

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Горбатенко Владислав Олегович

**Взаимосвязь врожденного иммунитета и энергетического
метаболизма в клеточной модели гипергликемии на первичных
астроцитах**

Специальность 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена на факультете биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители: **Сергеева Марина Глебовна**
доктор химических наук

Чистяков Дмитрий Викторович
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Шеваль Евгений Валерьевич**
доктор биологических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, отдел электронной микроскопии, лаборатория ультраструктуры клеточного ядра, заведующий лабораторией

Горбачева Любовь Руфэлевна
доктор биологических наук, доцент, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, лаборатория общей физиологии и регуляторных пептидов, ведущий научный сотрудник

Крестинина Ольга Владимировна
кандидат биологических наук, Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, лаборатория биофармакологии, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится 18 июня 2026 г. в 17:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.10 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3954>

Автореферат разослан «__» мая 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Д.В. Чистяков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1. Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Формирование иммунометаболизма как междисциплинарной области позволило установить, что активация врожденного иммунитета патоген-ассоциированными (PAMP) и эндогенными (DAMP) молекулярными паттернами неразрывно связана с перестройкой энергетического обмена клетки. Нарушение этого баланса ведет к хроническому воспалению, лежащему в основе неинфекционных заболеваний, а в ЦНС к нейровоспалению, сопровождающему болезни Альцгеймера, Паркинсона, рассеянный склероз, эпилепсию и инсульт.

Установление принципов управления метаболическим окружением представляет новые возможности для повышения выживаемости и эффективности биоинженерных тканевых конструкций. Астроциты, наиболее многочисленная глиальная популяция ЦНС, занимают ключевое положение на стыке энергетического метаболизма и врождённого иммунитета мозга: являясь основными потребителями глюкозы и обеспечивая метаболическую поддержку нейронов, они одновременно экспрессируют функциональный набор толл-подобных рецепторов, обеспечивающих дифференцированный ответ на бактериальные (TLR4) и вирусные (TLR3) стимулы. Концепция метаболического репрограммирования глии активно развивается, однако влияние уровня глюкозы на TLR-опосредованные воспалительные ответы астроцитов остаётся практически неизученным. Понимание процессов клеточной адаптации лежит в основе создания трехмерных культур *in vitro*, имитирующих естественную тканевую среду. Такие модели служат инструментом для изучения нейрональной активности, а также платформой для разработки технологий тканевой инженерии и регенеративной терапии нейродегенеративных заболеваний.

Гипергликемия оказывает самостоятельное провоспалительное действие на астроциты, индуцируя экспрессию цитокинов, генерацию АФК, активацию NF-κB и STAT3, а также изменяя профили оксипиринов, метаболитов полиненасыщенных жирных кислот. Внедрение масс-спектрометрического профилирования оксипиринов открыло возможность их системного анализа, однако комплексное исследование профилей оксипиринов при одновременном воздействии гипергликемии и TLR-стимуляции в астроцитах ранее не проводилось. Важным, но недостаточно исследованным компонентом нейровоспаления является пуринергическая сигнализация: внеклеточный АТФ как DAMP-сигнал активирует

провоспалительные каскады через P2-рецепторы, при этом его роль как самостоятельного стимула и влияние гипергликемии на пуринаргическую сигнализацию в астроцитах остаются невыясненными.

Метформин, препарат первой линии терапии сахарного диабета 2-го типа, привлекает внимание как потенциальный модулятор нейровоспаления благодаря многокомпонентному действию: ингибированию комплекса I, активации АМПК, подавлению NF-κB. Показано, что метформин ослабляет провоспалительный ответ астроцитов при гипергликемии и ингибирует реактивный астроглиоз. Однако комплексный анализ влияния метформина на дифференциальную активацию TLR3/TLR4 и пуринаргических каскадов в астроцитах, включающий оценку энергетического метаболизма, сигнальных путей (MAPK, STAT3, NF-κB), цитокинового ответа и профилей оксипинов в условиях гипергликемии, до настоящего времени не проводился. Это определяет актуальность настоящего исследования, имеющего как фундаментальное значение для понимания механизмов нейровоспаления при метаболических нарушениях, так и практическое – для обоснования использования клеточной модели гипергликемии на первичных астроцитах как потенциальной биоинженерной платформы для рационального проектирования условий культивирования и фармакологической модуляции в клеточных нейроглиальных системах.

2. Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы, выполненной с использованием методов клеточной биоинженерии, было установить, как изменения энергетического метаболизма астроцитов при адаптации к различным концентрациям глюкозы влияют на характер ответа при активации TLR3/TLR4 и пуринаргической системы, оценить возможность управления этими процессами метформином на уровне сигнальных путей, цитокинового ответа и метаболизма оксипинов, для обоснования данной клеточной модели как биоинженерной платформы для проектирования условий культивирования и фармакологической модуляции в клеточных нейроглиальных системах.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать изменения энергетического метаболизма с использованием метода анализа биоэнергетики клеток в реальном времени (Seahorse XFp) в астроцитах в условиях клеточной нормо- (5 мМ, NG) и

гипер- (22,5 мМ, НГ) гликемии при действии метформина и активации TLR4 (LPS) и TLR3 (PIC) рецепторов.

2. Оценить влияние метформина на TLR-индуцированные изменения энергетического метаболизма, продукцию цитокинов, генерацию активных форм кислорода (АФК) в астроцитах в условиях нормо- и гипергликемии.

3. Оценить роль внеклеточного АТФ как DAMP-сигнала в регуляции провоспалительных ответов астроцитов и его взаимодействие с метформином в условиях гипергликемии.

4. Исследовать модуляцию метформином внутриклеточных сигнальных путей (MAPK ERK1/2, p38, STAT3, NF-κB), участвующих в реализации эффектов АТФ и TLR-стимулов в условиях нормо- и гипергликемии.

5. Исследовать профили оксипинов и полиненасыщенных жирных кислот во внеклеточной среде астроцитов при стимуляции TLR4, TLR3 и пуринергических рецепторов, а также при воздействии метформина в условиях нормо- и гипергликемии.

6. Оценить потенциал клеточной модели гипергликемии как биоинженерной платформы и средства для исследования регуляции воспалительных процессов и направленного фармакологического воздействия на нейроглиальные клетки.

3. Научная новизна работы

Впервые проведена комплексная оценка состояния энергетического обмена (включая гликолиз и окислительное фосфорилирование) в первичной культуре астроцитов, подвергнутых адаптации к условиям гипергликемии, и выявлена их повышенная восприимчивость к стимуляции толл-подобных рецепторов.

Впервые продемонстрирован контекстно-зависимый характер действия метформина на астроциты, выражающийся в его способности влиять на провоспалительные сигнальные каскады и разнонаправленно изменять продукцию цитокинов и оксипинов в зависимости от концентрации глюкозы в среде и типа использованного TLR-стимула.

Впервые установлено, что способность метформина подавлять образование провоспалительных цитокинов и оксипинов реализуется избирательно и определяется тем, какой именно путь TLR (TLR4 или TLR3) активирован, а также уровнем глюкозы, что свидетельствует о существовании нескольких дискретных механизмов его действия.

Впервые проведен полномасштабный анализ профиля оксипинолов, синтезируемых астроцитами в ответ на стимуляцию АТФ, и показана его роль как потенциального модулятора разрешения воспаления.

Полученные данные формируют подходы к управлению энергетическим метаболизмом и липидным медиаторным профилем астроцитов в моделях нейровоспаления. Это позволяет использовать предложенную клеточную систему как потенциальную биоинженерную платформу для оптимизации условий культивирования и фармакологической модуляции.

4. Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты расширяют фундаментальные представления о взаимодействии энергетического метаболизма и врожденного иммунитета на клеточном уровне. Полученные данные о зависимости противовоспалительных эффектов метформина от метаболического состояния клеток имеют важное значение для понимания механизмов действия этого препарата. Выявленные особенности метаболического перепрограммирования астроцитов открывают новые возможности для разработки терапевтических подходов к лечению нейродегенеративных заболеваний, связанных с нарушениями метаболизма глюкозы, позволяют создавать оптимальные составы питательных сред, включая глюкозу и другие метаболиты, для трехмерных клеточных систем применяемых при разработке регенеративных технологий. Подобное управление метаболическим окружением открывает перспективы для повышения выживаемости и эффективности биоинженерных тканевых конструкций.

5. Методология исследования

В исследовании были использованы современные методы молекулярной биологии и биохимии, включая работу с первичными клеточными культурами, анализ биоэнергетики клеток в реальном времени (Seahorse XFp), ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, иммуноферментный анализ и высокоэффективную жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией (UPLC-MS/MS). Все использованные методики соответствуют общепринятым мировым стандартам и выполнены с необходимым контролем, являются общепринятыми, воспроизводимыми и соответствуют современному уровню исследований в области биоинженерии, молекулярной биологии и биохимии клетки.

6. Основные положения, выносимые на защиту

1. Активация TLR-опосредованных путей не влияет на энергетический метаболизм астроцитов, адаптация астроцитов к повышенной концентрации глюкозы приводит к перестройке энергетического метаболизма (изменение базального гликолиза, негликолитического закисления и дыхательной емкости), что модифицирует последующий TLR-опосредованный иммунный ответ.

2. Метформин оказывает контекстно-зависимое действие, индуцируя сдвиг энергетического метаболизма в сторону гликолиза, модулируя провоспалительные сигнальные пути (NF-κB, STAT3, ERK1/2) и дифференциально перестраивая профили цитокинов и оксипинов в зависимости от гликемического статуса и TLR-стимула (LPS/TLR4 или PIC/TLR3).

