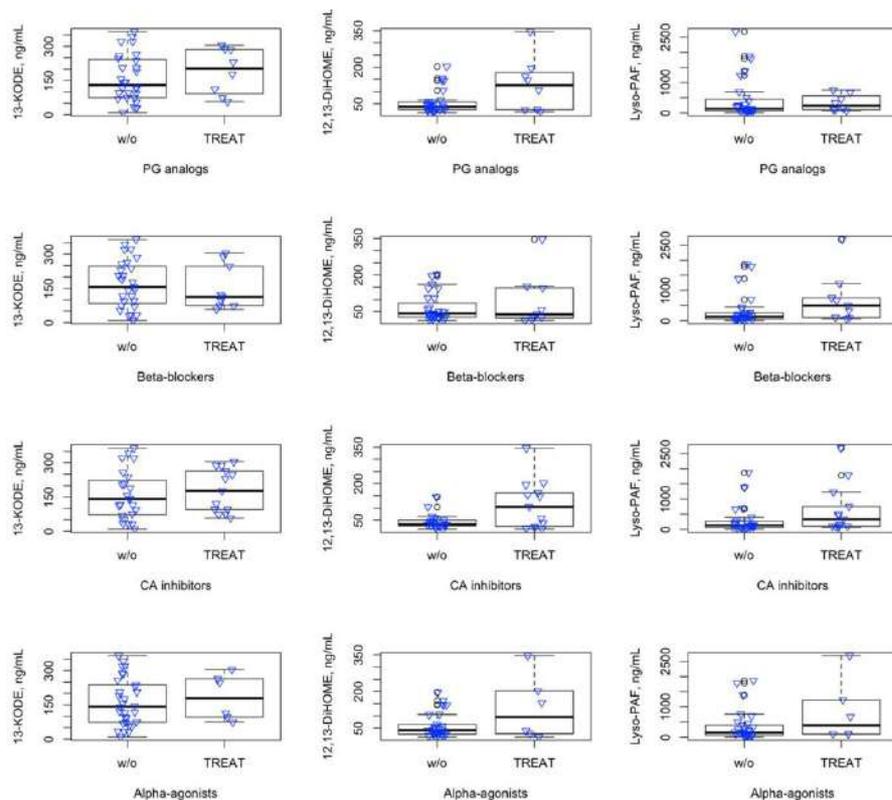


Рис. В.2. Изменение содержания 9-KODE во ВГЖ в зависимости от стадии ПОУГ.





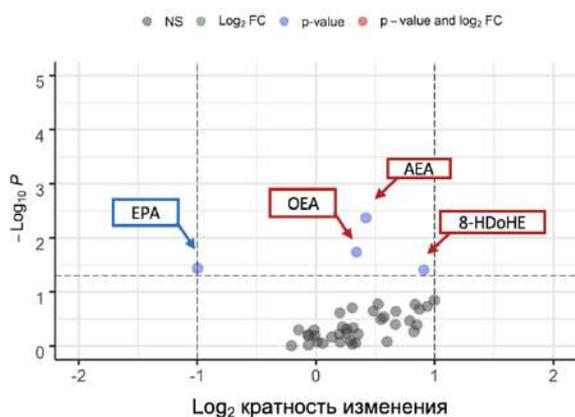
**Рис. В.3.** Влияние лечения антиглаукомными препаратами на структуру сигнальных липидов в СЖ пациентов с ПОУГ.

### ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Дополнительные материалы по характеристике профилей оксипинов крови и данных транскриптомного анализа пациентов с болезнью Паркинсона

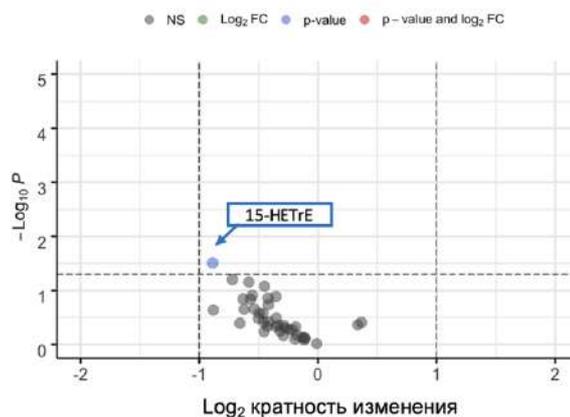
**А**

КГ (Ж vs М)



**Б**

БП (Ж vs М)



**Рис. Г.1.** Изменения концентрации оксипинов у пациентов из КГ и с БП. (А,Б) Вулканные диаграммы, отражающие изменения соединений у женщин (Ж) и мужчин (М) в КГ (А) и БП (Б) соответственно. Ось X указывает на изменение в 2 раза по сравнению с пациентами с БП. По оси Y указаны р-значения (скорректированные) -  $-\log_{10}$ . Отсечение для р-значений указано с учетом поправки Бонферрони. Соединения, которые изменились незначительно, выделены серым цветом. Красными точками отмечены соединения, для которых  $p < 0,05$ .

