

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ

На правах рукописи

Горбатенко Владислав Олегович

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

1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
д.х.н. Сергеева Марина Глебовна
д.б.н. Чистяков Дмитрий Викторович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Концепция взаимосвязи врожденного иммунитета и метаболизма	11
1.1.1. Основные принципы врожденного иммунитета и воспалительных процессов	11
1.1.2. Воспаление как проявление врожденного иммунитета	12
1.1.3. Сигнальные пути воспалительных реакций на клеточном уровне	15
1.1.4. Оксипирины как ключевые липидные медиаторы воспаления	18
1.1.5. Взаимосвязь энергетического метаболизма и врождённого иммунитета	21
1.2. Астроциты: ключевые участники в поддержании гомеостаза и воспалительных процессах ЦНС	23
1.2.1. Астроциты в фокусе исследований 21 века	23
1.2.2. TLR экспрессия и функции в астроцитах	25
1.2.3. Энергетический метаболизм в астроцитах	27
1.3. АТФ как медиатор межклеточной коммуникации в ЦНС	30
1.4. Метформин: от сахароснижающего препарата к модулятору иммунитета и метаболизма	33
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1. Реактивы	38
2.2. Первичная культура клеток	38
2.3. Оценка цитотоксичности метформина	39
2.4. Оценка изменения экспрессии генов	40
2.5. Иммуноблоттинг для оценки внутриклеточных изменений	41
2.6. ВЭЖХ-МС/МС для детекции липидов	42
2.7. Определение цитокинов при помощи иммуноферментного анализа	43
2.8. Анализ выброса активных форм кислорода	43
2.9. Анализ энергетического метаболизма астроцитов	44
2.10. Статистический анализ экспериментальных данных	45
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	47
3.1. Характеристика изменений энергетического ответа астроцитов, культивируемых в разных концентрациях глюкозы, при стимуляции TLR4 и TLR3 рецепторов и модуляции метформинном.	47
3.1.1. Жизнеспособность культивируемых астроцитов после метформина	48
3.1.2. Изменение гликолиза и окислительного фосфорилирования астроцитов при адаптации клеток к высокой концентрации глюкозы.	49
3.1.3. Изменение энергетического метаболизма при активации TLR бактериальной (LPS) и вирусной (PIC) природы у астроцитов, культивируемых при нормальной и высокой глюкозе.	51
3.1.4. Анализ влияния метформина на энергетический метаболизм астроцитов, культивируемых при различной концентрации глюкозы при стимуляции TLR3 и TLR4 рецепторов.	52
3.1.4.1. Влияние метформина на ECAR в LPS-стимулированных астроцитах	53
3.1.4.2. Влияние метформина на OCR в LPS- стимулированных астроцитах.	55
3.1.4.3. Влияние метформина на ECAR в PIC-стимулированных астроцитах	57
3.1.4.4. Влияние метформина на OCR в PIC- стимулированных астроцитах	59
3.2. Характеристика ответа астроцитов на стимуляцию TLR4 (LPS), TLR3 (PIC) и метформина по уровню цитокинов и других маркеров воспаления.	63

3.2.1. Влияние метформина на LPS-стимулированный синтез цитокинов в астроцитах, культивируемых при разных концентрациях глюкозы.....	64
3.2.2. Влияние метформина на уровень маркеров воспаления, стимулированных PIC, в астроцитах, культивируемых при разных концентрациях глюкозы.	66
3.2.3. Влияние метформина на TLR-стимулированное образование АФК.....	69
3.3. Изменение синтеза оксипинов при воспалительном ответе клеток при стимуляции TLR4 (LPS) и TLR3 (PIC).....	70
3.3.1. Зависимость синтеза оксипинов от обработки метформином в астроцитах, стимулированных LPS.	72
3.3.2. Влияние стимуляции PIC на профили оксипинов в астроцитах, адаптированных к высоким или нормальным концентрациям глюкозы.	76
3.4. Выявление возможных различий во внутриклеточных молекулярных механизмах при стимулах LPS и PIC при разных адаптациях и модуляция метформином.....	79
3.4.1. Внутриклеточные молекулярные механизмы, участвующие в LPS-стимулированном ответе астроцитов, культивируемых при высокой концентрации глюкозы.	80
3.4.2. Внутриклеточные молекулярные механизмы, участвующие в PIC-стимулированном ответе астроцитов, культивируемых при высокой концентрации глюкозы.	82
3.5. Оценка роли АТФ как провоспалительного стимула.	85
3.5.1. Влияние стимуляции АТФ на профили оксипинов в астроцитах, адаптированных к высоким или нормальным концентрациям глюкозы.	85
3.5.2. Влияние метформина на стимулированный АТФ синтез оксипина в астроцитах, культивируемых при различных концентрациях глюкозы.	87
3.5.3. Изменения уровней воспалительных маркеров в АТФ-стимулированных астроцитах, культивируемых при высокой концентрации глюкозы.	90
3.5.4. Внутриклеточные механизмы, участвующие в АТФ-стимулированном ответе астроцитов при адаптации к высокому уровню глюкозы и предварительной обработке метформином.	91
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	98
5. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	106
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	107

ВВЕДЕНИЕ

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 [1–3]. Нарушение этого баланса ведет к хроническому воспалению, лежащему в основе неинфекционных заболеваний [4], а в ЦНС к нейровоспалению, сопровождающему болезни Альцгеймера, Паркинсона, рассеянный склероз, эпилепсию и инсульт [5,6].

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 [7,8], они одновременно экспрессируют функциональный набор толл-подобных рецепторов, обеспечивающих дифференцированный ответ на бактериальные (TLR4) и вирусные (TLR3) стимулы [9–11]. Концепция метаболического репрограммирования глии активно развивается [12,13], 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 [14,15], а также изменяя профили оксипиринов, метаболитов полиненасыщенных жирных кислот [16]. Внедрение масс-спектрометрического профилирования оксипиринов [17,18] 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 [19,20], при этом его роль как самостоятельного стимула и влияние гипергликемии на пуринергическую сигнализацию в астроцитах остаются невыясненными [21].

Метформин, препарат первой линии терапии сахарного диабета 2-го типа, привлекает внимание как потенциальный модулятор нейровоспаления благодаря многокомпонентному действию: ингибированию комплекса I, активации AMPK, подавлению NF-κB [22–24]. Показано, что метформин ослабляет провоспалительный ответ астроцитов при гипергликемии [25] и ингибирует реактивный астроглиоз [26]. Однако комплексный анализ влияния метформина на дифференциальную активацию TLR3/TLR4 и пуринергических 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 пуринергической 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, HG) 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 оксипиринов, 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, иммуоферментный 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

оксилипинов 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.

1. Drozhdev Alexey I., **Gorbatenko Vladislav O.**, Goriainov Sergey V., Chistyakov Dmitry V., Sergeeva Marina G. ATP Alters the Oxylipin Profiles in Astrocytes: Modulation by High Glucose and Metformin // Brain Sciences. - 2025. - Vol. 15(3), P.293, doi: 10.3390/brainsci15030293. EDN: KDGOSQ. Импакт-фактор 2,2 (JIF), (1,7/0,51)¹.

2. **Gorbatenko Vladislav O.**, Goriainov Sergey V., Babenko Valentina A., Plotnikov Egor Y., Chistyakov Dmitry V., Sergeeva Marina G. TLR3-mediated Astrocyte Responses in High and Normal Glucose Adaptation Differently Regulated by Metformin // Cell Biochemistry and Biophysics. - 2024. - Vol.

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

82(3), P. 2701-2715, doi: 10.1007/s12013-024-01380-z. EDN: GTWFKА. Импакт-фактор 2,5 (JIF) (1,7/0,82)¹.

3. **Vladislav O Gorbatenko**, Sergey V Goriainov, Valentina A Babenko, Egor Y Plotnikov, Marina G Sergeeva, Dmitry V Chistyakov. Anti-Inflammatory Properties of Metformin During Cultivation of Primary Rat Astrocytes in a Medium with High Glucose Concentration // *Biochemistry (Moscow)*. - 2022. - Vol. 87(7), P.577-589, doi: 10.1134/S000629792207001X. EDN: CYWQSU. Импакт-фактор 2,2 (JIF). (1,8/0,9)¹.

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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Концепция взаимосвязи врожденного иммунитета и метаболизма.

За последние двадцать лет научные исследования существенно углубили понимание молекулярных основ работы врожденного иммунитета и воспалительных реакций, а также позволили установить тесную связь этих процессов с энергетическим метаболизмом клетки. В первой части рассмотрим общие положения современных представлений о взаимосвязи врожденного иммунитета и метаболизма.

1.1.1. Основные принципы врожденного иммунитета и воспалительных процессов

На протяжении эволюции у многоклеточных организмов сформировались комплексные механизмы поддержания внутреннего гомеостаза и защиты от чужеродных агентов. Центральную роль в этом процессе играет иммунная система, которая функционально подразделяется на две ветви: врождённый иммунитет — эволюционно древний, присущий всем многоклеточным, и адаптивный — возникший сравнительно недавно и характерный исключительно для позвоночных. Адаптивный иммунитет реализуется через В- и Т-лимфоциты, обеспечивающие распознавание и запоминание антигенов, а также элиминацию патогенов посредством опсонизации антителами и цитолиза инфицированных/поврежденных клеток. Временной разрыв между первичным контактом с антигеном и развертыванием полноценного адаптивного ответа обуславливает функциональную зависимость этой ветви от врождённого иммунитета, который служит не только первой линией защиты, но и способствует возвращению организма к исходному уровню гомеостаза.

Врожденный иммунитет обеспечивает быструю (в течение минут/часов) реакцию организма на вторжение патогена, используя клеточные (фагоциты — макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки) и гуморальные факторы (система комплемента, антимикробные пептиды, белки острой фазы) [27–29].

К основным клеткам врожденного иммунитета традиционно относят фагоциты (нейтрофилы, макрофаги), дендритные клетки, натуральные киллеры (НК-клетки), а также базофилы, эозинофилы и тучные клетки, обеспечивающие немедленный ответ [27,28,30]. Однако, изучение

молекулярных компонентов ответа позволяет практически все типы клеток организма отнести к системе врожденного иммунитета. В ЦНС, к примеру, экспрессия толл-подобных рецепторов (TLR), важных молекулярных участников врожденного иммунитета, обнаружена в различных типах клеток, включая нейроны, микроглию, астроциты и олигодендроциты [31].

Важно отметить, что врожденный иммунитет не сводится к одним лишь клеточным реакциям на стимулы бактериального или вирусного происхождения. Показано, что его молекулярные компоненты активируются не только в ответ на патогены, но и при физическом повреждении, воздействии токсических веществ, тепловом шоке и иных нарушениях гомеостаза [27,32]. Независимо от природы запускающего сигнала, ключевым следствием активации врожденного иммунитета становится развитие воспалительной реакции, а сама система врожденной защиты представляет собой сложный, многоуровневый комплекс механизмов и адаптационных процессов.