3. Внеклеточный АТФ в исследованной модели не является классическим провоспалительным агентом, так как не индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов, но модулирует профиль синтезируемых оксипинов в сторону, которая может способствовать разрешению воспаления; его эффекты и их модуляция метформином также зависят от адаптации клеток к уровню глюкозы.

4. Разработанная клеточная модель гипергликемии на первичных астроцитах представляет основу биоинженерной платформы и средство для исследования свойств и явлений в живых системах и для направленного фармакологического воздействия на нейроглиальные клетки в целях регуляции воспалительных процессов.

7. Достоверность результатов

При написании обзора литературы использовались современные научные работы, соответствующие тематике диссертационного исследования. Экспериментальные данные были получены благодаря применению комплекса современных подходов: для оценки параметров энергетического обмена задействована технология Seahorse, анализ оксипинов выполнялся методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (UPLC-MS/MS), а изучение экспрессии генов и продукции белков проводилось с использованием стандартных молекулярно-биологических методик. Обработка полученных результатов осуществлялась средствами языка Python и специализированных статистических библиотек. Основные результаты опубликованы в международных рецензируемых журналах.

8. Личный вклад автора

Основные результаты, представленные в диссертации, получены лично автором. Личный вклад включает проведение анализа научной литературы по теме исследования, разработку дизайна экспериментов и их непосредственное выполнение, а также последующую обработку и интерпретацию полученных данных. Автором осуществлялась подготовка рукописей статей к публикации в рецензируемых изданиях и представление результатов работы на научных конференциях. Непосредственное измерение концентрации оксипинов методом тандемной масс-спектрометрии (UPLC-MS/MS) проводилось при участии Горяинова С.В. Исследование на анализаторе Seahorse XF проводилось при участии Бабенко В.А.

9. Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия.

10. Апробация результатов

Результаты работы были представлены на съезде европейского биохимического общества FEBS2024 (Италия, Милан, 2024), XXIX Всероссийской научно-практической конференция «Интерпретация результатов лабораторных исследований» (Россия, Москва, 2024), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022» (Россия, Москва, 2022), III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Россия, Сочи, 2021), конференции «Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ» (Россия, Москва, 2025).

11. Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, основных выводов и списка литературы. Работа изложена на 131 странице, иллюстрирована 21 рисунком, 4 таблицами. Список цитируемой литературы включает 233 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Культивирование клеток. Первичные астроциты выделяли из коры головного мозга новорожденных крыс по стандартной методике. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Модель клеточной гипергликемии: Астроциты адаптировали к нормальной концентрации глюкозы (NG, 5 мМ) или высокой концентрации глюкозы (HG, 22,5 мМ) в течение 48 часов перед экспериментами. Параметры гликолиза и окислительного фосфорилирования определяли с помощью анализатора Seahorse XFp (Agilent Technologies), измеряя скорость внеклеточного закисления (ECAR) и потребления кислорода (OCR). Для стимуляции клеток использовали липополисахарид (LPS, 100 нг/мл, агонист TLR4), поли I:C (PIC, 10 мкг/мл, агонист TLR3), АТФ (100 мкМ). Метформин добавляли в концентрации 2,5 мМ за 24 часа до стимуляции. Для анализа экспрессии генов РНК выделяли с помощью набора GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific), кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы. Экспрессию генов анализировали методом количественной ПЦР в реальном времени. Концентрацию цитокинов в супернатантах определяли методом ELISA. Активность внутриклеточных сигнальных белков анализировали методом иммуноблоттинга. Профили оксипинов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (UPLC-MS/MS). Статистический анализ. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Для сравнения групп использовали t-тест Стьюдента или однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Характеристика изменений энергетического ответа астроцитов, культивируемых в разных концентрациях глюкозы, при стимуляции TLR4 и TLR3 рецепторов и модуляции метформином

Первым этапом исследования стала характеристика базовых изменений энергетического метаболизма. Астроциты культивировали в среде с повышенной (22,5 мМ, гипергликемия, HG) и нормальной (5 мМ, нормогликемия, NG) концентрацией глюкозы в течение 48 ч для адаптации к условиям. Затем клетки стимулировали агонистами TLR4 (LPS, 100 нг/мл, 4 ч) или TLR3 (PIC, 10 мкг/мл, 6 ч). В отдельных экспериментах за 24 ч до

стимуляции добавляли метформин (2,5 мМ) — ингибитор комплекса I дыхательной цепи митохондрий.

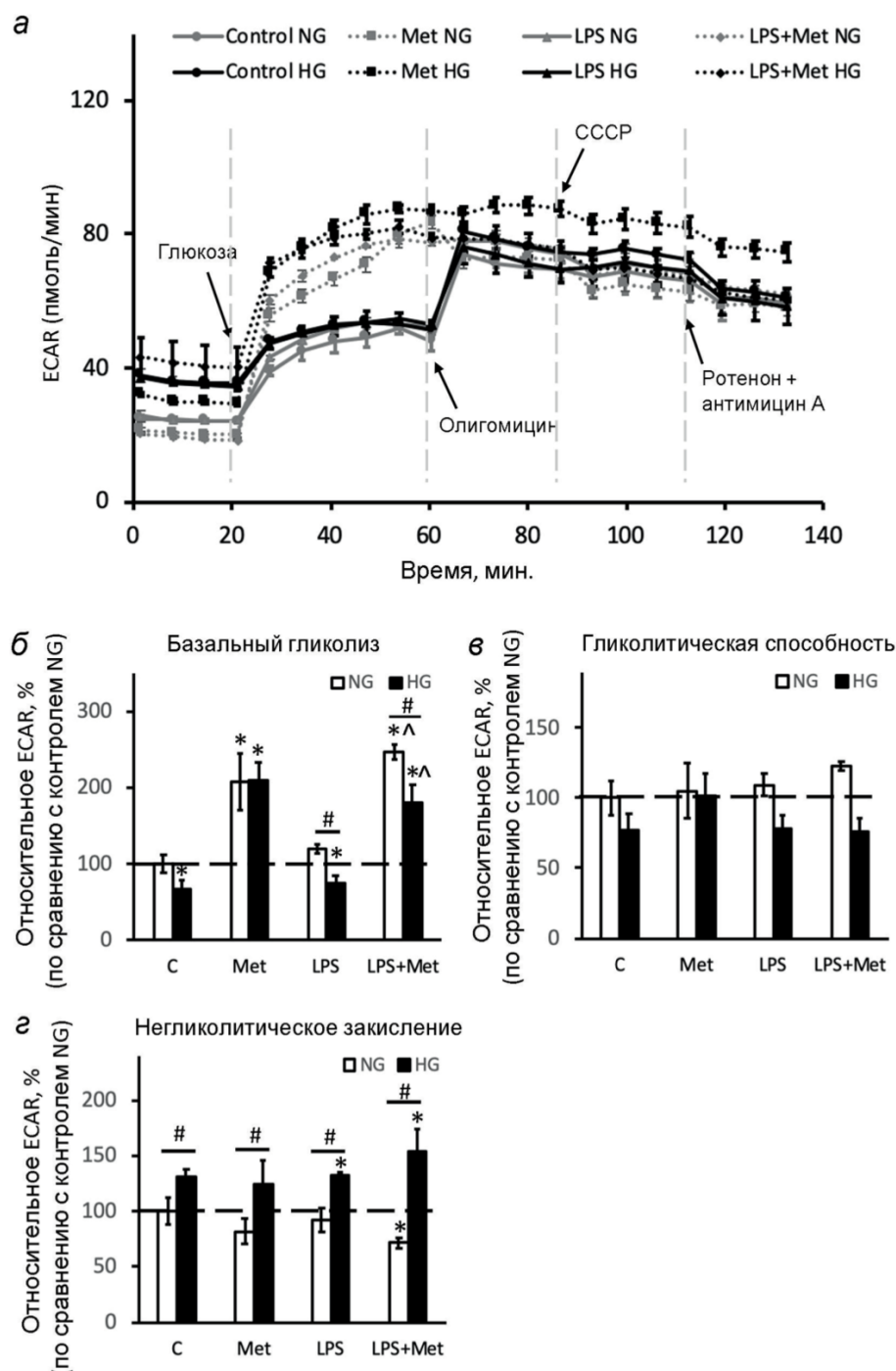


Рис. 1. Влияние стимуляции LPS и предварительной обработки метформином на ECAR в астроцитах, культивируемых в 22,5 мМ (HG) или 5 мМ (NG) глюкозы.

Адаптация к высокой концентрации глюкозы приводила к значительным изменениям в энергетическом профиле астроцитов. Наблюдалось снижение базального гликолиза (Рис. 1.б) и увеличение негликолитического закисления (Рис. 1.г) по сравнению с клетками,

культивируемыми при нормальной концентрации глюкозы. Одновременно отмечалось увеличение дыхательной емкости митохондрий (Рис. 2.д), что указывает на адаптивные изменения в митохондриальном аппарате в условиях гипергликемии.