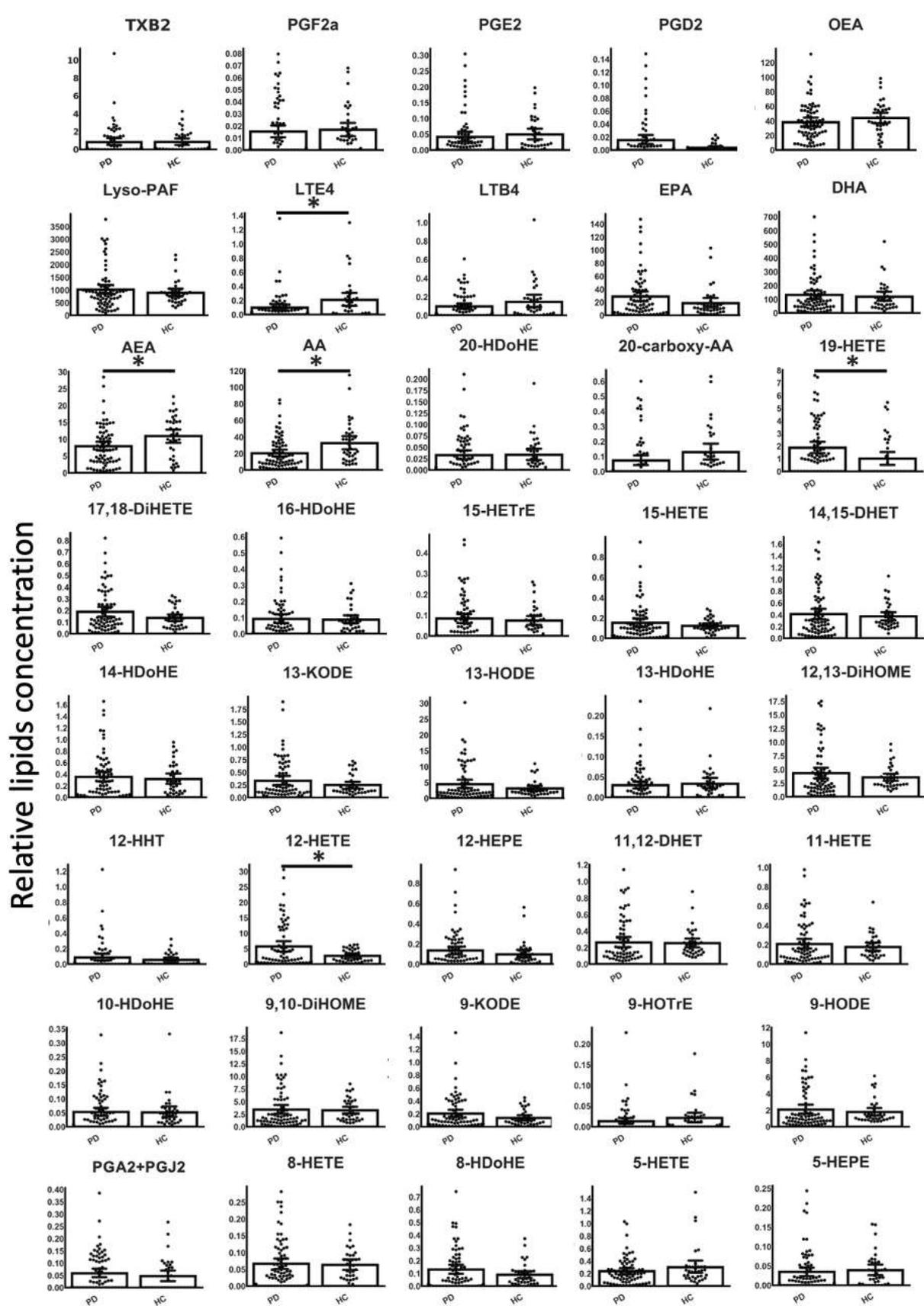


Рис. Г.2. Изменения концентрации оксипинов у пациентов с БП. Относительная концентрация метаболитов в образцах плазмы при БП (PD) по сравнению с образцами плазмы из КГ (HC), \*  $p < 0,05$ .