1.1.2. Воспаление как проявление врожденного иммунитета

Воспаление можно охарактеризовать как адаптивную реакцию организма, возникающую в ответ на нарушение тканевого гомеостаза, которое может быть обусловлено инфекционным процессом, механическим повреждением либо метаболическими сдвигами. В тех случаях, когда активация врожденного иммунитета происходит под действием сигналов, связанных с повреждением тканей, но без участия патогенных микроорганизмов, развивается так называемое "стерильное воспаление" [28,33].

На тканевом уровне воспаление проявляется классическими симптомами: гиперемией (повышенное кровенаполнение тканей или органов, проявляющееся покраснением), локальной гипертермией, болевым синдромом, отеком и нарушением функции. Процесс реализуется в несколько последовательных стадий: инициация, при которой поврежденные и резидентные клетки высвобождают хемоаттрактанты для рекрутирования фагоцитов; развёрнутая воспалительная реакция с активной элиминацией патогена; и, наконец, разрешение воспаления с восстановлением структуры и функции ткани.

При неэффективной элиминации раздражителя, а также под влиянием внутренних факторов, связанных с метаболическими нарушениями, воспаление приобретает хронический характер. Хроническое воспаление

представляет собой затяжной иммунный процесс, при котором система врожденного иммунитета не способна обеспечить полноценное восстановление гомеостаза. Вследствие длительной и неспецифической цитотоксической активности такого ответа организму причиняется существенный ущерб [4]. По данным Всемирной организации здравоохранения, неинфекционные заболевания (НИЗ) стали причиной не менее 43 миллионов смертей в 2021 году, что составляет около 75% от всех непандемических летальных исходов в мире. Эти цифры подчеркивают масштаб проблемы хронического воспаления и его фундаментальное значение для современной медицины.

Управление воспалением реализуется через сложную систему индукторов и медиаторов, запускающих специфические сигнальные каскады в зависимости от типа повреждающего агента. В настоящее время используются понятия "воспалительные сигнальные пути" и "сигнальные пути врожденного иммунитета" [34].

Воспалительные процессы сопутствуют не только инфекционным патологиям, но и возникают при инсультах, термических поражениях, метаболических нарушениях, а также под влиянием различных стрессорных факторов. В современной науке сформировалось представление о том, что воспалительный ответ играет важную системную роль, выполняя защитные функции, необходимые для сохранения гомеостаза [35]. Значительное число исследовательских работ сегодня сосредоточено на изучении патологий, в основе которых лежит хроническое воспаление. За последние пять лет достигнут существенный прогресс в расшифровке молекулярных механизмов, регулирующих воспалительные процессы (см., например, обзор [36]), что привело, в частности, к пересмотру представлений о функциях сигнальных липидов (подробнее про оксипирины в п.1.1.4) и углублению понимания того, как низкомолекулярные соединения, выступающие в роли ингибиторов или активаторов, способны модулировать внутриклеточные сигнальные каскады.

Как уже упоминалось, парадигма понимания воспалительного процесса претерпела существенную трансформацию за последние годы. Ранее считалось, что разрешение воспаления представляет собой пассивное затухание провоспалительных сигналов, однако в настоящее время убедительно доказано, что это активный, тонко регулируемый процесс, механизмы которого запускаются практически одновременно с началом

воспалительной реакции и направлены на максимально быстрое восстановление исходного гомеостатического состояния тканей [37,38].

Ключевыми участниками процессов разрешения воспаления выступают специализированные про-разрешающие липидные медиаторы, такие как резольвины, липоксины, протектины и марезины, а также циклопентеновые простагландины (например, 15d-PGJ2), противовоспалительные цитокины (IL-10, TGF β) и белки, в частности аннексин A1 [37,38]. Отличительной особенностью этих молекул является то, что они не просто блокируют провоспалительные сигналы, а иницируют каскады реакций, снижающие экспрессию провоспалительных факторов и стимулирующие репаративные процессы в поврежденных тканях. Нарушение баланса между провоспалительными и противовоспалительными механизмами ведет к формированию хронического воспаления, которое играет важную роль в патогенезе многих заболеваний.

Важно отметить, что традиционное разделение медиаторов на строго «провоспалительные» и «противовоспалительные» является достаточно условным и не в полной мере отражает их реальные функции. Исследования показали, что элиминация таких классических провоспалительных факторов, как TNF α , IL-1 β или фермент COX-2, из воспалительного ответа может неожиданно приводить к усилению воспаления и нарушению процессов репарации тканей [34,39,40]. Это свидетельствует о том, что молекулярные медиаторы иммунного ответа способны проявлять как провоспалительные, так и противовоспалительные свойства в зависимости от конкретной стадии процесса и молекулярного окружения, то есть обладают функциональной двойственностью [34,39,40].

Из всего вышесказанного следует, что активация врожденного иммунитета на клеточном уровне представляет собой сложную сеть взаимосвязанных реакций, неотъемлемой составляющей которых является метаболизм оксипинов. В связи с этим анализ профилей оксипинов необходимо проводить в контексте их комплексного взаимодействия с динамикой цитокинов, активностью киназ и другими внутриклеточными регуляторными маркерами.

Центральная нервная система (ЦНС) традиционно считается иммунопривилегированным органом благодаря наличию гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), отделяющего мозговую ткань от системного кровотока и циркулирующих иммунных клеток. Тем не менее

ЦНС располагает собственными механизмами врождённого иммунного ответа. Воспалительные реакции, протекающие в головном и спинном мозге, обозначаются термином «нейровоспаление».

Хроническое нейровоспаление является характерной чертой большинства нейродегенеративных заболеваний, значительно отягощающей их течение и ускоряющей нейрональную гибель. Доказана значимая роль воспалительного компонента при болезни Альцгеймера, Паркинсона, рассеянном склерозе, хорее Гентингтона, эпилепсии и инсульте [5,6]. Отметим, что нейровоспаление при нейродегенеративных заболеваниях носит компартментализированный характер: по мере прогрессирования патологии воспалительный процесс всё более сосредоточивается внутри ЦНС, преимущественно в форме устойчивой активации глиальных клеток, в то время как вклад периферических иммунных клеток постепенно снижается. Это создает терапевтическую проблему, поскольку препараты, воздействующие на периферические иммунные механизмы, оказываются менее эффективными на поздних стадиях заболевания.

1.1.3. Сигнальные пути воспалительных реакций на клеточном уровне

Общая схема сигнальных путей воспалительных реакций на клеточном уровне представлена на Рисунке 1. Инициация воспаления в клетках млекопитающих осуществляется паттерн-распознающими рецепторами (PRR, pattern recognition receptors). Эти рецепторы активируются при взаимодействии с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP) — эволюционно консервативными молекулярными структурами, характерными для различных групп микроорганизмов, а также с молекулярными паттернами повреждения (DAMP), высвобождаемыми из разрушенных клеток (Рис. 1) [28].

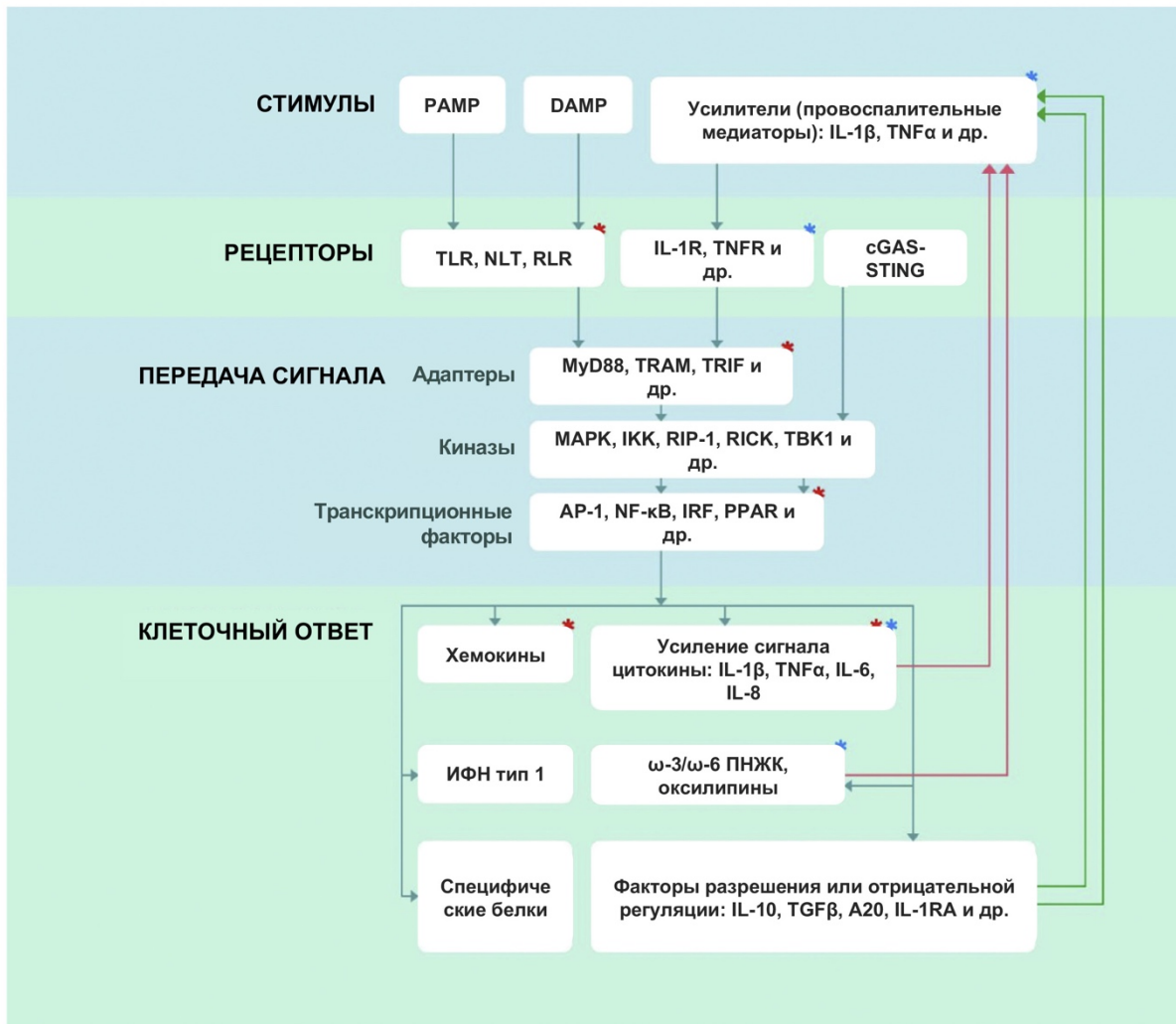


Рис. 1 Внутриклеточные сигнальные пути рецепторов распознавания образов. Связывание лигандов с паттерн-распознающими рецепторами (например, TLR или NLR) инициирует внутриклеточные сигнальные пути, ключевыми компонентами которых выступают адаптерные молекулы (MyD88, TRAM и другие), протеинкиназы (MAPK, IKK) и транскрипционные факторы (AP-1, NF- κ B). Последние, взаимодействуя с определенными регуляторными последовательностями ДНК, запускают экспрессию генов, кодирующих эффекторные молекулы — цитокины, хемокины и липидные медиаторы, обладающие как провоспалительной, так и противовоспалительной активностью (Рисунок адаптирован из обзора [41] с добавлениями).