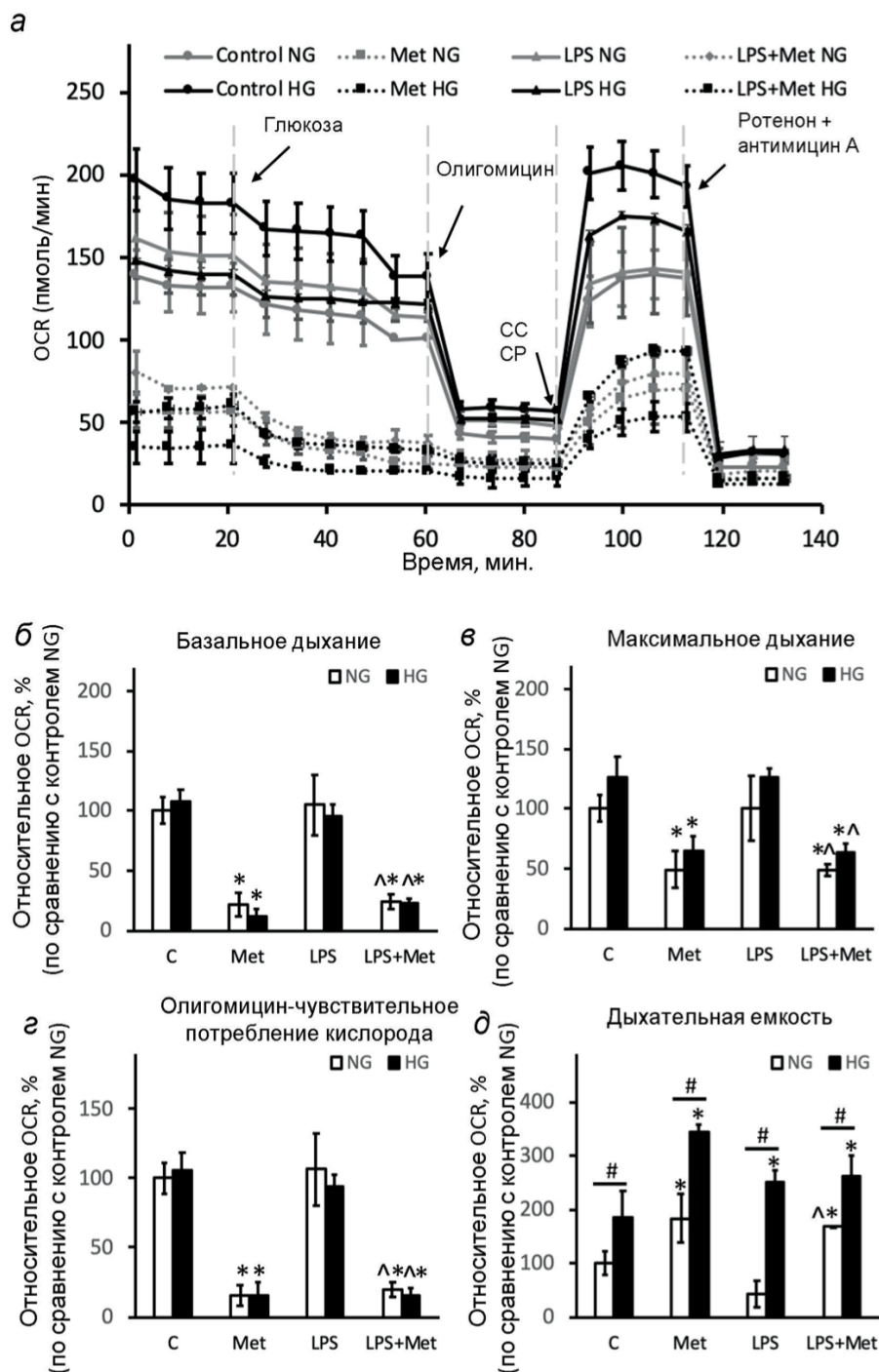


Рис. 2. Влияние стимуляции LPS и предварительной обработки метформином на OCR в астроцитах, культивируемых в 22,5 мМ (HG) или 5 мМ (NG) глюкозы.

Острая стимуляция TLR4 (LPS) или TLR3 (PIC) в целом не оказывала выраженного влияния на основные параметры энергетического

метаболизма астроцитов. В условиях нормальной глюкозы LPS не изменял параметры гликолиза и окислительного фосфорилирования (Рис. 1.б-г, 2.б-д). Стимуляция PIC приводила лишь к незначительному уменьшению максимального дыхания (Рис. 3.в), не затрагивая другие показатели. В условиях гипергликемии, несмотря на измененный базальный метаболический профиль, ни LPS, ни PIC также не вызывали достоверных изменений в исследованных параметрах энергетического обмена (Рис. 1-3).

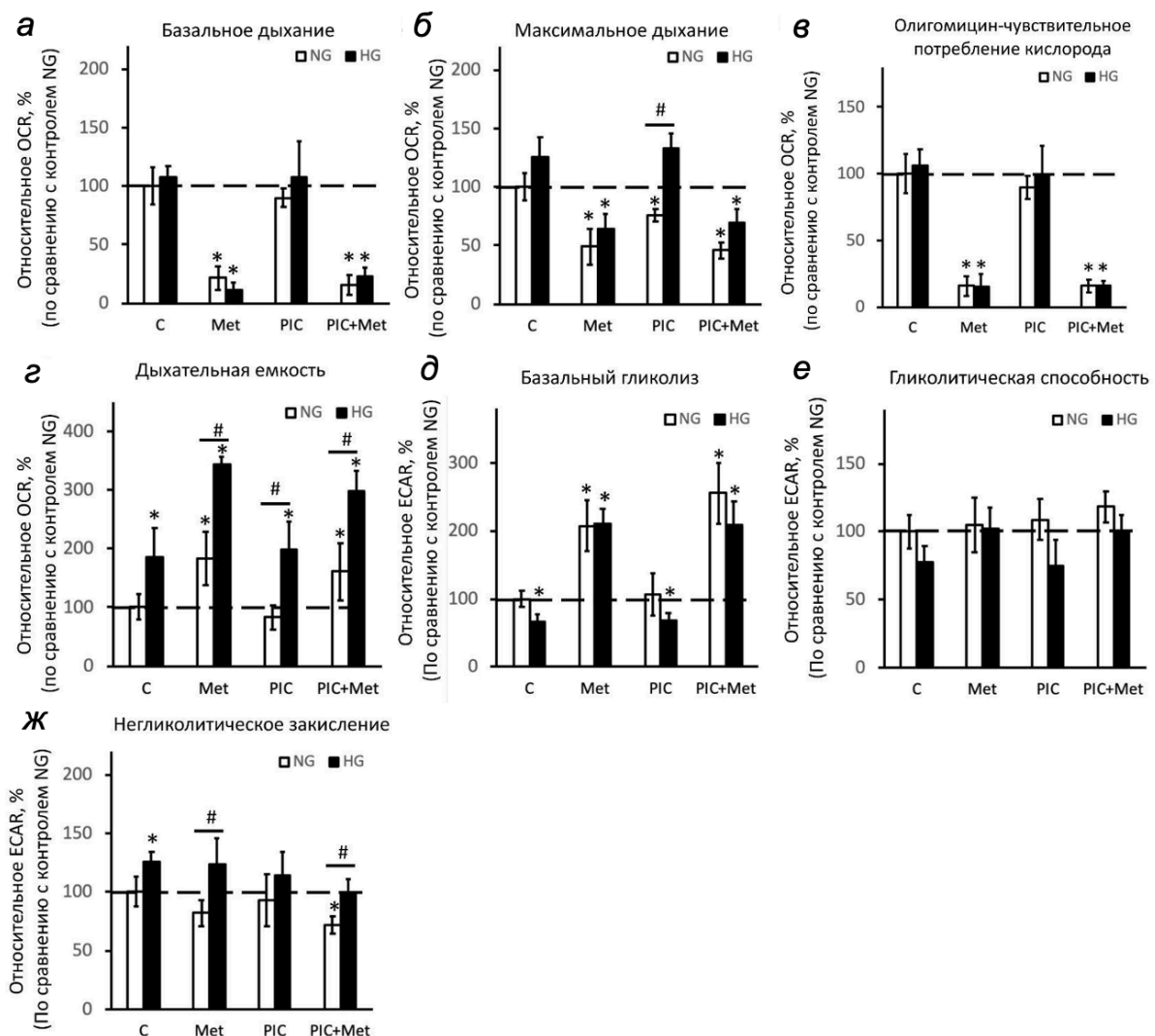


Рис. 3. Влияние стимуляции PIC и предварительной обработки метформином на OCR и ECAR в астроцитах, культивируемых в 22,5 мМ (HG) или 5 мМ (NG) глюкозы.

Метформин оказывал выраженное и воспроизводимое влияние на энергетический метаболизм астроцитов, которое не модулировалось последующей TLR-стимуляцией. Под действием метформина наблюдалось увеличение базального гликолиза вне зависимости от концентрации

глюкозы в среде культивирования (Рис. 1.б). При этом происходило снижение основных показателей митохондриального дыхания: базального дыхания, максимального дыхания и олигомицин-чувствительного потребления кислорода, отражающего дыхание, сопряженное с синтезом АТФ (Рис. 2.б-г). Интересно, что метформин увеличивал дыхательную емкость митохондрий только в условиях гипергликемии (Рис. 2.д), что указывает на качественные различия в его действии в зависимости от исходного метаболического состояния клеток. Описанные эффекты метформина, характерные для метаболического перепрограммирования по Варбург-подобному типу, сохранялись и на фоне стимуляции как LPS, так и PIC.

Характеристика ответа астроцитов на стимуляцию TLR4 (LPS), TLR3 (PIC) и метформина по уровню цитокинов и других маркеров воспаления.

Маркерами воспаления были выбраны: фактор некроза опухоли альфа (*TNF α*), интерлейкин 1 бета (*IL-1 β*), интерлейкин 6 (*IL-6*), провоспалительный фермент iNOS (индуцибельная NO-синтазы) и противовоспалительный интерлейкин 10 (*IL-10*). Эти маркеры являются классическими для оценки клеточных воспалительных ответов и характеристики состояния системы врожденного иммунитета.