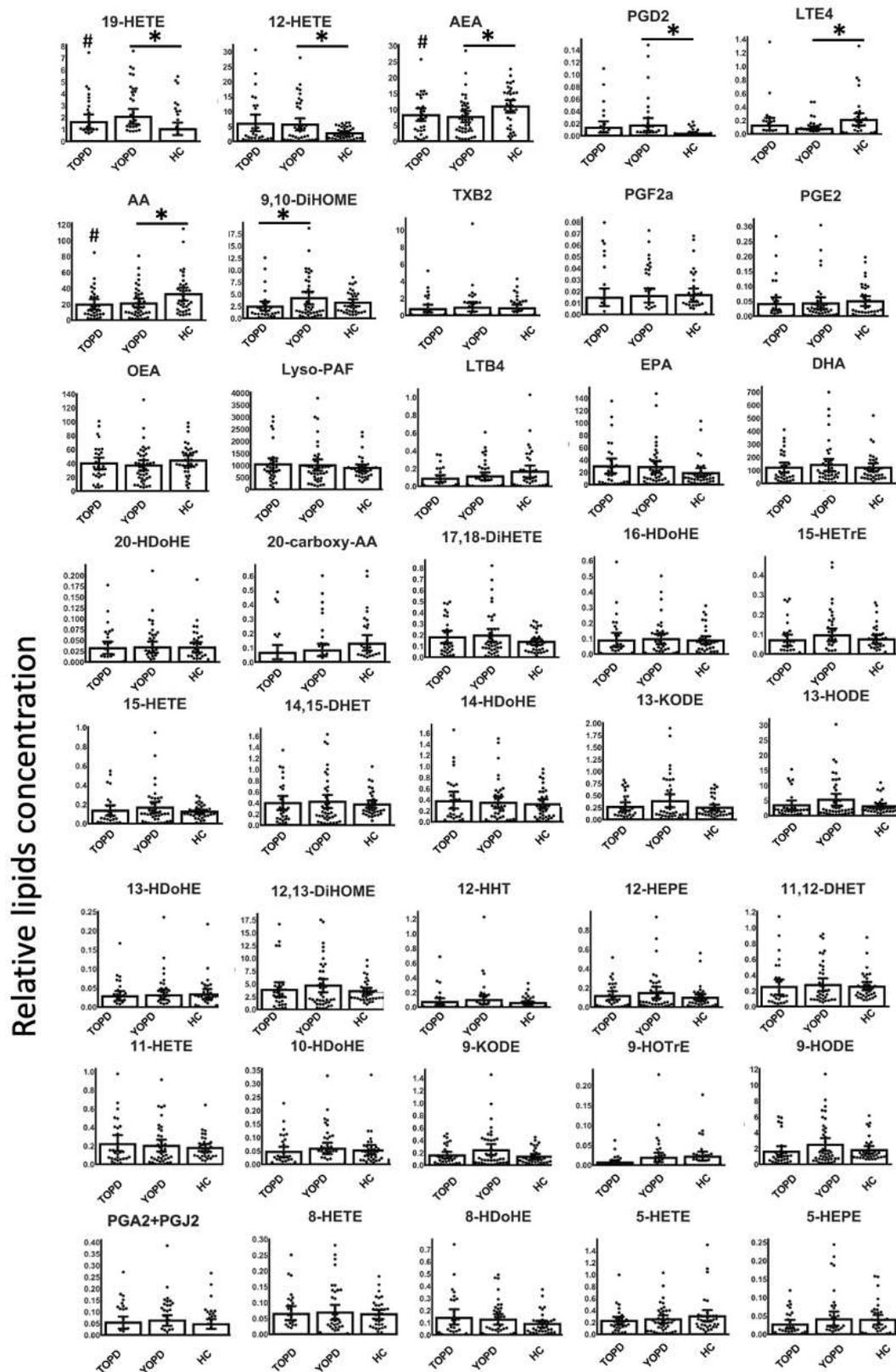