На сегодняшний день описано несколько ключевых семейств PRR: 1) Толл-подобные рецепторы (TLR) – наиболее изученное семейство, подразделяемое на поверхностные (TLR1, -2, -4, -5, -6, -10), распознающие компоненты бактериальных стенок (например, липополисахарид – лиганд TLR4), и внутриклеточные (TLR3, -7, -8, -9), детектирующие микробные нуклеиновые кислоты [28,42]; 2) лектиновые рецепторы С-типа (CLR) – трансмембранные белки с лектин-подобными доменами, ответственные за

идентификацию углеводных компонентов клеточной стенки грибов [34]; 3) Nod-подобные рецепторы (NLR), локализованные в цитозоле и способные распознавать как продукты микробного происхождения, так и эндогенные сигналы опасности, включая кристаллы холестерина, мочевую кислоту, а также некоторые небιологические агенты (асбест, диоксид кремния, ультрафиолетовое излучение) [34]; 4) RIG-I-подобные рецепторы (RLR), представленные РНК-хеликазами, которые специализируются на обнаружении вирусных РНК и иницировании противовирусных защитных программ; 5) система сенсоров цитозольной ДНК, ключевым элементом которой является сигнальный путь cGAS-STING [43] (Рис. 1).

Активация PRR запускает каскадную передачу сигнала через адапторные белки (MyD88, TRIF, TRAM и др.), формирующие сигнальные комплексы с участием киназ — митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), IκB-киназ (IKK) и ряда других [42]. Конечным звеном каскада является активация транскрипционных факторов — NF-κB, AP-1, IRF — которые связываются со специфическими промоторными последовательностями и индуцируют экспрессию генов провоспалительных медиаторов [42] (Рис. 1). NF-κB регулирует многочисленные аспекты врождённого и адаптивного иммунного ответа, обеспечивая транскрипцию генов цитокинов, хемокинов, участвуя в регуляции инфламмосомы и определяя выживание, активацию и дифференцировку иммунных клеток.

Результатом активации этих каскадов является выброс медиаторов воспаления: цитокинов (TNFα, IL-1β, IL-6), хемокинов и сигнальных липидов – простагландинов, лейкотриенов и других оксипинов [34] (Рис. 1). Некоторые из продуцируемых молекул формируют петли положительной обратной связи, связываясь с соответствующими рецепторами и усиливая собственную продукцию [44].

Принципиальное различие между бактериальным и вирусным стимулами проявляется в преимущественной активации различных сигнальных путей. Бактериальные компоненты, такие как LPS, активируют TLR4 и запускают как MyD88-, так и TRIF-зависимые пути в астроцитах крыс, что приводит к ранней активации NF-κB через MyD88-адаптер и отсроченной активации Jak1/Stat1 MyD88-независимым путем. Вирусная dsRNA активирует исключительно TRIF-зависимый путь через TLR3, что смещает ответ в сторону интерфероновой программы и антивирусного состояния [45–49].

Для корректного функционирования иммунного ответа необходимы механизмы, ограничивающие и завершающие воспалительные каскады. К таким механизмам относятся: белки-ингибиторы, инактивирующие адапторные комплексы; фосфатазы, обеспечивающие деактивацию киназ; регуляторные микроРНК, подавляющие трансляцию провоспалительных факторов, некоторые оксипирины, меняющие сигнализацию между клетками. Нарушения в работе этих контрольных систем лежат в основе таких жизнеугрожающих состояний, как цитокиновый шторм и сепсис.

1.1.4. Оксипирины как ключевые липидные медиаторы воспаления

Оксипирины представляют собой класс сигнальных молекул, образующихся в результате метаболизма полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Эти соединения вовлечены в регуляцию разнообразных физиологических процессов — от клеточной пролиферации и апоптоза до поддержания сосудистого тонуса и гемостаза. Кроме того, они играют важную роль в модуляции иммунных реакций и развитии воспалительного ответа, демонстрируя тем самым широкий функциональный спектр в поддержании гомеостаза организма [50]. Они синтезируются ферментативными и неферментативными путями из предшественников, ПНЖК, в первую очередь арахидоновой (АА), докозагексаеновой (DHA), эйкозапентаеновой (EPA), линолевой (LA) и альфа-линоленовой (ALA) кислот [39,50].

Биосинтез оксипиринов осуществляется тремя основными ферментативными путями. Циклооксигеназный (COX) путь включает в себя ферменты COX-1 и COX-2 для превращения АА в простагландин H₂ (PGH₂), предшественник простагландинов серии E, D, тромбоксанов (TX) и простациклинов [50]. При этом традиционно считается, что COX-1 играет определяющую роль в поддержании гомеостаза, а COX-2 это индуцируемый белок, связанный с воспалением [51].

Липоксигеназный (LOX) путь включает в себя основные ферменты 5-LOX, 12-LOX и 15-LOX [52] для образования гидроксикокозатетраеновых кислот (HETE), лейкотриенов (LT) и липоксинов (LX) и других физиологически активных соединений [50,52]. Ферменты семейства LOX обладает позиционной специфичностью, например при взаимодействии с арахидоновой кислотой 5-LOX генерирует 5-HETE и лейкотриены, 12-LOX – 12-HETE, а 15-LOX – 15-HETE и липоксины [50,52]. Этот путь жизненно

важен для нейровоспаления в ЦНС и является мишенью для неврологических заболеваний [53].

Цитохром P450 (CYP) путь включает в себя разнообразные ферменты семейства цитохромов, активность которых с арахидоновой кислотой приводит к образованию эпоксиэйкозатриеновых (EET) и дигидроксиэйкозатриеновых кислот (DiHETE), однако ферменты этого семейства способны взаимодействовать и с другими ПНЖК, образуя физиологически активные соединения [50]. Важно отметить, что растворимая эпоксидгидролаза (sEH) превращает эпоксиды в диолы, снижая их активность [54,55]. Оксипирины, образующиеся при участии цитохрома P450, ограничивают накопление воспалительных моноцитов и способствуют репарации [55].

AA является основным предшественником n-6 ПНЖК, продуцируя как провоспалительные, так и противовоспалительные медиаторы (Рис. 2). COX-путь продуцирует провоспалительные простагландины 2-й серии (PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}) и TXB₂ [39,50]. LOX-путь превращает AA в провоспалительные лейкотриены (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) и противовоспалительные липоксины (LXA₄, LXB₄) [56,57]. Метаболиты цитохрома P450 включают провоспалительные HETE и противовоспалительные EET [50,58]. ДНА является основной n-3 ПНЖК в мозге, в большом количестве представленной в синаптических мембранах [59]. Она стимулирует образование специализированных про-разрешающих медиаторов (SPM): резольвинов D-серии (RvD1-RvD6), протектинов (PD1/NPD1) и марезинов (MaR1, MaR2) [56,57], которые играют ключевую роль в разрешении и заживлении воспаления [56,57,60].

Известно, что метаболические нарушения изменяют биосинтез оксипиринов, вызывая хроническое воспаление [61,62]. Например, сахарный диабет 2 типа характеризуется повышением уровня провоспалительных оксипиринов: PGE₂, PGF_{2α}, TXB₂, HETEs [63,64]. Ожирение повышает уровень провоспалительных омега-6 оксипиринов (15-HeTrE, 5-HETE, 14,15-EpETrE) и окислительных маркеров [65], снижая уровень протектина D1, 17-HDNA и 14-HDNA в жировой ткани [66]. При этом вмешательства по снижению веса оказывают комплексное воздействие, бариатрическая хирургия снижает уровень жирных кислот, но увеличивает уровень провоспалительных простагландинов (TXB₂, PGE₂) через год [67].

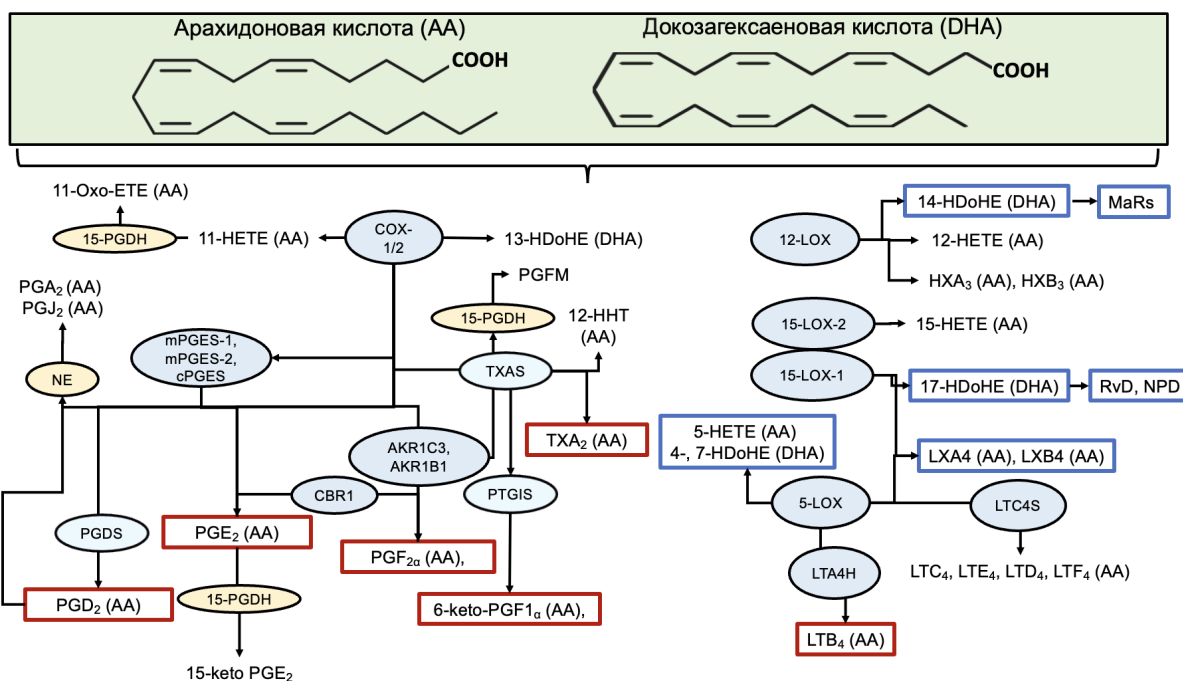


Рис. 2. Оксипирины, производные арахидоновой и докозагексаеновой кислоты. COX – циклооксигеназа; NE – неферментативный путь; LOX – липоксигеназа; HETE – гидрокси-эйкозатетраеновая кислота; HDoHE – гидрокси-докозагексаеновая кислота; HHT – гидроксигептадекатриеновая кислота; PG – простагландин; HX – гепоксилин; LT – лейкотриен; LX – липоксин; охо-ETE – оксо-эйкозатетраеновая кислота; PGFM – метаболит простагландина F; TX – тромбоксан.