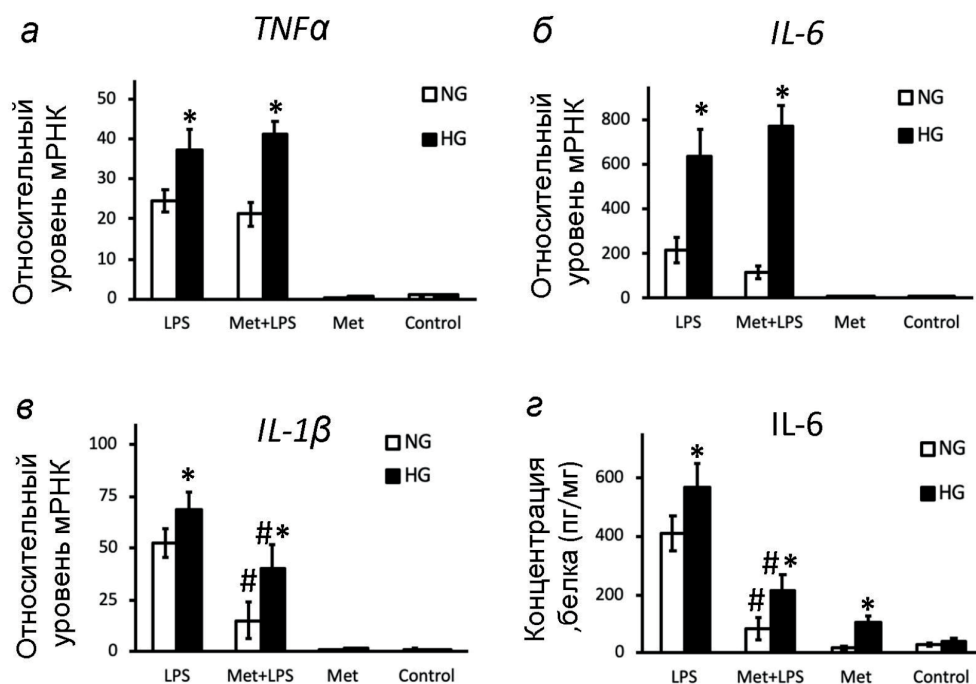


Рис. 4. Влияние метформина на LPS-стимулированную экспрессию генов цитокинов (*TNF α* , *IL-1 β* , *IL-6*)

Адаптация астроцитов к повышенной концентрации глюкозы (HG) модифицировала их ответ на стимуляцию TLR. При активации TLR4 агонистом LPS культивирование в условиях HG приводило к усилению индуцированной экспрессии TNF α , IL-6 и IL-1 β по сравнению с клетками, культивируемыми при нормальной концентрации глюкозы (NG) (Рис. 4.а-в). На уровне высвобождения белка IL-6 гипергликемия также усиливала LPS-стимулированную секрецию (Рис. 4.з).

При стимуляции TLR3 агонистом PIC характер ответа зависел от исследуемого маркера. Экспрессия TNF α и IL-6 не различалась в условиях NG и HG, тогда как экспрессия iNOS возрастала, а экспрессия IL-1 β и IL-10, напротив, снижалась при адаптации к гипергликемии (Рис. 5.а-д). Секреция белка IL-6 в ответ на PIC была выше в условиях HG по сравнению с NG (Рис. 5.е).

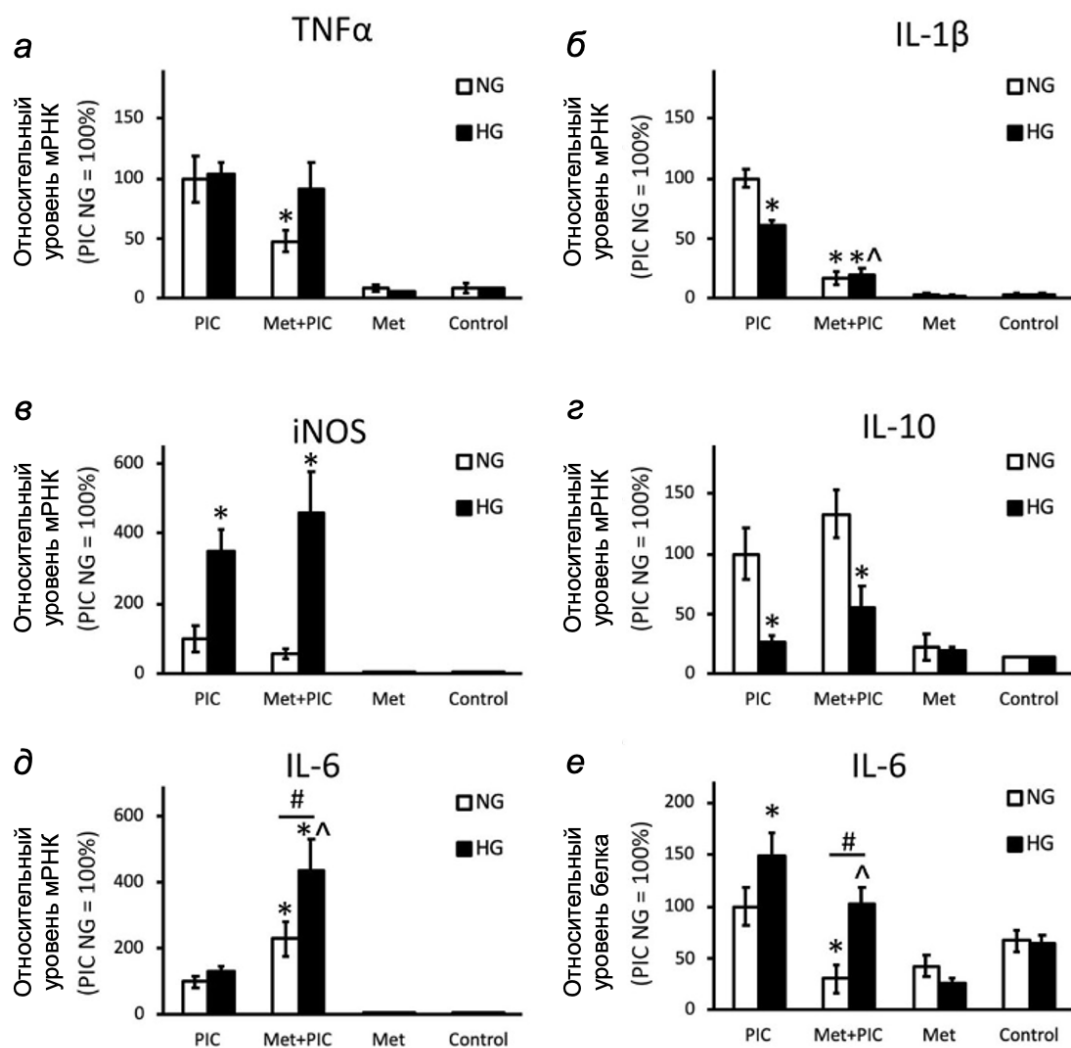


Рис. 5. Сравнение уровней маркеров воспаления, стимулированных PIC, в астроцитах, культивированных в HG и NG.

Метформин в исследованной концентрации не оказывал самостоятельного влияния на базальный уровень экспрессии исследованных маркеров. При стимуляции LPS метформин снижал экспрессию IL-1 β (Рис. 4.в) независимо от концентрации глюкозы, а также уменьшал LPS-стимулированное высвобождение белка IL-6 (Рис. 4.г). Влияния на экспрессию TNF α и IL-6 при активации TLR4 не наблюдалось (Рис. 4.а, б).

При стимуляции PIC эффекты метформина зависели от условий культивирования. В условиях NG метформин подавлял экспрессию TNF α и iNOS, а также снижал высвобождение белка IL-6 (Рис. 5.а, в, е). В условиях HG подавление под действием метформина отмечалось для экспрессии IL-1 β и IL-6, тогда как влияние на TNF α и iNOS отсутствовало (Рис. 5.а-д). Снижение уровня секреции IL-6 под действием метформина при PIC-стимуляции наблюдалось в обоих гликемических условиях (Рис. 5.е).

Влияние метформина на синтез активных форм кислорода (АФК) (Рис. 6.а-б). Метформин не оказывал влияния на TLR-стимулированный синтез АФК независимо от концентрации глюкозы, что указывает на антиоксидант-независимый механизм его противовоспалительного действия.

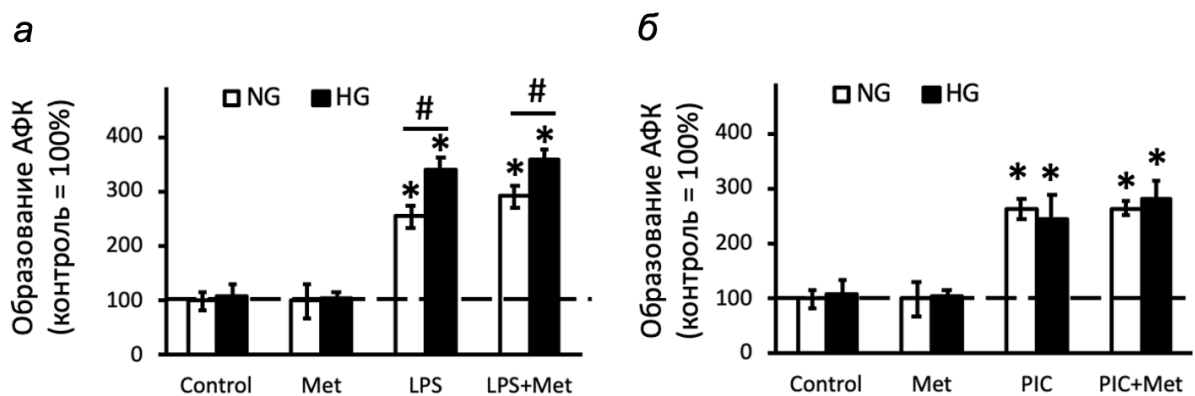


Рис. 6. Влияние метформина на продукцию АФК астроцитами, адаптированными к HG и NG при стимуляции LPS (а) и PIC (б).