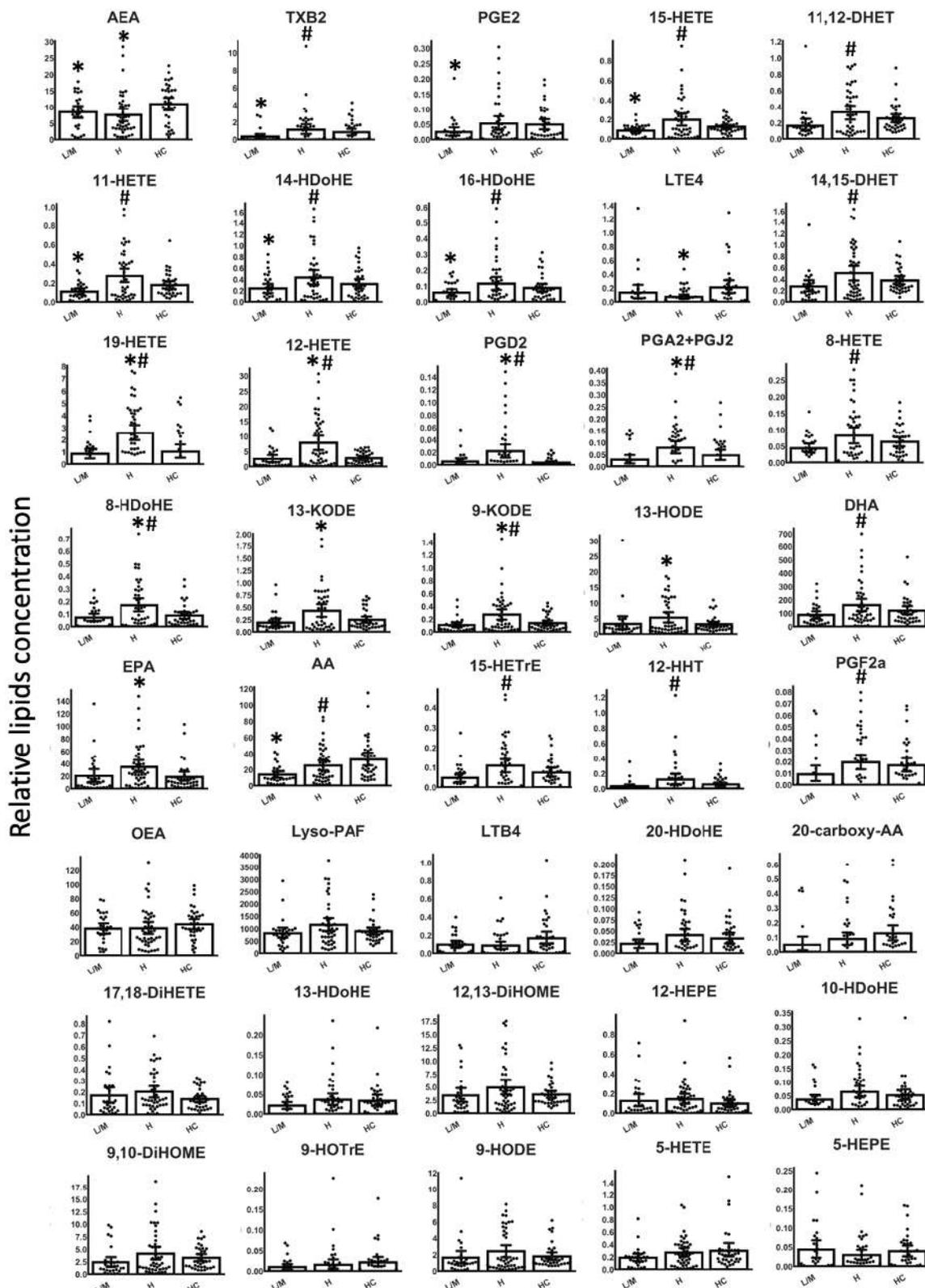