Следует подчеркнуть, что в ответ на внешний сигнал в клетке инициируется продукция сложного спектра оксипиринов. Каждое из образующихся соединений выполняет уникальные регуляторные функции, что достигается за счет их избирательного связывания с определенными мембранными или цитоплазматическими белками-мишенями. [68,69]. Отсутствие методов, позволяющих одновременно измерять множество оксипиринов, долгое время давало только знания об отдельных подтипах оксипиринов, что не позволяло анализировать всю систему метаболизма ПНЖК.

Внедрение масс-спектрометрических подходов в последние годы сделало возможным параллельное количественное определение множества оксипиринов, что существенно упрощает оценку их профиля в исследуемом образце [17,18]. Подобные методы позволяют исследовать оксипирины в рамках патологических состояний и создают предпосылки для их применения в качестве перспективных биомаркеров при целом ряде заболеваний, в том числе при различных поражениях головного мозга [18,70–72].

Появление методов количественного измерения профилей оксипиринов расширило понимание роли этих соединений в регуляции воспалительных процессов в ЦНС. Основными источниками оксипиринов в ЦНС являются микроглия и астроциты [73,74]. Они обладают полным набором ферментативных механизмов (COX, LOX, CYP) для синтеза оксипиринов [75–77]. Метаболическая координация между нейронами и астроцитами имеет решающее значение для поддержания гомеостаза ЦНС.

Интерес к изучению метаболизма оксипиринов на системном уровне определяется и тем, что уже разработано большое количество низкомолекулярных веществ - ингибиторов ферментов и агонистов рецепторов, применение которых имеет доказанную терапевтическую эффективность. Среди них неселективные ингибиторы COX-1/COX-2 (аспирин, индометацин, диклофенак, ибупрофен, ортофен), селективные ингибиторы COX-2 (эторикокиб, целекоксиб), ингибитор 5-LOX (зилеутон) и другие соединения, уже используемые или находящиеся на разных стадиях *in vitro* и клинических исследований.

Изучение изменений профилей оксипиринов при различном перепрограммировании клеток дает возможность оценивать влияние модуляции сопряженных путей внутриклеточного метаболизма. Например, показано, что агонист ядерного рецептора PPARbeta GW501516 не только ингибирует синтез простагландинов, но и индуцирует образование противовоспалительных веществ из докозагексаеновой кислоты [78].

1.1.5. Взаимосвязь энергетического метаболизма и врождённого иммунитета

Исследования последнего десятилетия сформировали новую дисциплину – иммунометаболизм, изучающую двунаправленную взаимосвязь между метаболическим статусом клетки и её иммунной функцией [1,79]. Установлено, что активация клеток молекулярными паттернами (PAMP, DAMP) вызывает глубокую перестройку клеточного метаболизма, а накапливающиеся внутри- и внеклеточно метаболиты, в свою очередь, модулируют характер и силу иммунного ответа [2].

Одним из центральных феноменов иммунометаболизма является переключение клеточного энергетического обмена с окислительного фосфорилирования (OXPHOS) на аэробный гликолиз при активации провоспалительного фенотипа [79]. Данный процесс аналогичен эффекту Варбурга, описанному в опухолевых клетках Отто Варбургом в 1920-х

годах [80]. При активации TLR (например, липополисахаридом (LPS)) моноциты, макрофаги и дендритные клетки резко усиливают поглощение глюкозы и переключаются на гликолиз, что обеспечивает быструю генерацию АТФ и биосинтетических предшественников, необходимых для фагоцитоза, окислительного взрыва и продукции цитокинов [3]. Важными регуляторами этого метаболического переключения выступают транскрипционный фактор HIF-1 α (фактор, индуцируемый гипоксией) и серин-треониновая протеинкиназа mTOR, координирующие экспрессию гликолитических ферментов и провоспалительных генов [1,3]. Переход к гликолизу сопровождается накоплением специфических метаболитов цикла трикарбоновых кислот — сукцината и цитрата, которые выполняют самостоятельные сигнальные функции: сукцинат стабилизирует HIF-1 α и усиливает продукцию IL-1 β , а цитрат перенаправляется на синтез липидов, необходимых для мембранного биогенеза и продукции липидных сигнальных молекул [1,3]. Противовоспалительные и разрешающие фенотипы клеток (M2-подобные макрофаги, регуляторные Т-клетки), напротив, полагаются преимущественно на окислительное фосфорилирование и β -окисление жирных кислот, что ассоциировано с продукцией противовоспалительных медиаторов и фагоцитарной активностью [3].

В настоящее время интенсивно ведутся исследования по установлению взаимосвязей между иммунометаболизмом, в первую очередь, энергетическим, и врожденным иммунитетом. Обмен веществ напрямую влияет на способность клеток отвечать на активацию врожденного иммунитета, т.е. метаболизм не просто обеспечивает клетки энергией, но и управляет иммунным ответом, определяя как клетки будут реагировать на инфекцию или повреждение (функциональная связь). Метаболические паттерны меняются в зависимости от типа клеток. В ответ на патогены или повреждения клетки перестраиваются, т.е. происходит метаболическое перепрограммирование. Понимание того, как врожденный иммунитет сопряжен с обменом веществ помогает объяснить развитие системных воспалительных реакций, что имеет теоретическое значение. Но эти исследования имеют и терапевтический потенциал: манипуляции метаболизма позволяют переключать клетки с воспалительного на разрешающий режим, что открывают перспективы использования метаболические лекарства для коррекции и лечения заболеваний с воспалительной компонентой.

Таким образом, воспаление представляет собой фундаментальный механизм врожденного иммунитета, обеспечивающий защиту организма от повреждающих факторов и поддержание гомеостаза. Современные данные указывают на неразрывную связь между энергетическим метаболизмом клетки и характером ответа: метаболическое перепрограммирование определяет функциональное состояние крови. Нарушение баланса про- и противовоспалительных процессов, равно как и метаболическая дисрегуляция, лежат в основе хронического нейровоспаления, сопровождающего нейродегенеративные заболевания. Углубленное понимание молекулярных механизмов взаимосвязи воспаления и энергетического метаболизма открывает новые возможности для разработки таргетных терапевтических подходов, в том числе через модуляцию метаболизма оксипинов и других сигнальных липидов.

1.2. Астроциты: ключевые участники в поддержании гомеостаза и воспалительных процессах ЦНС

В работе выбраны глиальные клетки астроциты как ведущие клетки ЦНС, участвующие в развитии воспалительных ответов и регуляции энергетического баланса.

1.2.1. Астроциты в фокусе исследований 21 века

Отметим, что наблюдаемое отставание в лечении заболеваний ЦНС (по сравнению со многими другими заболеваниями человека) может быть из-за недооценки роли нейроглии, смещение акцентов исследователей XX века в сторону нейронов. Действительно, вклад глии в невропатологию был признан еще Рудольфом Вирховым, который в 1846 году обнаружил клетки, которым дал название “глия” и далее указывал, что «интерстициальная ткань (т.е. нейроглия) головного и спинного мозга является одним из наиболее частых мест патологических изменений» [7]. Это мнение разделяли исследователи конца 19-начала 20 века. Даже термин «нейрон» появился лишь через полвека после термина “глия” (1891 г.). Тем не менее, во второй половине XX века фокус внимания был сдвинут на нейроны, нарушения их функционала стали считать первопричиной патологий. Глиальные реакции на расстройства ЦНС считались неспецифическими, стереотипными, следующими за первичным повреждением нейронов и имеющими незначительные функциональные последствия [81]. Взгляды на

роль глии изменились в конце XX века. Стало понятно, что нейроны имеют ограниченные возможности самозащиты, при стрессе они ограничивают свою активность для сохранения энергии, если стресс продолжается, то нейроны погибают. Таким образом, они вносят незначительный вклад в адаптивные реакции нервной ткани на повреждение. А клетки нейроглии при патологической атаке усиливают нейропротекцию и запускают эволюционно консервативный активный защитный ответ (реактивный глиоз) [82]. Сложные адаптивные изменения глии противодействуют патологическим повреждениям.

В мозге человека количество глиальных клеток примерно равно количеству нейронов, составляя около 40% объема центральной нервной системы. Соотношение примерно 1:1 характерно для человека и увеличивается в эволюционном процессе от беспозвоночных к позвоночным и внутри позвоночных к человеку [7]. Глиальные клетки делят на группы: астроциты, олигодендроциты (участвуют в образовании миелиновой оболочки вокруг аксонов), микроглия (выполняют функции иммунной системы), эпидермальные клетки (выстилают желудочки мозга и принимают участие в образовании и циркуляции спинномозговой жидкости). Процентное соотношение различных типов глиальных клеток варьируется в зависимости от области мозга. Например, в коре головного мозга соотношение может быть 4:1 в пользу нейронов, а в мозжечке - наоборот, 1:4 [83].

Астроциты представляют собой наиболее многочисленную и морфологически разветвленную популяцию глиальных клеток центральной нервной системы, при этом их количество в несколько раз превышает численность микроглии [84]. Спектр выполняемых ими функций чрезвычайно широк: отростки астроцитов участвуют в формировании гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), а их контакты с синапсами образуют третий элемент трехстороннего синапса. Помимо метаболической поддержки нейронов и других клеток, астроциты также защищают соседние нейроны, обеспечивают поддержание гомеостаза внеклеточной жидкости, регулируют локальный кровоток и метаболическую поддержку нейронов [7,85–87]. Астроциты поглощают избыточное количество глутамата и K^+ и высвобождают факторы роста, молочную кислоту, глутамин, митоген и другие соединения. С развитием старения, травм и заболеваний астроциты претерпевают значительные морфологические и молекулярно-фенотипические изменения [7,87]. Стрессор (внешнее воздействие) в

астроцитах может вызывать метаболический стресс, нарушение молекулярного гомеостаза, структурные изменения и даже гибель клеток [87,88]. Это, в свою очередь, приводит к нарушению коммуникаций между клетками и гибель нейронов. Дисбаланс на молекулярном уровне провоцирует системное нарушение гомеостаза. В условиях хронической патологии эти процессы прогрессируют и, многократно усиливаясь, инициируют каскад патологических реакций

Наряду с микроглией, астроциты вносят существенный вклад в патогенез заболеваний нервной системы. Важной патофизиологической характеристикой астроцитов является их способность реагировать на повреждение ткани путем перехода в реактивное состояние, аналогично активации микроглии. Данный процесс, известный как реактивный астроглиоз, представляет собой универсальный ответ на широкий спектр повреждений ЦНС и является морфофункциональным признаком структурной патологии мозга [89]. Однако избыточный или хронический астроглиоз приводит к выраженной дисфункции астроцитов, что, в свою очередь, способствует реализации механизмов, усугубляющих патологические процессы при нейродегенеративных и других заболеваниях ЦНС [85].