Анализ влияния метформина на синтез оксипинов при TLR-стимуляции

В контексте взаимосвязи энергетических процессов клеток и их способностью отвечать на действие провоспалительных стимулов наименее изученной являлась система метаболизма оксипинов. Мы определяли профили оксипинов методом масс-спектрометрии, и для удобства обсуждений использовали следующее разделение на группы:

- 1) полиненасыщенные жирные кислоты – арахидоновая (AA), эйкозапентаеновая (EPA), докозагексаеновая (DHA);
- 2) эндоканнабиноид анандамид (AEA) и олеилэтаноламид (OEA);
- 3) циклооксигеназный (COX) путь – простагландины (PG), тромбоксан В2 (ТХВ2), 11-НЕТЕ (11-гидроксиэйкозатетраеновая кислота), производные арахидоновой кислоты (AA) и 13-НДоНЕ (13-гидроксидокозагексаеновая кислота, производное докозагексаеновой кислоты (DHA));
- 4) цитохромный (CYP) путь – дигидроксиэйкозатетраеновая кислота (17,18-DiHETE, производное эйкозапентаеновой кислоты (EPA)), дигидроксиоктадеценовые кислоты (9,10-/12,13-DiHOMEs, производные линолевой кислоты (LA)), дигидроксиэйкозатриеновые кислоты (8,9-/11,12-DHETs, производные AA), (18-HEPE, производное EPA), гидроксиэйкозатетраеновые кислоты (16-/18-HETEs, производные AA), гидроксидокозагексановая кислота (20-НДоНЕ, производное DHA);
- 5) липоксигеназный (LOX) путь – гидроксидокозагексаеновые кислоты (4-/8-/11-/16-/17-НДоНЕs, производные DHA), гидроксиэйкозатриеновая кислота (15-HETrE, производное дигомо- γ -линоленовой кислоты), 5-/8-/12-/15-НЕТЕ (производные AA), гидроксидокозагексадиеновые кислоты (9-/13-НODE, производные LA).

Анализ 24 оксипинов и полиненасыщенных жирных кислот в исследованиях влияния метформина на LPS-стимулированный синтез оксипинов (Рис. 7.а) выявил следующие закономерности. Культивация в условиях гипергликемии (HG) снижала базальные уровни арахидоновой (AA) и эйкозапентаеновой (EPA) кислот. В условиях нормогликемии (NG) метформин стимулировал высвобождение всех исследованных полиненасыщенных жирных кислот независимо от LPS-стимуляции, тогда как в условиях HG этот эффект отсутствовал. Для оксипинов COX-пути метформин снижал LPS-стимулированный синтез независимо от концентрации глюкозы, что проявлялось в уменьшении уровней PGE₂, ТХВ₂ и 6-кето-PGF_{1 α} . Для LOX-производных DHA метформин повышал синтез 8-НДоНЕ и 4-НДоНЕ, однако этот эффект наблюдался только в условиях нормогликемии.

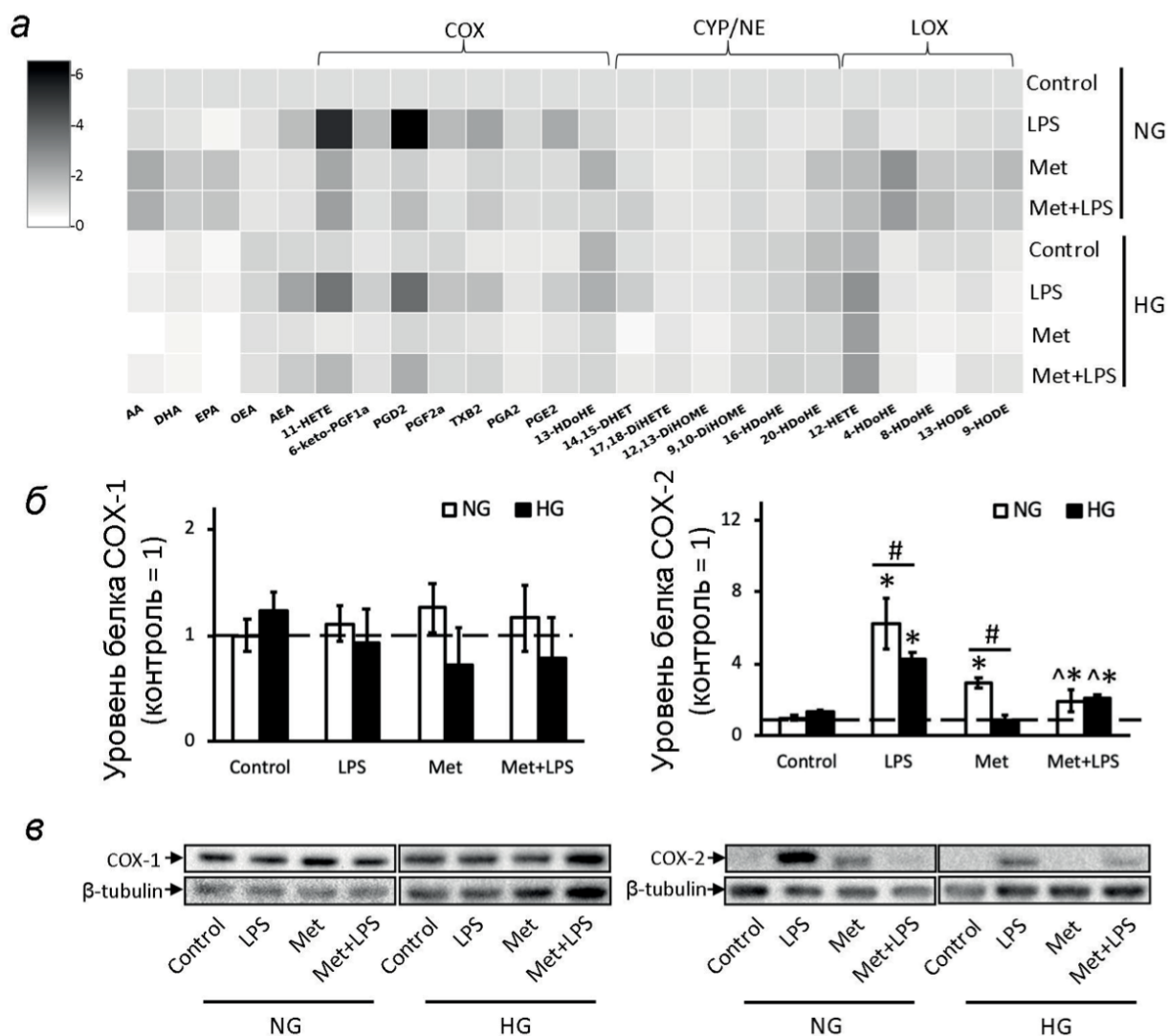


Рис. 7. Влияние метформина (Met) на высвобождение оксипинов и полиненасыщенных жирных кислот в астроцитах, стимулированных LPS, и экспрессию ферментов COX-1 и COX-2.

При активации TLR3 эффекты метформина существенно зависели от концентрации глюкозы (Рис. 8.а). В условиях нормогликемии метформин не подавлял, а в ряде случаев усиливал синтез некоторых COX-метаболитов, а также стимулировал синтез 4-HDoHE. В условиях гипергликемии, напротив, метформин проявлял классическое противовоспалительное действие, снижая синтез COX-производных, в частности PGD₂ и TXB₂.