Рис. Г.3. Изменения концентрации оксилипинов у больных БП с разным возрастом начала заболевания. Парное сравнение скорректированных средних проводилось с учетом возраста и пола пациентов. \*  $p < 0,05$ , #  $p < 0,05$  при сравнении TOPD vs КГ (с поправкой на множественное тестирование).



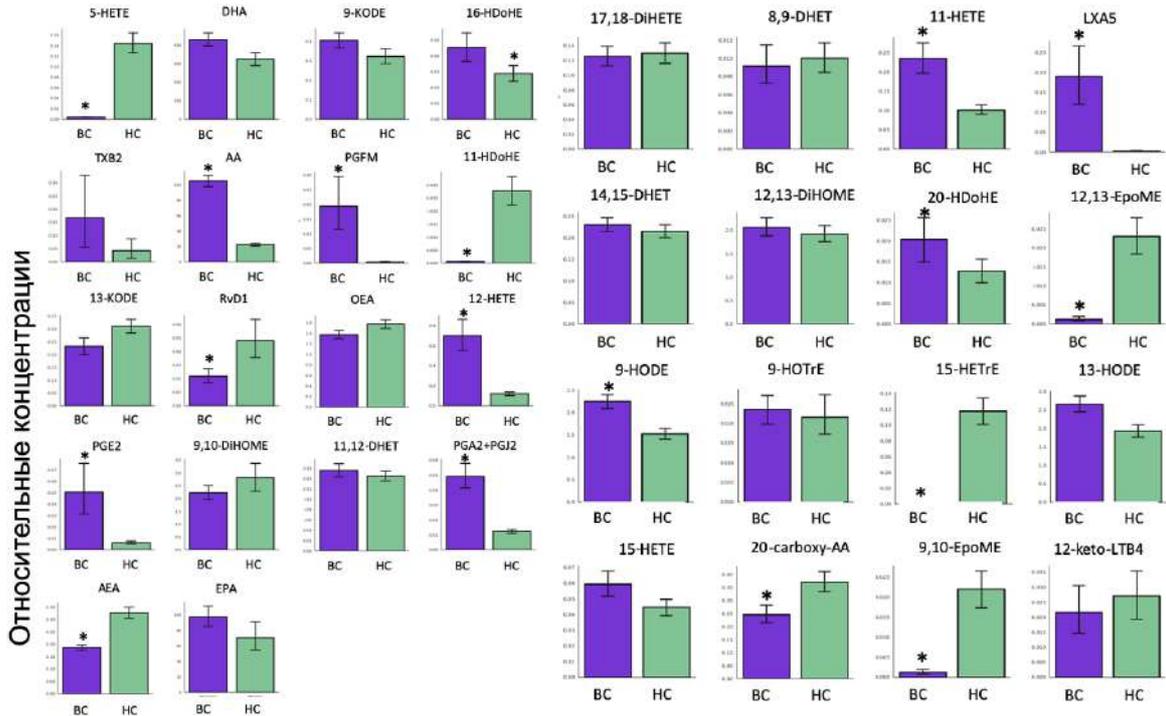
**Рис. Г.4.** Изменения концентрации оксипинов у пациентов с БП разных стадий. Н - пациенты с 3-4 стадией Noehn-Yahr, HC - здоровый контроль, L/M - пациенты с 1-2,5 стадией Noehn-Yahr. \*  $p < 0,05$  по сравнению с пациентами HC, #  $p < 0,05$  по сравнению H vs L/M (с поправкой на множественное тестирование).