1.2.2. TLR экспрессия и функции в астроцитах

Первичные астроциты крыс экспрессируют широкий спектр TLR (TLR1-9), и обладают полноценным функциональным аппаратом врожденного иммунитета, что позволяет им дифференцированно реагировать на патогены в зависимости от типа активирующего стимула [9,31].

Функциональная активность астроглиальных TLR долгое время оставалась предметом дискуссий. Ранние исследования показывали, что стимуляция TLR в культурах астроцитов, содержащих примеси микроглии, приводила к выработке провоспалительных цитокинов, однако при использовании отделенных от микроглии культур этот эффект исчезал. Последующие исследования с применением высокоочищенных культур астроцитов крыс убедительно продемонстрировали, что эти клетки способны реагировать на активацию TLR-рецепторов и секретировать провоспалительные медиаторы [9–11]. Кроме того, было установлено, что в чистых культурах астроцитов экспрессируется полный набор компонентов, необходимых для функционирования TLR4-сигнального

пути, включая сам рецептор TLR4, а также корецепторные молекулы CD14 и MD2, причем уровни их экспрессии сопоставимы с таковыми в смешанных культурах. Конфокальная микроскопия подтвердила коэкспрессию GFAP и TLR4 в очищенных астроцитах крыс. Более того, флуоресцентный конъюгат LPS демонстрирует связывание и транспорт в астроцитах после 30-минутной инкубации с колокализацией с GFAP [11]. С использованием ингибитора TLR4 Cli-095 было показано, что в астроцитах LPS реализует свое действие через TLR4 рецептор [90].

В астроцитах крыс LPS индуцирует раннюю активацию транскрипционного фактора NF-κB, которая реализуется через адаптерный белок MyD88 и сопровождается повышением экспрессии ряда молекул, включая TNF-α, VCAM-1, IL-15, IL-27 и CD14 [45,47,91]. Запускаемый при этом TLR4-зависимый сигнальный каскад приводит к продукции широкого спектра провоспалительных медиаторов. Координированная работа транскрипционных факторов NF-κB и AP-1 обеспечивает регуляцию экспрессии генов, кодирующих цитокины (TNF-α, IL-1β, IL-6), хемокины (CCL2, CXCL8, CXCL10), а также ключевые ферменты воспалительного ответа, такие как циклооксигеназа-2 (COX-2) и индуцибельная NO-синтаза (iNOS). Таким образом, астроциты крыс отвечают на TLR4-активацию индукцией сложного набора клеточно-зависимых молекулярных реакций, опосредованных сигнальными путями NF-κB, MAPK и Jak1/Stat1 [47,91–93]. Сигнальный каскад TLR4 в астроцитах крыс находится под контролем множественных механизмов обратной связи. В частности, его модуляция осуществляется благодаря наличию петель отрицательной обратной связи, примером которых служит индукция экспрессии супрессора цитокинового сигналинга SOCS-1, опосредованная активацией Jak1/Stat1 сигнального каскада [91,94].

В астроцитах TLR3 демонстрирует особенно высокие уровни экспрессии в физиологических условиях, что позиционирует эти клетки как ключевые сенсоры вирусных инфекций в ЦНС [48,49,95]. Высокие уровни экспрессии TLR3 обнаружены в астроцитах крыс в физиологических условиях [11,96,97]. Интересной особенностью является поверхностная локализация TLR3 в астроцитах мышей, в отличие от внутриклеточной локализации в микроглии [11,97].

В лабораторных условиях для изучения TLR3-сигналикации широко используется синтетический лиганд poly(I:C) (полиинозин-полицитидиловая кислота), который имитирует вирусную dsRNA.

Исследования на культурах астроцитов крыс показали, что poly(I:C) эффективно активирует TLR3-опосредованные сигнальные пути [10,11,49]. Особую роль играют встроенные механизмы регуляции воспалительного ответа. IRF3-опосредованное подавление NF-κB активности (механизм RИКА) при TLR3-активации представляет собой элегантный пример того, как астроциты балансируют необходимость противовирусной защиты с предотвращением избыточного воспаления. В астроцитах крыс также функционирует система негативной регуляции через индукцию SOCS-1, который ограничивает избыточную активацию Jak1/Stat1 пути [91,94].

Кроме того, астроциты крыс демонстрируют пластичность в своих ответах на TLR-активацию. Помимо классических иммунологических функций, TLR-стимуляция модулирует миграционную активность, пролиферацию и другие клеточные функции астроцитов. Так, активация TLR2 стимулирует миграцию через индукцию MMP-9, тогда как TLR3-активация может подавлять пролиферацию в условиях гипоксии [9].

Накопленные экспериментальные данные убедительно демонстрируют, что астроциты представляют собой не просто структурные элементы нервной ткани, но полноценные участники клеточных воспалительных ответов, оснащены сложным арсеналом рецепторов распознавания патогенов и способны к дифференцированному ответу на различные типы “угроз” [9,98].

1.2.3. Энергетический метаболизм в астроцитах

Астроциты являются основными клетками, метаболизирующими глюкозу в ЦНС, а также способные хранить её в форме гликогена [8]. При длительном повышении концентрации глюкозы астроциты накапливают её в форме гликогена, что сопровождается снижением энергетической эффективности [99]. Более того, на фоне гипергликемии в астроцитах наблюдается развитие провоспалительной реакции, что сопровождается усилением экспрессии цитокинов (TNFα, IL-6, IL-1β, IL-4), интенсификацией генерации активных форм кислорода, повышением активности транскрипционных факторов NF-κB и STAT3, а также изменением профиля синтезируемых оксипинонов [14,15,100].

Известно, что человеческий мозг потребляет 20-25% всей энергии организма, т.е. представляет собой один из наиболее энергозависимых органов [101]. Экспериментальные данные свидетельствуют, что астроциты потребляют приблизительно половину всей глюкозы мозга, хотя их

собственные энергетические потребности значительно ниже [102]. Это явление объясняется механизмом "астроцит-нейронального лактатного челнока" [103]. Согласно этой концепции, повышенная нейрональная активность сопровождается выделением глутамата, который активно захватывается астроцитами через специализированные транспортные системы. Это стимулирует в астроцитах усиленное потребление глюкозы и активацию гликолиза, приводя к повышенному образованию лактата. Последний выделяется в межклеточное пространство и поглощается нейронами, где используется как основной энергетический субстрат [103]. Примечательно, что энергетический метаболизм астроцитов и нейронов имеет принципиальные различия: в то время как нейроны преимущественно используют лактат для окислительного фосфорилирования, астроциты в основном метаболизируют глюкозу, демонстрируя выраженную гликолитическую направленность метаболизма [104].

Рассмотрим концепцию "метаболического репрограммирования" глиальных клеток [12,13]. Метаболическое репрограммирование глиальных клеток при активации — это перестройка их энергетики и обмена веществ (преимущественно между гликолизом и окислительным фосфорилированием, но также с участием аминокислот, липидов, митохондрий и др.), которая: 1) запускается сигналами воспаления, стресса, травмы или патологии; 2) управляется ключевыми регуляторами (HIF-1 α , AMPK, mTOR, NF- κ B и др.); 3) определяет, будет ли активация глиальных клеток преимущественно защитной/восстановительной или токсической/провоспалительной; 4) влияет на функцию и выживаемость нейронов, а также на исход при нейродегенерации, инсульте, демиелинизации и т.д. [12,13].

В отсутствии стрессовых стимулов астроциты имеют относительно стабильный метаболический профиль: сильная зависимость от гликолиза и лактатного шаттла, глутамат-глутаминового цикла, запасов гликогена [105]. При активации стресс-стимулами (PAMPs, DAMPs, цитокины, гипоксия, глутамат, альфа-синуклеин и др.) внутриклеточных сигнальных путей переключается работа метаболических ферментов и транспортёров: меняется вклад гликолиза, митохондриального дыхания, пентозофосфатного пути, обмена аминокислот и липидов. Изменения метаболизма, в свою очередь, влияют на сигнальные пути (через метаболиты, NAD⁺/NADH, АТФ, ROS, ацетил-СоА и др.), формируя обратную связь. В результате астроциты переходят в новое

«функционально-метаболическое состояние», которое определяет их роль в повреждении, защите, регенерации патологии или адаптацию клеток к новому состоянию (хроническое) [12,106].

Новое “функционально-метаболическое состояние” на астроцитах позволяет строить адаптивные клеточные модели, концепция которых была разработана ранее [100,107]. Перестройка за 24-48 часов воздействия “подострой” концентрации стимула, т.е. неповреждающего, не выводящего клетки в апоптоз или другую форму регулируемой гибели.

Кроме важной роли в гомеостазе воспалительных и энергетических процессов астроциты привлекают внимание исследователей как первичные клетки, подходящие для относительно длительного культивирования (несколько недель). Работать с первичными культурами астроцитов, выделенных из мозга новорожденных крыс, начали в конце 70-х годов XX века [108]. В настоящее время использование первичных культур астроцитов стало стандартом для изучения процессов нейровоспаления, астроглиоза, взаимодействия с нейронами и эндотелиальными клетками. Культивируют астроциты несколько недель, что дает возможность создавать адаптивные клеточные модели, т.е. изучать изменения клеток при их адаптации к изменениям среды или длительным воздействиям отдельных стимулов [98]. Это дает преимущество перед линиями клеток, полученных при опухолевых трансформациях, или более короткоживущими другими первичными клетками.

Несмотря на убедительные данные о ключевой роли астроцитов в нейровоспалении и энергетическом гомеостазе, а также о наличии у них функционально различных TLR-сигнальных путей, вопрос о том, как именно метаболический статус клетки (в частности, уровень глюкозы и интенсивность гликолиза) модулирует провоспалительный ответ, индуцированный разными классами патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (бактериальным LPS и вирусным poly(I:C)), остается практически не изучен. Существующие работы, как правило, рассматривают эти аспекты изолированно, тогда как в условиях патологии (например, при диабете или ишемии) гипергликемия и воспаление действуют синергично. В связи с этим, актуальной исследовательской задачей является выяснение молекулярных механизмов, связывающих метаболическое репрограммирование астроцитов с дифференциальной

активацией TLR4- и TLR3-сигнальных каскадов, и поиск соединений, способных таргетировать это взаимодействие для ингибирования патологического нейровоспаления.