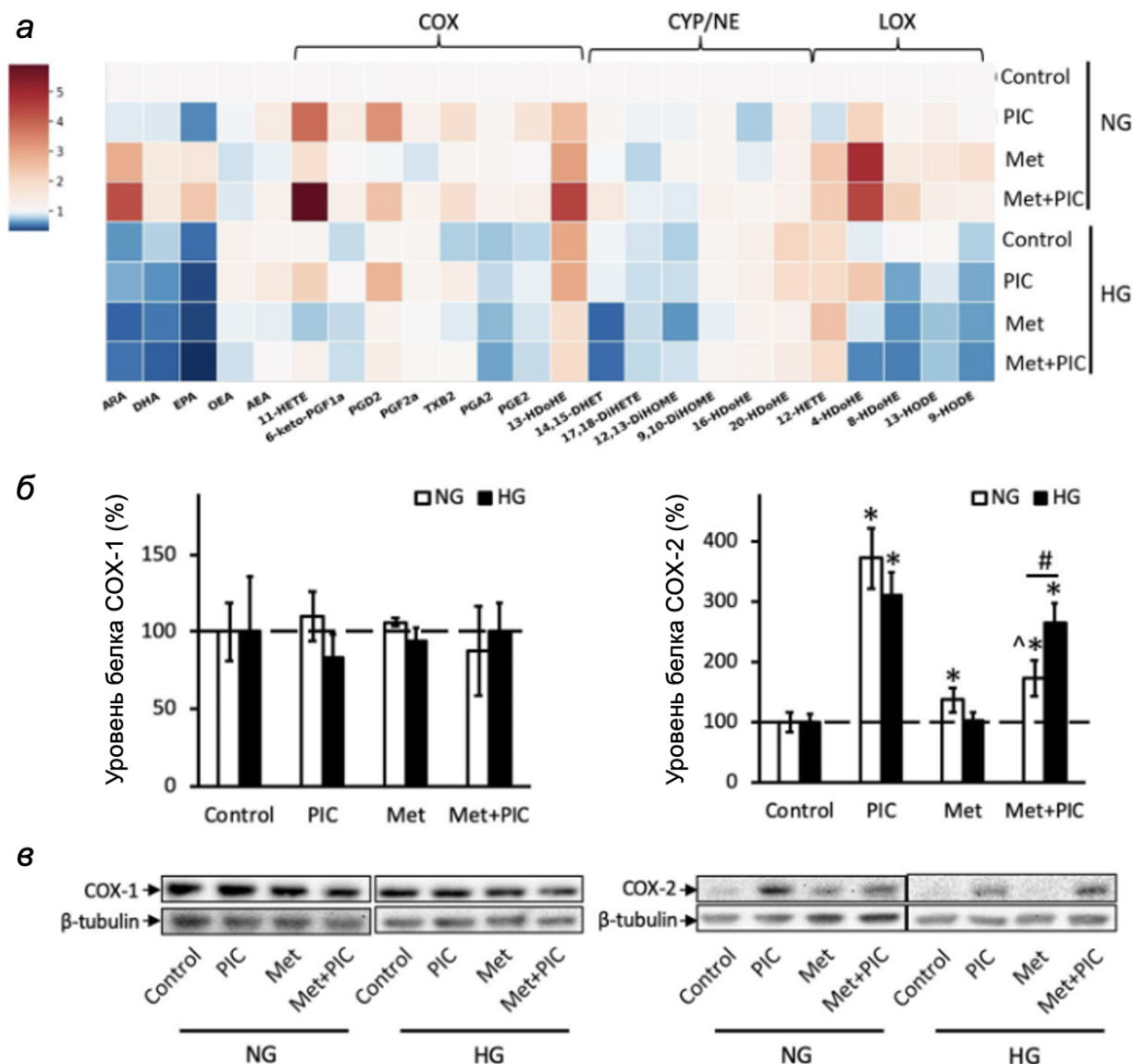


Рис. 8. Влияние PIC-стимуляции и лечения метформином на высвобождение оксипинов и экспрессию циклооксигеназ в астроцитах, культивированных в HG и NG.

Метформин снижал LPS-индуцированную экспрессию COX-2 независимо от концентрации глюкозы (Рис. 7.б, в). При PIC-стимуляции этот эффект наблюдался только в условиях нормогликемии (Рис. 8.б, в).

Молекулярные механизмы действия метформина

Для характеристики внутриклеточных сигнальных путей, которые могут быть задействованы в реализации взаимосвязи энергетического метаболизма и воспаления, в тех же условиях, что и все серии экспериментов проводили выделение белка и определяли активность элементов внутриклеточного сигналинга.

Анализ активности ключевых сигнальных белков при LPS-стимуляции показал (Рис. 9.а-б), что метформин снижает LPS-стимулированную активность ERK1/2 независимо от концентрации глюкозы, а также снижает активность STAT3 независимо от присутствия LPS. В условиях гипергликемии метформин более выраженно ингибировал активность ERK даже без стимуляции LPS, что может указывать на роль ERK в регуляции гомеостаза глюкозы в астроцитах.

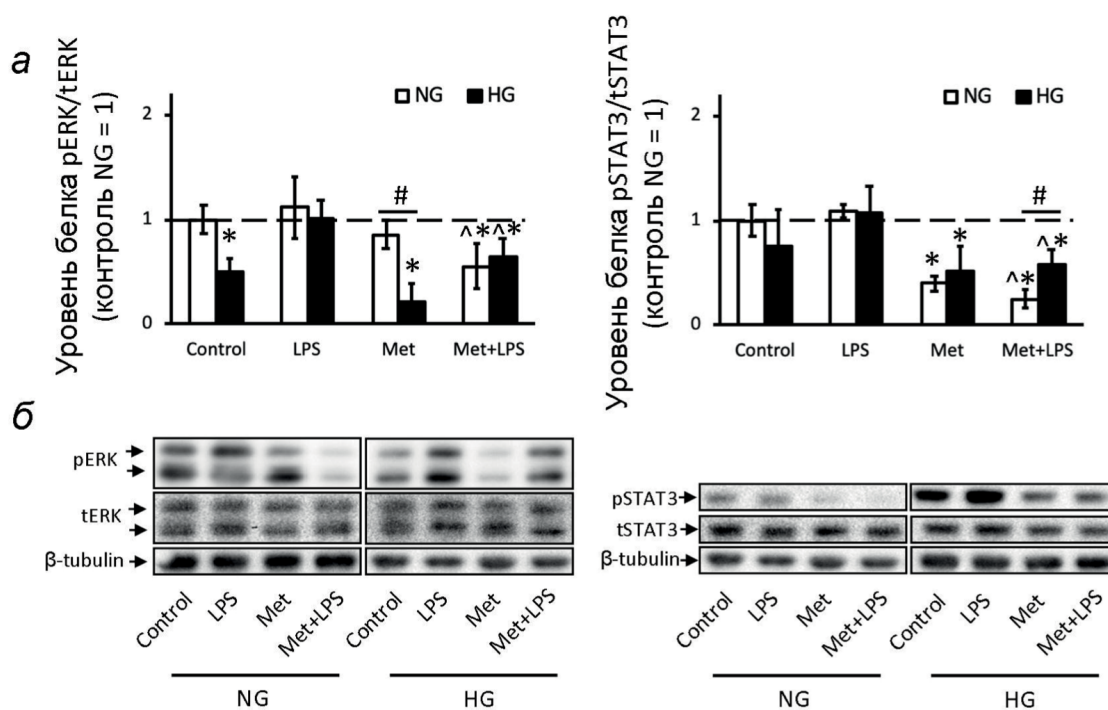


Рис. 9. Влияние глюкозы на активность MAPK, ERK1/2 и транскрипционного фактора STAT3 в астроцитах, предобработанных метформином и стимулированных LPS.

При активации TLR3 (Рис. 10.а-в) PIC стимулировал активность p38 независимо от концентрации глюкозы, но не влиял на активность ERK1/2 и STAT3. Метформин сам по себе повышал активность p38 в условиях нормогликемии, снижал активность STAT3 независимо от концентрации глюкозы, а также снижал активность ERK1/2. При совместном действии метформина и PIC наблюдалось значительное увеличение активности p38 и ERK1/2, тогда как активность STAT3 оставалась сниженной.

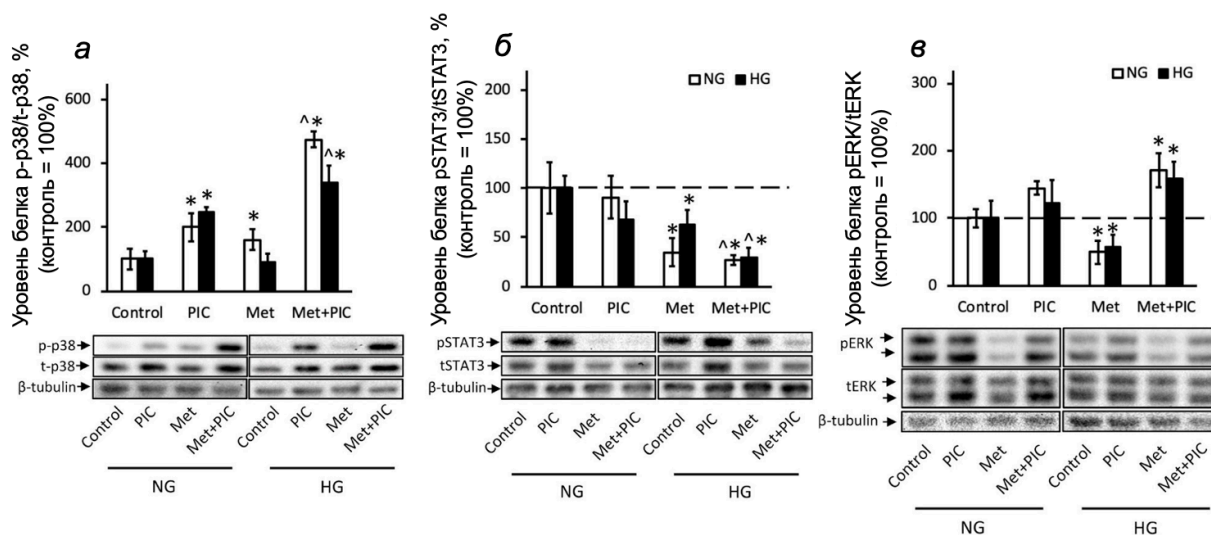


Рис. 10. Влияние глюкозы на активность p38, ERK1/2 MAPK и транскрипционного фактора STAT3 в астроцитах, предобработанных метформином и стимулированных PIC.

Оценка роли АТФ как провоспалительного стимула.

АТФ не только синтезируется и потребляется в энергетическом метаболизме клетки, но и служит сигналом для других клеток, который передается через пуринергические рецепторы. Известно, что их активация играет важную роль в жизнедеятельности астроцитов. Поэтому мы охарактеризовали влияние АТФ на воспалительные ответы клеток, цитокины и оксипирины. Сравнивали клеточные модели гипергликемии и культивируемые при нормальной концентрации глюкозы.