**Таблица Г.1. Список ДЭГов метаболизма ПНЖК датасет GSE68719.**

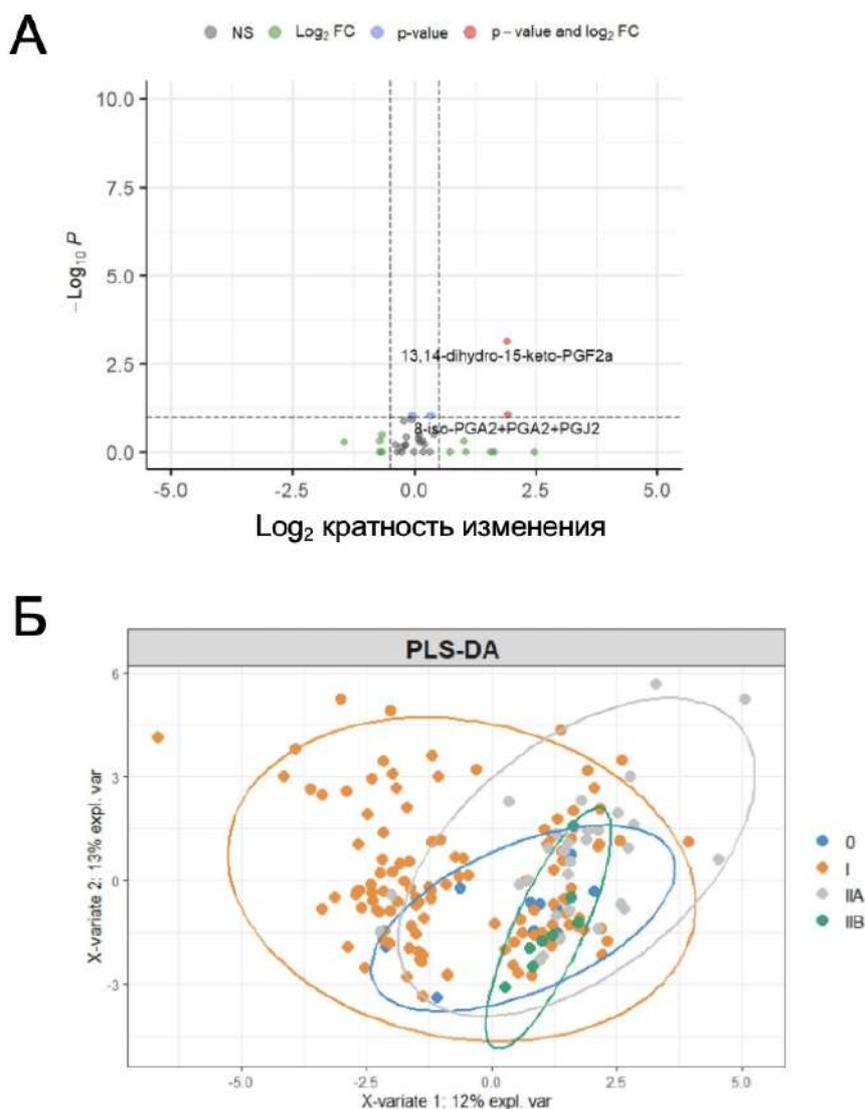
ensembl_gene_id	baseMean	log2 кратность изменения	lfcSE	stat	p- значения	p-adj	Название гена
ENSG00000129219	907,749108	0,615170	0,156004	3,584538	0,000338	0,012126	PLD2
ENSG00000124181	4445,182100	0,622483	0,156916	3,232644	0,001227	0,024197	PLCG1
ENSG00000161714	2230,378937	0,683182	0,155856	4,565493	0,000005	0,001408	PLCD3
ENSG00000187091	739,173214	0,767586	0,171614	3,901385	0,000096	0,006244	PLCD1
ENSG00000149782	544,549744	0,831986	0,158572	4,076127	0,000046	0,004631	PLCB3
ENSG00000137841	567,011574	0,508284	0,142966	2,947931	0,003199	0,040937	PLCB2
ENSG00000123739	1194,988159	-0,440217	0,110407	-3,826886	0,000130	0,007338	PLA2G12 A
ENSG00000144837	157,854866	1,351028	0,234577	4,378318	0,000012	0,002097	PLA1A
ENSG00000162881	24,088166	0,740795	0,187450	2,940933	0,003272	0,041426	OXER1
ENSG00000161048	2046,603267	-0,458255	0,129444	-3,143269	0,001671	0,028943	NAPEPLD
ENSG00000168918	589,039644	0,732682	0,157832	3,233747	0,001222	0,024148	INPP5D
ENSG00000149084	2069,590215	-0,389992	0,123601	-2,916244	0,003543	0,043305	HSD17B1 2
ENSG00000099998	598,733035	0,935563	0,192088	3,687819	0,000226	0,010074	GGT5
ENSG00000221968	2350,755871	0,469154	0,114316	3,796012	0,000147	0,007759	FADS3
ENSG00000134824	4319,567377	0,443209	0,131691	3,047382	0,002308	0,034165	FADS2
ENSG00000143819	3257,226611	0,789482	0,176226	3,821284	0,000133	0,007378	EPHX1
ENSG00000167600	44,407651	0,553360	0,185971	2,900079	0,003731	0,044423	CYP2S1
ENSG00000231852	105,684318	0,981354	0,207619	3,921062	0,000088	0,006046	CYP21A2
ENSG00000132965	158,198404	0,785387	0,228812	3,080653	0,002065	0,032353	ALOX5AP
ENSG00000012779	164,556751	0,685156	0,216105	2,894441	0,003798	0,044905	ALOX5
ENSG00000108839	25,246224	0,578685	0,146530	3,440081	0,000582	0,016335	ALOX12
ENSG00000197142	443,847259	0,814564	0,195539	3,470972	0,000519	0,015215	ACSL5
ENSG00000068366	2080,021880	-0,623290	0,136838	-3,655860	0,000256	0,010659	ACSL4
ENSG00000072778	8485,853258	0,624379	0,140489	3,703574	0,000213	0,009730	ACADVL
ENSG00000100439	711,071077	0,700992	0,168421	3,186332	0,001441	0,026913	ABHD4