1.3. АТФ как медиатор межклеточной коммуникации в ЦНС

Внеклеточный АТФ относят к эндогенным веществам, ассоциированным с опасностью (DAMP) (Рис. 1). Является ли внеклеточный АТФ полноценным провоспалительным стимулом? Поясним причины, лежащие в основе возникновения такого вопроса. Известно, что АТФ, ключевая молекула энергетического метаболизма, выполняет также сигнальную функцию при высвобождении во внеклеточное пространство [109]. Эта роль, хотя и менее изучена, распространена у организмов всех уровней организации — от бактерий до млекопитающих [19]. Сигнальное действие АТФ опосредовано P2-пуринорецепторами, присутствующими на многих клетках [110]. В центральной нервной системе (ЦНС) внеклеточный АТФ модулирует взаимодействия между нейронами и глиальными клетками, поскольку его рецепторы экспрессируются в различных типах клеток ЦНС [111,112]. Особое значение пуринергическая сигнализация имеет в астроцитах, которые под её влиянием продуцируют значительное количество провоспалительных медиаторов [20].

Пуринергическая сигнализация, скорее всего, являлась сигналом опасности еще на стадии зарождения жизни, поскольку наблюдается даже у прокариот (они пытаются покинуть области с высокой концентрацией АТФ, поскольку последняя сигнализирует о повреждении и гибели клеток) [21], для простейших также описаны многочисленные сигнальные каскады с участием ионотропных пуринорецепторов [113]. Это является указанием на то, что АТФ может быть провоспалительным стимулом, т.е. сигналом опасности.

С другой стороны, в нервной системе пурины действуют как нейротрансмиттеры и нейромодуляторы [21], т.е. эту систему можно отнести к поддерживающим гомеостаз. К пуринергическим трансммиттерам относят АТФ, УТФ, АДФ, УДФ, АМФ и аденозин. Секреция АТФ в нейроглии, как и у нейронов, осуществляется специальными механизмами (экзоцитоз везикул, снабжённых везикулярным транспортером нуклеотидов VNUT/SLC17A9 [114], либо диффузия через ионные каналы различных типов [115]. АТФ также является источником внеклеточного аденозина, благодаря работе семейства эктонуклеотидаз [116]. Активность

этих ферментов поддерживает концентрацию АТФ во внеклеточной среде на низком уровне (порядка нескольких десятков нМ). Клетки содержат около 5–10 мМ АТФ. Это дает высокий (примерно 9 порядков) внешний градиент АТФ между клетками и внеклеточным пространством, поэтому повреждение клеток или клеточный стресс, приводящий к увеличению проницаемости мембраны для АТФ, приводит к значительному увеличению концентрации АТФ во внеклеточной среде. Локально, вблизи мембраны клеток, она может достигать десятков микромолей [19]. Например, у астроцитов сетчатки периклеточная (непосредственно около клеток) концентрация АТФ составляет около 145 мкМ [117]. Кроме того, имеется положительная обратная связь: активация P2X7-рецепторов стимулирует дополнительное высвобождение АТФ из астроцитов [118,119].

Высвобождение АТФ во внеклеточную среду происходит как регулируемо, например, через везикулы при воспалении, гипоксии или ишемии, так и пассивно – при некрозе клеток [120,121]. Повышение концентрации внеклеточного АТФ коррелирует с активацией воспалительных процессов [122,123]. Патологические состояния ЦНС, включая гипоксию, ишемию и механические повреждения, сопровождаются резким увеличением концентрации внеклеточного АТФ [124].

Пуринергические рецепторы делятся на два класса: ионотропные P2X и метаботропные P2Y [125]. P2X-рецепторы представляют собой лиганд-зависимые катионные каналы, активация которых приводит к притоку Ca^{2+} и Na^+ в клетку и выходу K^+ [126]. P2Y-рецепторы связаны с G-белками и реагируют на различные нуклеотиды, включая АТФ, АДФ, УТФ, УДФ и их производные [126].

Экзогенный АТФ активирует в астроцитах комплекс внутриклеточных сигнальных путей, включая транскрипционные факторы, митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК), внутриклеточный Ca^{2+} [20]. Активация рецептора P2X7 вызывает быстрое, но кратковременное увеличение внутриклеточного Ca^{2+} , обычно достигающее пика в течение нескольких минут и затем снижающееся [127]. Длительное присутствие АТФ вызывает осцилляции внутриклеточного кальция [128,129]. Провоспалительные эффекты активации P2X7 хорошо охарактеризованы и включают увеличение уровня транскрипционного фактора NF- κ B [130] активацию МАРК-каскадов, в частности ERK1/2 и p38, с быстрым повышением уровня фосфорилирования в течение первых минут

стимуляции и последующим постепенным снижением [131,132], активации STAT3 [133]. Таким образом, MAPK-каскады (ERK1/2, p38) и STAT3 играют центральную роль в проведении АТФ-индуцированных сигналов в астроцитах, обеспечивая регуляцию провоспалительных реакций и транскрипционных процессов. Это указывает на возможную роль АТФ как провоспалительного стимула.

С другой стороны, экспериментальные данные *in vivo* демонстрируют роль P2X7 рецептора в активации инфламмосомы при ишемии мозга, а также при болезни Паркинсона, Альцгеймера, депрессии и тревожных расстройствах [118,134–136]. Уникальные свойства P2X7, низкое сродство к внеклеточному АТФ и медленная десенситизация, делают этот рецептор оптимальным сенсором патологических состояний: он эффективно активируется лишь при относительно высоких (миллимолярных) концентрациях АТФ, характерных для повреждения тканей, и практически не реагирует на физиологические нано- и микромолярные уровни нуклеотидов [137,138]. Эти свойства могут указывать на то, что активация пуриnergических рецепторов на астроцитах АТФ может играть роль не провоспалительного стимула, а более широкого модулятора различных ответов, в том числе и на провоспалительные стимулы.

Взаимосвязь активации пуриnergических рецепторов и синтеза простагландинов была установлена ещё на заре изучения пуриnergических рецепторов [139–141], однако оценка шла преимущественно по провоспалительному простагландину PGE₂, как изменяется весь профиль оксипиринов не было изучено.

Несмотря на признанную роль пуриnergической системы в патогенезе нейровоспалительных заболеваний ЦНС, ключевые аспекты ее регуляции при метаболических нарушениях остаются невыясненными. В частности, требуется дальнейшее изучение влияния гипергликемии на пуриnergическую сигнализацию в астроцитах. Кроме того, открытым остается вопрос о возможности модуляции этих процессов путем фармакологической регуляции энергетического метаболизма. Решение этих задач необходимо для понимания механизмов нейродегенерации, ассоциированной с метаболическими нарушениями.

1.4. Метформин: от сахароснижающего препарата к модулятору иммунитета и метаболизма

На сегодняшний день накоплено много данных, свидетельствующих о том, что некоторые сахароснижающие препараты обладают выраженным противовоспалительным действием. Например, агонисты рецепторов GLP-1, такие как семаглутид или лираглутид, демонстрируют способность снижать уровни ключевых маркеров воспаления (С-реактивный белок (CRP), IL-6, TNF α) [142]. Схожие результаты были получены для препаратов из группы тиазолидиндионов (пиоглитазон, розиглитазон) [143]. Для ингибиторов SGLT2 (эмпаглифлозин, дапаглифлозин) была показана способность подавления активности инфламмосомы и пути TLR4/NF- κ B, значительному снижению уровня CRP [144].

Метформин (N,N-диметилбигуанид) относится к классу бигуанидов, является препаратом первой линии терапии диабета 2 типа. К известным механизмам метформина на уровне организма относятся: снижение гипергликемии, торможение глюконеогенеза в печени, увеличение транспортной емкости всех типов мембранных переносчиков глюкозы, активация фибринолиза и уменьшение содержания атерогенных липопротеидов. В последние годы активно изучаются его плейотропные эффекты, включая нейропротекцию [6,22,145–147]. Метформин оказывает свои центральные эффекты через множество механизмов: активация АМРК (AMP-activated protein kinase), усиливающая клеточный энергетический метаболизм и аутофагию; усиление антиоксидантной защиты; подавление воспаления; ингибирование агрегации белков; улучшение митохондриальной функции [23,148]. Ряд клинических и доклинических данных указывают на связь метформина с улучшением когнитивных функций, снижением риска развития деменции и модуляцией патологических признаков нейродегенеративных заболеваний [6,26].

В различных моделях повреждения ЦНС метформин продемонстрировал способность ингибировать реактивный астроглиоз [26]. Показано улучшение когнитивных функций в экспериментах на мышах, которые сопровождались снижением гипертрофии астроцитов [149]. У диабетических крыс после ишемического инсульта терапия метформином (*in vivo*) ингибировала снижение сенсомоторных дефицитов и предотвращала отёк и набухание астроцитов вокруг зоны инфаркта, снижала число GFAP-позитивных астроцитов [150]. При болезни

Паркинсона метформин подавлял развитие дискинезии и регулировал сигнализацию Akt/GSK3 и активацию астроцитов в мышинной модели 6-OHDA [151]. Метформин также улучшал пролиферацию астроцитов и микроглии у крыс со спорадической моделью болезни Альцгеймера [152].

Классический механизм действия метформина, обнаруживаемый во всех изученных типах клеток, связывают с его ингибированием митохондриального комплекса I электронтранспортной цепи, что ингибирует трансмембранный поток электронов и формирование мембранного потенциала, тем самым снижая потребление кислорода митохондриями и подавляя синтез АТФ, что увеличивает соотношение АМФ/АТФ в клетке, что служит ключевым сигналом для активации АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК) [22,153]. Активация АМРК восстанавливает энергетический гомеостаз за счет стимуляции катаболических путей, вызывающих синтез АТФ, и ингибирования анаболических путей, которые его потребляют. Кроме того, метформин подавляет выработку воспалительных цитокинов, способствуя поляризации макрофагов в противовоспалительный тип М2 посредством активации фосфорилирования АМРК-1 α [154]. На макрофагах показаны положительные эффекты метформина через АМРК-зависимое ингибирование активации STAT3 [155]. Кроме того, противовоспалительные свойства связывают с его ингибирующим действием на ядерный фактор NF- κ B; активация АМРК облегчает ядерную транслокацию ядерного фактора эритроидного 2-связанного фактора 2 (Nrf2) и увеличивает экспрессию гемоксигеназы-1 (НО-1) для противодействия повреждению клеток, вызванному липополисахаридом (LPS) [156].

На существование АМРК-зависимого механизма на астроцитах указывают ряд авторов [25,149,157]. Когда первичные астроциты крыс инкубировали с метформином и/или агонистом АМРК АICAR в течение 1 часа, затем стимулировали клетки глюкозой (концентрация 33 мМ) на 48 часов, то в контроле наблюдали повышение TNF α , ИЛ-6, ИЛ-18, фосфорилирование ERK; добавление метформина снимало высванное глюкозой провоспалительное состояние, причем эффекты метформина полностью имитировались АICAR, что указывает на вовлеченность АМРК в наблюдаемые процессы [25].