Оказалось, что АТФ не является классическим провоспалительным стимулом для астроцитов. Кратковременная (15 мин) и среднесрочная (4 ч) стимуляция АТФ приводила к увеличению синтеза СОХ-производных: PGD₂, TXB₂, 12-ННТ и 11-НЕТЕ, причем в условиях гипергликемии ответ был менее выраженным, чем при нормогликемии. Одновременно наблюдалось снижение уровня СУР-производного 18-НЕРЕ (Рис. 11.а-в). При анализе взаимодействия метформина с АТФ выявлены синергетические эффекты: в условиях нормогликемии совместное действие метформина и АТФ приводило к значительному увеличению уровней 11-НЕТЕ, PGD₂, 12-ННТ, 15-НЕТЕ, 13-НДоНЕ и 15-НЕТге по сравнению с суммой независимых эффектов каждого из стимулов. В условиях гипергликемии такие синергетические эффекты отсутствовали, а для некоторых оксипиринов (например, 12-ННТ) наблюдалось даже снижение концентрации при совместной обработке.

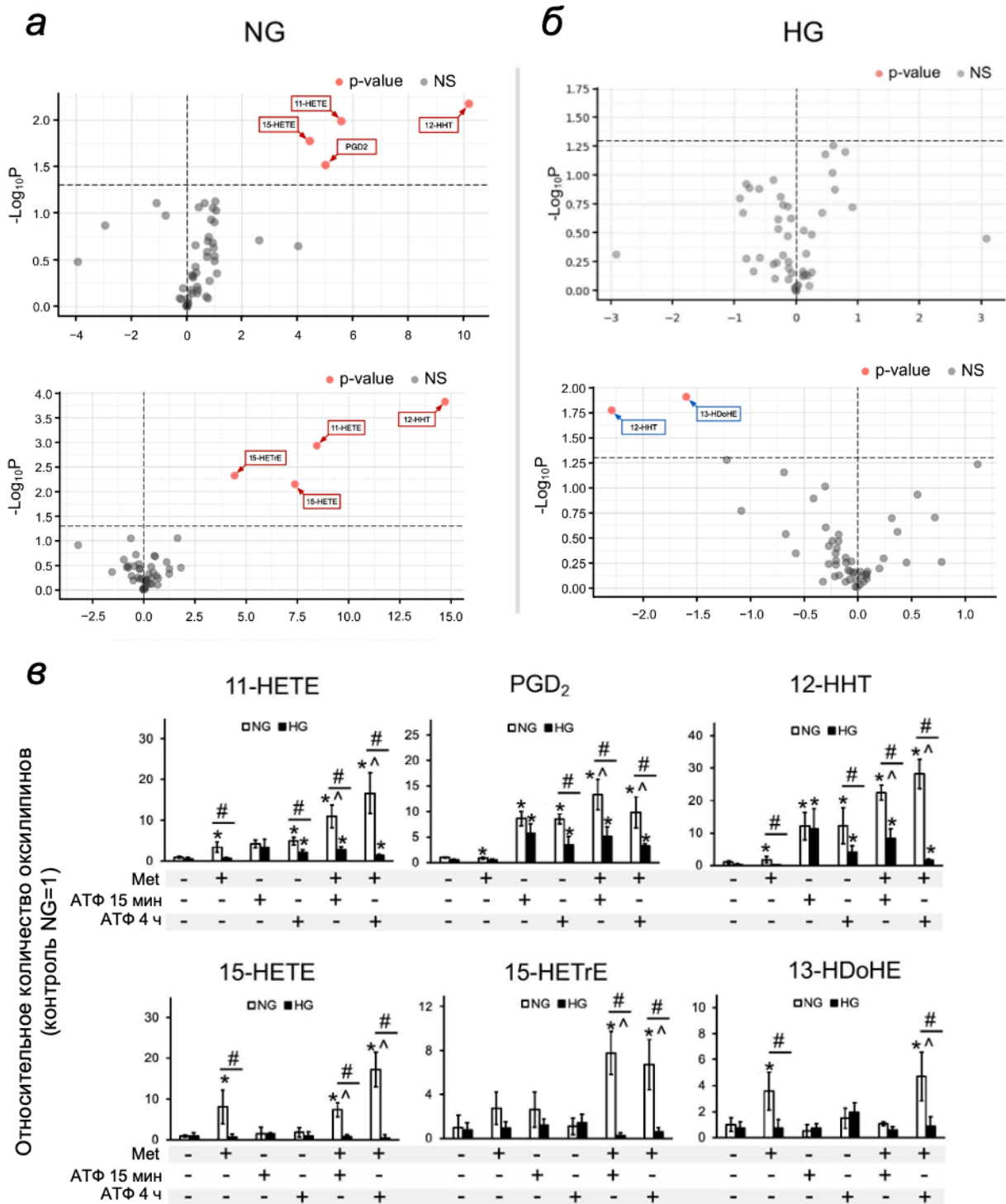


Рисунок 11. Влияние метформина (Met) на секрецию оксипинов и ПНЖК из астроцитов, стимулированную АТФ.

Стимуляция АТФ не вызывала увеличения экспрессии провоспалительных маркеров (COX-2, iNOS, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10) (Рис. 12.a-e). Более того, совместная стимуляция АТФ и метформина в условиях нормогликемии приводила к увеличению экспрессии как провоспалительных (TNF α , IL-6), так и противовоспалительного (IL-10)

маркеров, что указывает на модулирующую, а не классическую провоспалительную роль АТФ в астроцитах. В условиях гипергликемии эти эффекты отсутствовали.

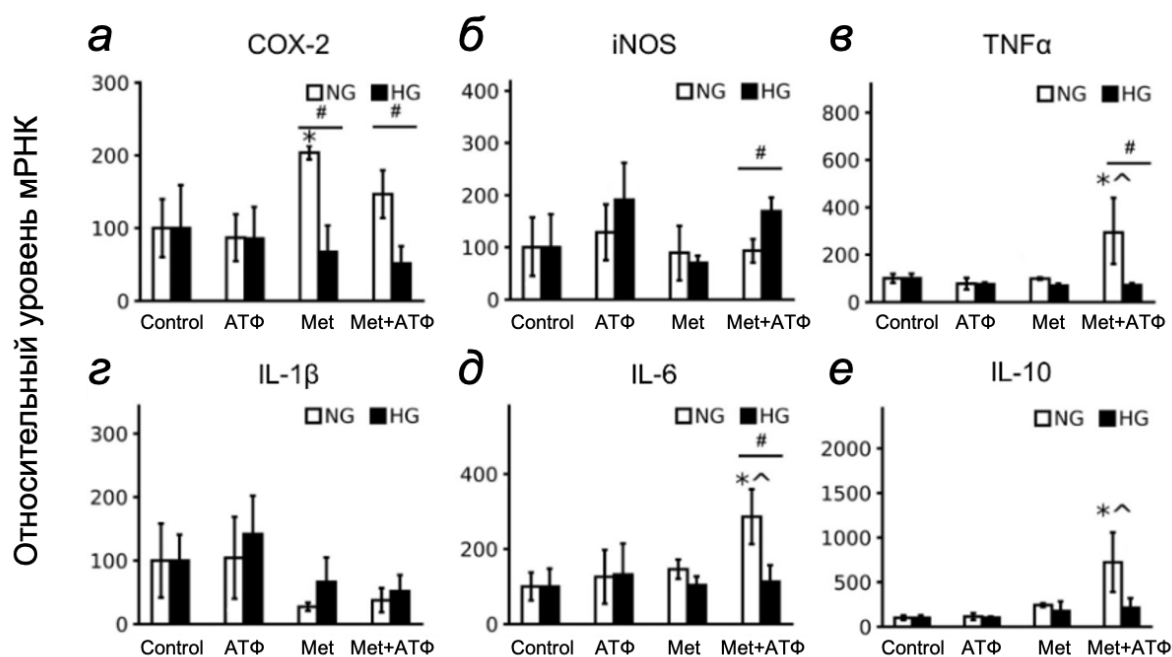


Рис. 12. Высокий уровень глюкозы не влияет на чувствительность астроцитов к АТФ, но выявляет эффекты метформина на синтез цитокинов.

Молекулярные механизмы действия АТФ (Рис. 13.а-е) включали активацию фосфорилирования ERK1/2 независимо от концентрации глюкозы, а также фосфорилирование p38, причем этот эффект снижался в HG. Активность цитозольной фосфолипазы A2 (сPLA2) повышалась под действием АТФ только в NG, что согласуется с более выраженным синтезом оксипинонов в этих условиях. Метформин самостоятельно снижал базальную и АТФ-стимулированную активность ERK1/2 в NG, а также повышал уровень фосфорилирования p38. Уровни фосфорилирования NF-κB не изменялись ни при стимуляции АТФ, ни при обработке метформином, тогда как активность STAT3 снижалась под действием метформина только в NG, независимо от наличия АТФ. Полученные данные свидетельствуют о том, что АТФ, в отличие от классических провоспалительных стимулов, активирует преимущественно киназные каскады и метаболизм арахидоновой кислоты, не запуская экспрессию провоспалительных генов, а его совместное действие с метформином создает условия для модуляции воспалительного ответа.