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

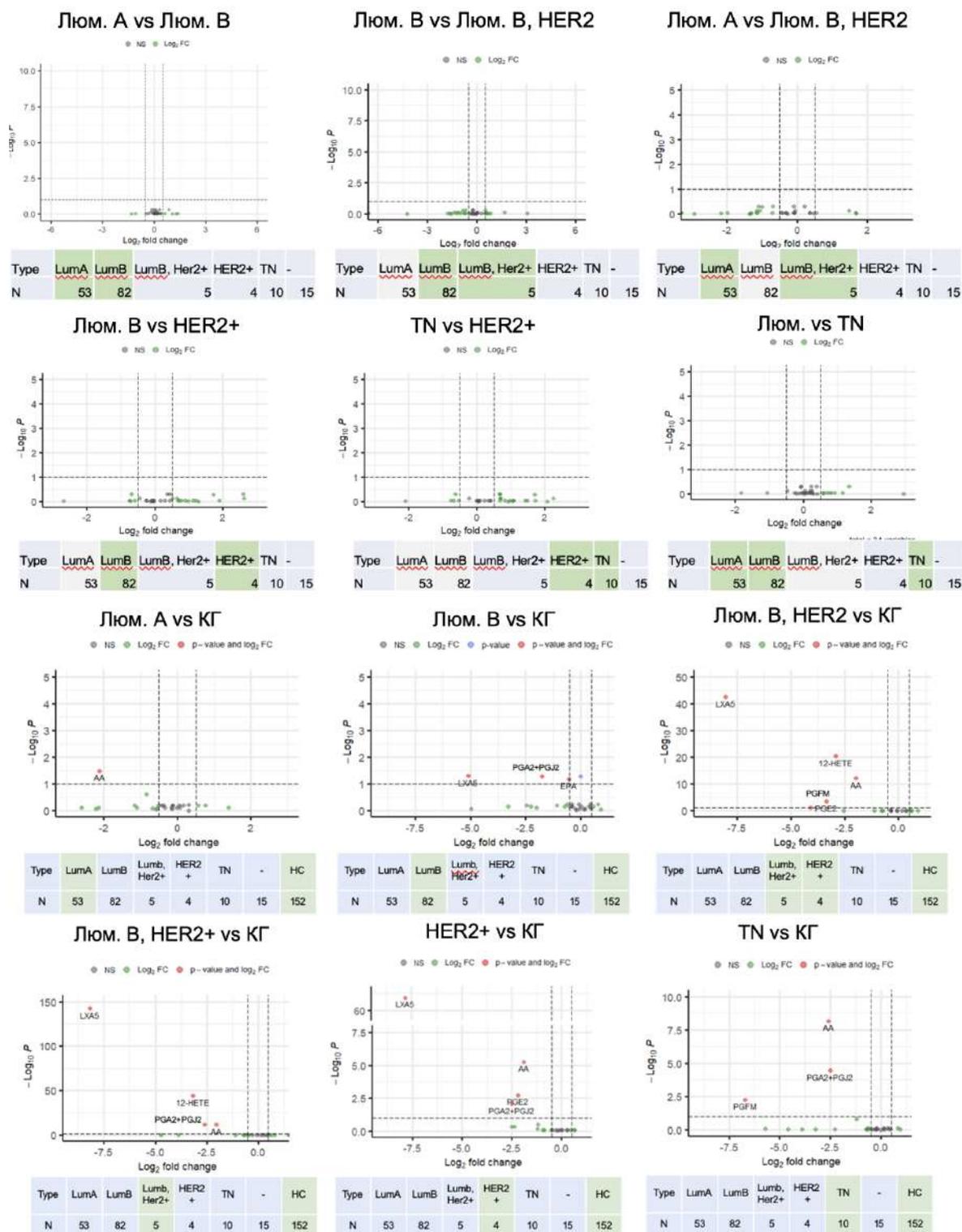
### Дополнительные материалы по характеристике профилей оксипинов крови и данных транскриптомного анализа пациентов с раком молочной железы



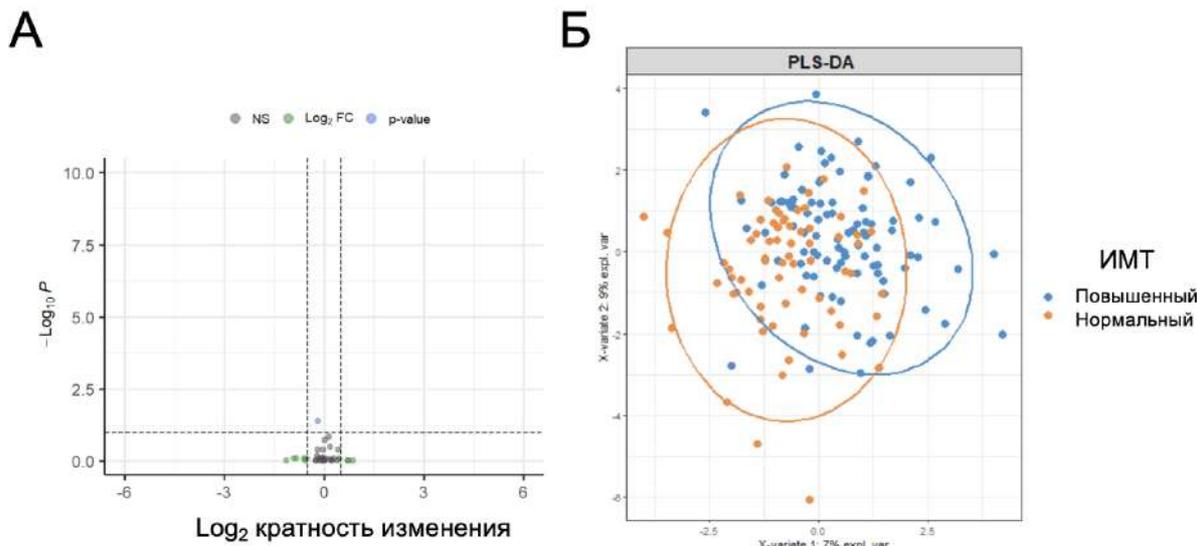
**Рис. Д.1.** Относительные концентрации отдельных оксипинов, измеренные у пациентов с РМЖ (BC), в сравнении с контрольной группой (HC). Парное сравнение скорректированных средних проводилось с учетом возраста и пола пациентов. \*  $p < 0,1$  (с поправкой на множественное тестирование).