Было также показано, что метформин может замедлять старение астроцитов и нормализовать функции митохондрий АМРК-независимым

образом [158], в том числе проявлять противовоспалительные свойства независимо от AMPK/mTOR сигнализации, на что указывают работы с введением метформина нокаутным по LDLR (рецептор липопротеинов низкой плотности, модель семейной гиперхолестеринемии) гену мышам [159]. Наличие множественного пути воздействия метформина на астроцитах согласуется с данными на других клетках [22]. Метформин подавляет NF-κB-опосредованное воспаление в астроцитах (высвобождение TNF-α IL-1β), одновременно повышает экспрессию противовоспалительных цитокинов IL-10, IL-4 через активацию сигнального пути Nrf2-ARE [24]. Подавление NF-κB связывают с активацией AMPK [157]. В астроцитах, обработанных метформином, были значительно снижены скорость цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), уровни интермедиатов и производных ЦТК, а также нарушено опосредованное комплексом I митохондриальное дыхание [160]. Этот метаболический эффект согласуется с известным механизмом действия метформина через ингибирование митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы (GPD2), что изменяет клеточный редокс-баланс и снижает перенос редокс-эквивалентов из цитозоля в митохондриальный матрикс [26,161].

Интересно отметить, что метформин влияет на спонтанную кальциевую сигнализацию в культивируемых астроцитах как в нормальных, так и гипоксических условиях [162]. Учитывая важное значение Ca²⁺-сигнализации для различных функций астроцитов, включая регуляцию локальной синаптической активности, модуляция этого процесса метформином может иметь терапевтическое значение. Поскольку основными регуляторами внутриклеточного Ca²⁺ являются пуринергические рецепторы, то это исследование поднимает вопрос о взаимодействии метформина с сигнальной системой внеклеточного АТФ.

Отдельное внимание уделяется влиянию метформина на нейровоспаление, учитывая связь между диабетом, гипергликемией и активацией астроглии. У мышей с диабетом лечение метформином снижало астроглиоз и улучшало когнитивные функции [163]. На культуре астроцитов, подвергнутых воздействию высокой глюкозы, предобработка метформином ослабляла воспалительный ответ [25]. Нейропротекторный эффект реализуется через ингибирование NF-κB, что ограничивает повреждение нейронов [164]. Препарат также снижал экспрессию IL-1β и TNF-α у крыс с церебральной ишемией [165], повышал уровень противовоспалительного IL-10 в макрофагах спинного мозга [166] и

модулировал активацию астроцитов в противовоспалительном направлении [167].

Таким образом, противовоспалительное действие метформина носит многокомпонентный характер и опосредовано влиянием на различные сигнальные пути. Детальный анализ воздействия метформина на клеточный ответ при активации различных подтипов TLR и других стимулов в астроцитах, включающий в себя изменения в сигнальных путях, высвобождения цитокинов, и продукции оксипинов, способен обеспечить основу для разработки новых терапевтических стратегий в лечении нейровоспалительных заболеваний.

Взаимосвязь энергетического метаболизма и системы врожденного иммунитета представляет собой одну из наиболее актуальных проблем современной биомедицины. Нарушения метаболизма глюкозы, характерные для сахарного диабета и метаболического синдрома, тесно связаны с хроническими воспалительными процессами в центральной нервной системе. Астроциты, как ключевые клетки, обеспечивающие метаболическую поддержку нейронов и участвующие в иммунных реакциях мозга, представляют особый интерес для изучения этих взаимодействий.

Система Толл-подобных рецепторов (TLR), являющаяся основным компонентом врожденного иммунитета, активно функционирует в астроцитах. При этом условия гипергликемии могут существенно модифицировать TLR-опосредованные воспалительные ответы. В процессе нарушения гомеостаза в ЦНС активно выделяется во внеклеточную среду АТФ, который через систему пуриnergических клеток модифицирует функции астроцитов, однако роль АТФ как провоспалительного стимула остается неясной. Метформин, широко применяемый антидиабетический препарат, обладает не только гипогликемическими, но и противовоспалительными свойствами, что делает его перспективным инструментом для изучения взаимосвязи метаболизма и воспаления.

Несмотря на значительный прогресс в понимании отдельных аспектов энергетического метаболизма и врожденного иммунитета, комплексное изучение их взаимодействия в астроцитах в условиях гипергликемии остается недостаточно изученным. Особый интерес представляет роль оксипинов - биологически активных метаболитов

полиненасыщенных жирных кислот, которые выполняют важные сигнальные функции в воспалительных процессах.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы

В работе использовали метформин гидрохлорид («Cayman Chemical Company», США), стрептомицин/пенициллин (кат. № А063), трипсин (кат. № Р037), ЭДТА и фетальную бычью сыворотку (кат. № BS-110/500) от компании «ПанЭко» (Россия). Культивирование клеток проводили в среде Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (кат. № 21885-025, «Gibco», «Thermo Fisher Scientific», США). Для иммуноблоттинга применяли антитела против СОХ-2 (кат. № 12282), СОХ-1 (кат. № 4841), фосфо-cPLA₂ (Ser505, кат. № 2831), cPLA₂ (кат. № 2832), p44/42 MAPK (Erk1/2) (кат. № 9102), фосфо-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204, кат. № 9106), p38 MAPK (кат. № 9212), фосфо-p38 MAPK (Thr180/Tyr182, кат. № 9211), STAT3 (кат. № 12640), фосфо-STAT3 (кат. № 2566), β-тубулина производства «Cell Signaling Technology» (США). В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена анти-кроличьи и анти-мышинные («Cell Signaling Technology», США), а для детекции – субстрат ECL (кат. № 32209, «Thermo Fisher Scientific», США). Для стимуляции клеток использовали АТФ (кат. № 1191, «Sigma-Aldrich», США), липополисахарид (LPS) (кат. № L2630, «Sigma-Aldrich», США), поли-I:C (PIC) (кат. № tlr1-pic, «InvivoGen», США). Уровень IL-6 определяли с помощью набора для ИФА (кат. № 550319, «BD Biosciences», США). Анализ оксилипинов проводили с использованием дейтерированных стандартов: 6-keto PGF1α-d4 (кат. № 315210), TXB2-d4 (кат. № 319030), PGF2α-d4 (кат. № 316010), PGE2-d4 (кат. № 314010), PGD2-d4 (кат. № 312010), LTC4-d5, LTB4-d4, 5(S)-HETE-d8 (кат. № 334230), 12(S)-HETE-d8 (кат. № 334570), 15(S)-HETE-d8 (кат. № 334720), EPA-d5 (кат. № 10005056), DHA-d5 (кат. № 10005057) и AA-d8 (кат. № 390010) от «Cayman Chemical Company» (США). Экстракцию липидов выполняли с помощью картриджей Oasis® PRIME HLB (60 мг, 3 мл, кат. № 186008056, «Waters», Германия).

2.2. Первичная культура клеток

Первичные культуры астроцитов получали из головного мозга новорождённых (1–2-дневных) крысят линии Wistar обоего пола в соответствии с международными этическими нормами (Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных научных целей) и протоколом, одобренным комитетом по биоэтике Биологического факультета МГУ (решение № 2/13 от 08.04.2013). После декапитации животных извлекали головной мозг,

избегая захвата соединительнотканых оболочек, и промывали охлаждённым раствором Пакса (137 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,44 мМ KH_2PO_4 , 0,3 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,4). Ткань механически диссоциировали последовательным просеиванием через нейлоновые сита с диаметром пор 250 и 136 мкм.

Полученную клеточную суспензию высевали в культуральные флаконы (75 см²) с плотностью 6×10^5 клеток/мл в среде DMEM, содержащей 1 г/л глюкозы, 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 50 ЕД/мл стрептомицина и 50 мкг/мл пенициллина. Культивирование проводили при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Через 5 дней для удаления микроглии флаконы помещали на орбитальный шейкер (OS-20, «Biosan», Латвия) и инкубировали при 200–280 об/мин в течение 90 минут. Среду с отслоившимися микроглиальными клетками удаляли, а обогащённую астроцитами культуру продолжали выращивать в течение 4 дней, заменяя среду каждые 48 часов. Чистоту культуры (>95% астроцитов) подтверждали иммуноцитохимическим окрашиванием на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), тогда как доля микроглиальных клеток (изолектин В4-позитивных) не превышала 2% [107].

Перед экспериментом клетки трипсинизировали, ресуспендировали в свежей среде и высевали в 6-луночные планшеты ($7,5 \times 10^5$ клеток/луночка). За 48 часов до стимуляции липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл), полиинозой-полицитидиловой кислотой (PIC, 25 мкг/мл) или АТФ (100 мкМ) среду заменяли на DMEM с нормальной (1 г/л) или высокой (4,5 г/л) концентрацией глюкозы. Метформин (2,5 мМ) добавляли за 24 часа до стимуляции.

2.3. Оценка цитотоксичности метформина

Для всестороннего изучения влияния метформина на клеточную жизнеспособность был проведен комплекс взаимодополняющих исследований, включающий морфологический анализ, оценку метаболической активности и определение степени повреждения клеточных мембран. Клеточные культуры подвергали воздействию метформина разных концентраций ((0(контроль); 0,5 мМ, 1 мМ, 5 мМ, 10 мМ) в течение 24-48 часов при стандартных условиях культивирования.

Выполняли анализ высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH) как маркера повреждения клеточных мембран. После 24-часовой инкубации с метформином супернатанты инкубировали с реакционной смесью, содержащей субстраты для LDH (Roshe, кат. № 11644793001), в течение 30

минут в темноте. Образовавшийся окрашенный продукт реакции количественно определяли спектрофотометрически при 490 нм. В качестве контроля использовали клетки, обработанные 2% раствором Triton X-100 для определения максимально возможного высвобождения LDH.

Для оценки влияния метформина на метаболическую активность клеток применяли стандартный МТТ-тест (определение метаболической активности клеток по активности NADH-зависимых оксидоредуктаз, восстанавливающих желтый тетразолиевый краситель до пурпурного формазана). После инкубации с соединением клетки обрабатывали тетразолиевым красителем МТТ в течение 3 часов при 37°C. Образовавшийся формазан растворяли диметилсульфоксидом и измеряли оптическую плотность при 570 нм.

Все эксперименты проводили в нескольких повторностях с обязательным включением контрольных групп. Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием параметрических методов анализа. Результаты представляли как среднее значение \pm стандартное отклонение, а различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

2.4. Оценка изменения экспрессии генов

Тотальную РНК выделяли из культур астроцитов с использованием набора GeneJET RNA Purification Kit («Thermo Scientific», США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию и чистоту РНК оценивали спектрофотометрически на приборе NanoPhotometer N («Implen», Германия). Обратную транскрипцию проводили с применением набора MMLV RT kit («Евроген», Россия) и олиго-(dT)-праймеров согласно рекомендациям производителя.

Количественную ПЦР в реальном времени выполняли на амплификаторе DTLite 4 («ДНК-Технология», Россия) с использованием SYBR Green-содержащей смеси 5× PCR-HS-SYBR («Евроген»). Анализировали уровни экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-6, iNOS, противовоспалительного IL-10 и циклооксигеназы 2 (COX-2). В качестве референсного гена использовали β -актин, данные нормализовали относительно контрольных образцов. Последовательности специфичных праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1. Последовательности ДНК праймеров, используемых для ОТ-ПЦР.