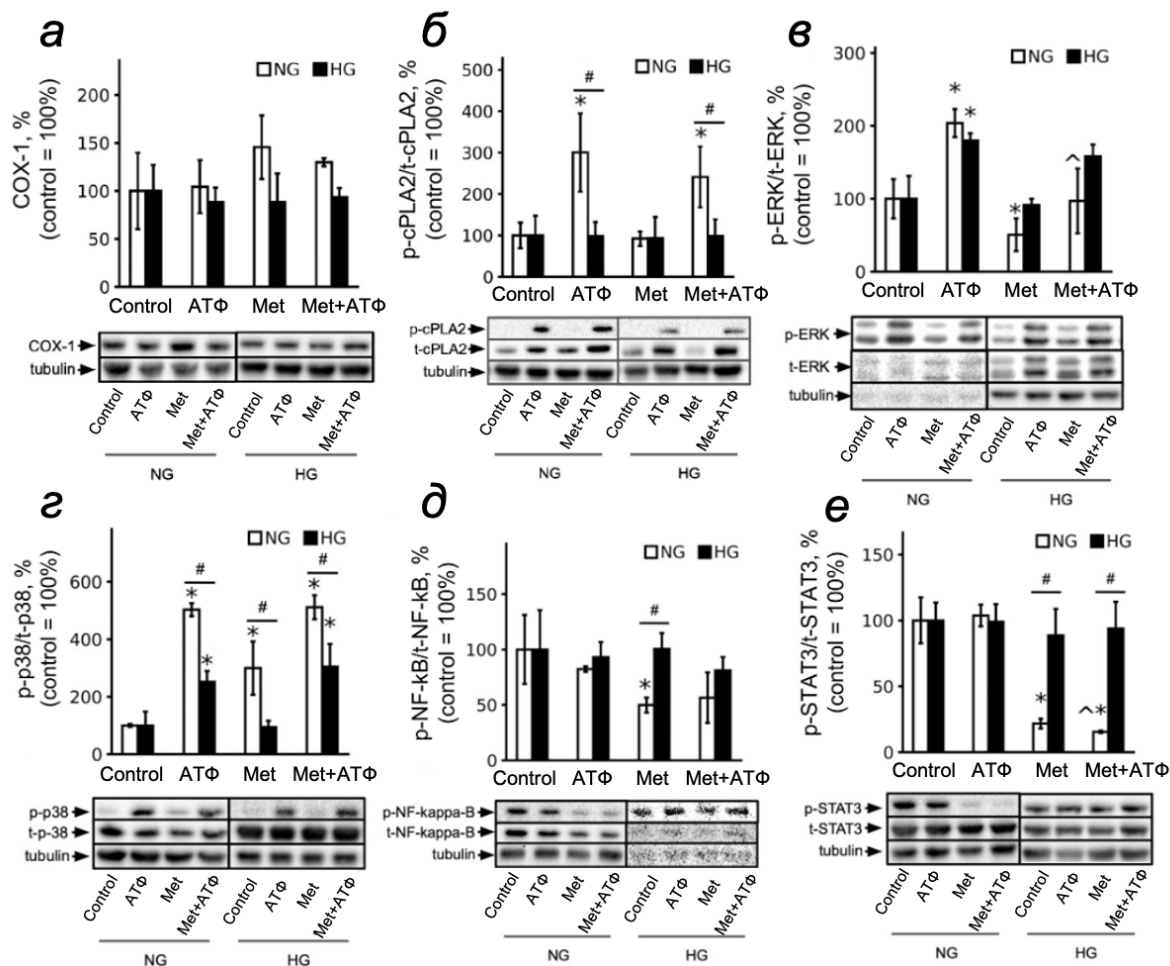


Рисунок 13. Сравнение активности COX-1, cPLA2, ERK1/2 и p38 MAPK, NF-κB и STAT3 в астроцитах, стимулированных АТФ и обработанных метформином.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе реализован комплексный подход, объединяющий оценку энергетического метаболизма (гликолиз и митохондриальное дыхание на анализаторе Seahorse XFp), внутриклеточной сигнализации и широкого спектра эффекторных молекул, включая цитокины и оксипирины. Ключевым результатом стало установление того, что длительная адаптация астроцитов к гипергликемическим условиям (22,5 мМ глюкозы) формирует метаболический фенотип, принципиально отличающийся от нормогликемического, который предопределяет характер ответа на активацию TLR3 и TLR4. Показано, что гипергликемия усиливает TLR4-опосредованную экспрессию провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-6) и продукцию COX-зависимых оксипиринов, тогда как при TLR3-стимуляции изменения в большей степени затрагивают LOX-зависимые пути и метаболиты докозагексаеновой кислоты. Дополнительно установлено, что внеклеточный АТФ активирует в астроцитах сигнальные

каскады MAPK и STAT3, причем характер этого пуринергического ответа также зависит от уровня глюкозы, что указывает на перекрестные взаимодействия между метаболическим статусом клетки, TLR- и пуринергической сигнализацией.

В части изучения фармакологической модуляции проведено детальное исследование эффектов метформина: продемонстрировано, что его действие зависит как от условий гликемии, так и от типа TLR-стимуляции. Впервые с использованием метода UPLC-MS/MS охарактеризовано влияние метформина на профиль оксипинов астроцитов – показано, что при TLR4-активации он преимущественно модулирует COX-зависимые метаболиты, а при TLR3-стимуляции – LOX-опосредованные пути. Выявлено, что противовоспалительное действие метформина реализуется не только через регуляцию энергетического обмена, но и через подавление фосфорилирования ERK1/2 и STAT3, причем выраженность этих эффектов выше в условиях гипергликемии, моделирующих диабетическое микроокружение. Совокупность полученных данных расширяет представления о роли астроцитов в нейровоспалении при метаболических нарушениях и обосновывает возможность рассматривать метформин как комплексный модулятор глиального воспаления за пределами его классических антигипергликемических эффектов. Полученная клеточная модель гипергликемии на первичных астроцитах представляет потенциальную биоинженерную платформу для рационального проектирования условий культивирования и фармакологической модуляции в клеточных нейроглиальных системах.

Основные результаты и выводы

1. Адаптация астроцитов к гипергликемии приводит к метаболическому перепрограммированию, снижает базальный гликолиз и повышает дыхательную емкость митохондрий. Острая TLR4- и TLR3-стимуляция не вызывает значительной перестройки энергетического метаболизма, что важно учитывать при биоинженерном конструировании клеточных моделей нейровоспаления.
2. Внеклеточный АТФ не является прямым провоспалительным стимулом: он не активирует цитокины и NF-κB, но модулирует профиль оксипинов через COX-путь. Гипергликемия снижает чувствительность к АТФ-индуцированному синтезу оксипинов и подавляет сигналы cPLA₂/p38 MAPK.

3. Метформин индуцируя сдвиг энергетического метаболизма в сторону гликолиза независимо от концентрации глюкозы в среде и проявляет противовоспалительные свойства: снижает TLR4-опосредованную экспрессию IL-1 β и IL-6 независимо от глюкозы. При TLR3-активации его противовоспалительные эффекты (на TNF α и IL-6) зависят от гликемического статуса.
4. Метформин оказывает многоуровневое противовоспалительное действие: снижает активацию NF- κ B/STAT3/ERK-каскадов, регулирует продукцию цитокинов, при этом выраженность его эффектов зависит от гликемического статуса клеток и типа стимула (TLR4, TLR3, АТФ).
5. Метформин контекст-зависимо модулирует профили оксипинов. При TLR4-активации метформин подавляет синтез провоспалительных простагландинов независимо от адаптации к глюкозе, коррелируя со снижением экспрессии COX-2. При TLR3-активации ингибирующий эффект метформина на COX-зависимые оксипины проявляется преимущественно в условиях гипергликемии.
6. Клеточная модель гипергликемии на первичных астроцитах, как реализация инженерного подхода в биологии, может использоваться в качестве платформы для рационального проектирования условий культивирования и направленной фармакологической компенсации нарушенных физиологических функций нейроглии.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

1. Drozhdev A.I., **Gorbatenko V.O.**, Goriainov S.V., Chistyakov D.V., Sergeeva M.G. ATP Alters the Oxylipin Profiles in Astrocytes: Modulation by High Glucose and Metformin // Brain Sciences. — 2025. — vol. 15, №3. — P. 293. EDN: KDGOSQ. Импакт-фактор 2,2 (JIF), (1,7/0,51)¹.
2. **Gorbatenko V.O.**, Goriainov S.V., Babenko V.A., Plotnikov E.Y., Chistyakov D.V., Sergeeva M.G. TLR3-mediated Astrocyte Responses in High and Normal Glucose Adaptation Differently Regulated by Metformin // Cell Biochemistry and

¹ В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах

Biophysics. — 2024. — vol. 82, №3. — pp. 2701-2715. EDN: GTWFKА. Импакт-фактор 2,5 (JIF) (1,7/0,82)¹.

3. **Gorbatenko V.O.**, Goriainov S.V., Babenko V.A., Plotnikov E.Y., Sergeeva M.G., Chistyakov D.V. Anti-Inflammatory Properties of Metformin During Cultivation of Primary Rat Astrocytes in a Medium with High Glucose Concentration // Biochemistry (Moscow). — 2022. — vol. 87, №7. — pp. 577-589. EDN: CYWQSU. Импакт-фактор 2,2 (JIF). (1,8/0,9)¹.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

TLR – Толл-подобный рецептор

LPS – липополисахарид

PIС – poly(I:C), полиинозиновая-полицитидиловая кислота

АТФ – аденозинтрифосфат

Met – метформин

NG – нормогликемия

HG – гипергликемия

TNF α – фактор некроза опухоли альфа

IL – интерлейкин

AA – арахидоновая кислота

DHA – докозагексаеновая кислота

EPA – эйкозапентаеновая кислота

НЕТЕ – гидроксикокозатетраеновые кислоты,

НДоНЕ – гидроксидокозагексаеновые кислоты

СОХ – циклооксигеназа

LOX – липоксигеназа

СУР – цитохром Р450

sPLA2 – цитозольная фосфолипаза А2

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

АФК – активные формы кислорода

OCR – скорость потребления кислорода

ECAR – скорость внеклеточного закисления

СССР – карбонилцианид м-хлорфенилгидразон

АМПК – АМФ-активируемая протеинкиназа