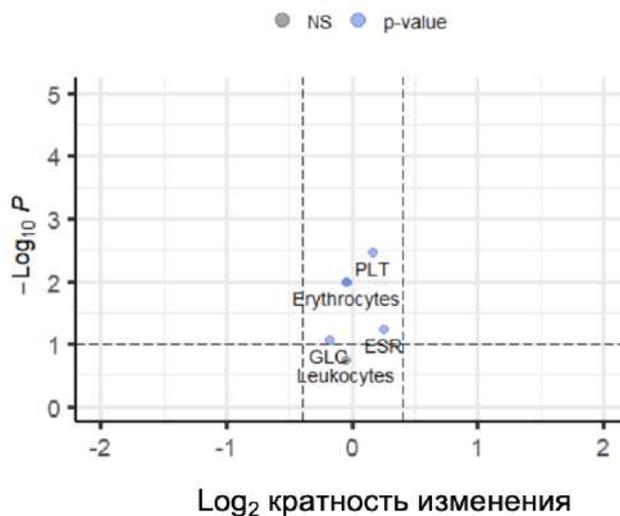
**Рис. Д.2.** Корреляция между стадиями заболевания пациента (0 (n = 12), I/A (n = 118), II (n = 31), II/B (n = 8)) и концентрацией оксипинов. Из-за дисбаланса в группах выборки были объединены группы II и II/B. Результаты были проиллюстрированы с помощью вулканной диаграммы с поправкой Бенджамини-Хохберга и PLS-DA. (А) Вулканная диаграмма с указанием значительно изменившихся соединений. По оси X показано изменение в 2 раза для пациентов с раком молочной железы I стадии против (II + II/B стадии). По оси Y указаны р-значения  $-\log_{10}$ . Отсечение для р-значений указано на основе поправки Бенджамини-Хохберга. Соединения, изменившиеся незначительно, обозначены серым цветом, соединения, чьи значения изменились при РМЖ (относительно КГ) более чем в 2 раза или менее чем в 2 раза, но незначительно, обозначены зеленым цветом. Красными точками обозначены соединения, которые изменились более чем в два раза и имели  $p < 0,1$ . (Б) Модель частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA), дискриминирующая 4 группы пациентов с РМЖ. Объясненная дисперсия каждого компонента указана в скобках на соответствующей оси.



**Рис. Д.3.** Корреляция стадии и молекулярного подтипа с концентрацией оксипинов. В анализе были представлены следующие подтипы: люминальный А (n = 53), люминальный В (n = 82), люминальный В, Her2+ (n = 5), Her2+ (n = 4), тройной негативный (n = 10). По оси X показано изменение в 2 раза в сравниваемых группах, по оси Y - p-значения (с поправкой)  $-\log_{10}$ . Отсечение для p-значений указано на основе поправки Бенджамина-Хохберга. Соединения, изменившиеся незначительно, обозначены серым цветом, соединения, чьи значения изменились в подтипе БК (относительно КГ) более чем в два раза или менее чем в два раза, обозначены зеленым цветом. Красными точками отмечены соединения, которые изменились более чем в два раза и имели  $p < 0,1$



**Рис. Д.4.** Корреляция индекса массы тела (ИМТ) и концентрации оксипинов. Анализ представлен для следующей выборки с соответствующими индексами: недостаточный вес  $< 18,5$  ( $n = 6$ ), нормальный вес  $18,5-24,9$  ( $n = 68$ ), избыточный вес  $25-29,9$  ( $n = 50$ ) и ожирение  $> 30$  ( $n = 45$ ). (А) Вулканная диаграмма с указанием значительно измененных соединений. Ось X указывает на изменение ИМТ в 2 раза у пациентов с раком молочной железы. По оси Y указаны р-значения  $-\log_{10}$  (с поправкой). Отсечение для р-значений указано на основе поправки Бенджамина-Хохберга. Соединения, которые изменились незначительно, обозначены серым цветом, соединения, чьи значения изменились в РМЖ (по сравнению с РМЖ) более чем в 2 раза или менее чем в 2 раза, но незначительно, обозначены зеленым цветом. (В) Модель частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA), дискриминирующая 2 группы пациентов с РМЖ (с нормальным и высоким индексом ИМТ). Объясненная дисперсия каждого компонента указана в скобках на соответствующей оси.



**Рис. Д.5.** Корреляция биохимических маркеров крови с концентрацией оксипинов. У пациентов с РМЖ ( $n = 71$ ) и доноров КГ ( $n = 126$ ) были получены данные анализа крови на различные биохимические показатели: лейкоциты, моноциты (MONO), лимфоциты (LYM), тромбоциты (PLT), нейтрофилы (NE), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), глюкоза (GLC), скорость оседания эритроцитов (ESR), эритроциты, эозинофилы (EOS) и базофилы (BASO). Вулканная диаграмма, показывающая значительные изменения маркеров.