Ген	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')	Номер NM	Длина ампликона
<i>TNFα</i>	CAAGGAGGAGAAG TTCCCAA	TGATCTGAGTGTG AGGGTCTG	012675	70
<i>IL-10</i>	CCCAGAAATCAAGG AGCATTTG	TCATTCTTCACCT GCTCCAC	012854	129
<i>COX-2</i>	TGTACAAGCAGTGG CAAAGG	TEGCATCTGGACG AGGCTTT	017232	221
<i>IL-1β</i>	CACCTCTCAAGCAG AGCACAG	GGGTCCATGGTG AAGTCAAC	031512	79
<i>IL-6</i>	CTGGTCTTCTGGAG TTCCGT	TGGTCTTGGTCCT TAGCCAC	012589	225
<i>iNOS</i>	CCACAATAGTACAA TACTACTTGG	ACGAGGTGTTTCAG CGTGCTCCACG	012611	394
<i>β-актин</i>	AGATGACCCAGATC ATGTTTGAG	GGCATACAGGGAC AACACAG	031144	80

2.5. Иммуноблоттинг для оценки внутриклеточных изменений

Для оценки изменений в сигнальных путях астроцитов использовали метод иммуноблоттинга. Клетки лизировали в модифицированном RIPA-буфере (50 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 1% NP-40, 0,25% Na-дезоксихолата, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ NaF) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз и фосфатаз («Roche Molecular Biochemicals», Германия). Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда и нормализовали перед электрофорезом.

Белки разделяли методом SDS-электрофореза в 10% полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозные мембраны с размером пор 0,2 мкм («Bio-Rad», США) с использованием системы полусухого трансблота Trans-Blot SD («Bio-Rad»). После блокирования 5% обезжиренным молоком в TBST (TBS с 0,05% Tween-20) мембраны инкубировали с первичными антителами (разведение 1:1000, 4°C, ночь) против следующих белков:

- **Циклооксигеназы: COX-1, COX-2**

- **МАР-киназы:** фосфо-p44/42 МАРК (ERK1/2, Thr202/Tyr204), p44/42 МАРК (ERK1/2), фосфо-p38 МАРК (Thr180/Tyr182), p38 МАРК
- **Фосфолипазы:** фосфо-cPLA₂ (Ser505), cPLA₂
- **Транскрипционные факторы:** p-STAT3 (Tyr705), STAT3, p-NF-κB p65 (Ser536), NF-κB p65
- **Контроль загрузки:** β-тубулин

Все антитела были получены от «Cell Signaling Technology» (США). После инкубации с видоспецифичными вторичными антителами (1:10000, 1 ч при комнатной температуре) сигнал детектировали с использованием хемилюминесцентного субстрата ECL Plus («Thermo Scientific», США). Визуализацию проводили на системе гель-документации ChemiDoc™ XRS+ («Bio-Rad», США). Для количественного анализа использовали программу QuantityOne 4.6.9 («Bio-Rad»), нормализуя интенсивность полос целевых белков к β-тубулину. Каждый эксперимент повторяли трижды для статистической достоверности.

2.6. ВЭЖХ-МС/МС для детекции липидов

Для количественного определения оксипинов и жирных кислот в культуральной среде использовали метод тандемной масс-спектрометрии с предварительной твердофазной экстракцией. После завершения экспериментов клеточные супернатанты центрифугировали (1000 g, 5 мин) и хранили при -80°C до проведения анализа.

Перед экстракцией к 700 мкл образца добавляли 1 мл охлажденного метанола (-20°C) для осаждения белков. Липидные компоненты экстрагировали с использованием картриджей OASIS® PRIME HLB (60 мг, 3 мл; Waters, Германия) согласно рекомендациям производителя. После экстракции образцы концентрировали в потоке азота и ресуспендировали в 100 мкл метанола.

Хроматографическое разделение проводили на системе ультра-ВЭЖХ Nexera (Shimadzu, Япония) с колонкой Phenomenex C8 (2,1×150 мм, 2,6 мкм) при температуре 40°C. В качестве подвижной фазы использовали градиентную смесь ацетонитрила (0,1% муравьиной кислоты) и воды (0,1% муравьиной кислоты) со скоростью потока 0,4 мл/мин. Общий объем инъекции составлял 20 мкл.

Масс-спектрометрический анализ выполняли на тройном квадрупольном масс-спектрометре LCMS-8040 (Shimadzu, Япония) в

режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Ионизацию проводили методом электрораспыления в отрицательной модальности. Оптимальные параметры работы масс-спектрометра включали: температуру термоблока 400°C, температуру линии десольватации 250°C, расход распыляющего газа 3 л/мин и осушающего газа 10 л/мин.

Для количественного анализа использовали дейтерированные внутренние стандарты (Cayman Chemical, США): 6-keto-PGF1 α -d4, TXB2-d4, PGE2-d4, PGD2-d4, 5(S)-HETE-d8, 12(S)-HETE-d8 и 15(S)-HETE-d8. Идентификацию и количественное определение оксипинов проводили с помощью программного обеспечения Lipid Mediator Version 2 (Shimadzu, Япония), сравнивая время удерживания, масс-спектры и интенсивность сигналов аналитов с соответствующими стандартами. Концентрации оксипинов нормировали на общее содержание белка в образце, определяемое методом Брэдфорда, и выражали в пикограммах на миллиграмм (пг/мг) белка.

2.7. Определение цитокинов при помощи иммуноферментного анализа

Концентрацию IL-6 в клеточных супернатантах определяли с использованием коммерческого набора для иммуноферментного анализа BD OptEIA™ (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США) в соответствии с инструкцией производителя. После завершения экспериментов супернатанты центрифугировали (1000 g, 5 мин) и хранили при -80°C до проведения анализа.

Анализ проводили на планшетном спектрофотометре Synergy H4 (BioTek, Уиноски, Вермонт, США) с детекцией при длине волны 450 нм (референсная фильтрация 570 нм). Все измерения выполняли в трех повторностях. Концентрацию IL-6 рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с использованием серийных разведений рекомбинантного стандарта IL-6, входящего в состав набора. Результаты выражали в пикограммах на миллилитр (пг/мл) клеточного супернатанта.

2.8. Анализ выброса активных форм кислорода

Для оценки уровня активных форм кислорода (АФК) использовали флуоресцентный зонд CellROX® Deep Red Reagent производства Thermo Fisher Scientific (США). Клетки инкубировали с 5 мкМ зонда в течение 30 минут при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После инкубации проводили

тремякратную отмывку клеток фосфатно-солевым буфером (PBS) для удаления несвязавшегося красителя. Флуоресцентные измерения выполняли на планшетном спектрофотометре Synergy H4 (BioTek, США) с параметрами детекции: длина волны возбуждения 640 нм, длина волны эмиссии 665 нм.

2.9. Анализ энергетического метаболизма астроцитов

Для комплексного анализа энергетического метаболизма клеток проводили одновременное измерение скорости потребления кислорода (OCR) и скорости внеклеточного закисления (ECAR) с помощью анализатора Seahorse XFp (Agilent, США). Астроциты высевали в специализированные планшеты XFp с плотностью 5000 клеток на лунку и культивировали в течение 24 часов перед проведением анализа.

Перед началом измерений культуральную среду заменяли на 180 мкл реакционной среды, состоящей из DMEM с добавлением 5 mM HEPES, 1 mM пирувата натрия и 2 mM глутамин (pH 7,4). Клетки инкубировали в этой среде в течение 40 минут при 37°C в условиях отсутствия CO₂ для стабилизации метаболических показателей.

В ходе эксперимента последовательно вносили модуляторы митохондриальной функции: сначала 10 mM глюкозы для оценки базального уровня метаболизма, затем 4,5 мкМ олигомицина (ингибитор АТФ-синтазы), далее 10 мкМ CCCP (карбонилцианид м-хлорфенилгидразон, разобщитель окислительного фосфорилирования), и наконец смесь 2.5 мкМ ротенона и 4 мкМ антимицина А (ингибиторы комплексов I и III дыхательной цепи). После каждой инъекции регистрировали показатели в четыре временные точки с интервалом 5 минут.

Полученные данные анализировали (OCR, ECAR) с использованием программного обеспечения Seahorse XFp Wave 2.6.1, что позволило рассчитать ключевые параметры митохондриальной функции, включая базальное дыхание, максимальную дыхательную способность и резерв дыхания и др. (табл. 2).

Таблица 2. Методика расчёта параметров энергетического метаболизма по скорости потребления кислорода (OCR) и скорости внеклеточного закисления (ECAR), измеряемых с помощью Seahorse XFp.

Параметр	Формула
Базальный гликолиз	(среднее ECAR между добавлением глюкозы и олигомицина) – (среднее ECAR перед добавлением глюкозы)
Гликолитическая способность	(среднее ECAR после добавления олигомицина) – (среднее ECAR перед добавлением глюкозы)
Негликолитическое закисление	среднее ECAR перед добавлением глюкозы
Максимальное дыхание	(среднее OCR после добавления СССР) – (немитохондриальное потребление кислорода)
Олигомицин-чувствительное потребление кислорода	(среднее OCR перед добавлением олигомицина) – (среднее OCR после добавления олигомицина)
Дыхательная ёмкость	(максимальное дыхание) – (базальное дыхание)

Для корректного сравнения результатов проводили нормализацию данных по количеству клеток. После завершения метаболических измерений клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 15 мин при 4 °С и окрашивали ядра 300 нМ раствором DAPI в течение 20 минут. Количественную оценку клеточной плотности выполняли методом конфокальной микроскопии (Carl Zeiss, Германия), подсчитывая количество ядер в пяти случайных полях зрения для каждой лунки. Все эксперименты проводили в трех независимых биологических повторностях.

2.10. Статистический анализ экспериментальных данных

Результаты исследований представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение (SD). Перед проведением статистического анализа нормальность распределения данных в каждой группе проверяли с использованием теста Шапиро-Уилка. Для оценки статистической значимости различий между группами применяли t-тест Стьюдента или

однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). В случаях множественных сравнений использовали поправку Бенджамини-Хохберга для контроля уровня ложноположительных результатов.

При анализе взаимодействия различных факторов применяли двухфакторный дисперсионный анализ с уровнем значимости 0,05. Во всех экспериментах различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Каждое исследование выполняли минимум в трех независимых биологических повторностях для обеспечения достоверности полученных результатов.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

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 [212,229].

На первом этапе исследований мы охарактеризовали изменения энергетического метаболизма астроцитов, культивируемых при 5 мМ (NG, нормальная концентрация глюкозы) и 22,5 мМ (HG, клеточная гипергликемия) в течении 48 ч перед добавлением стимулов, вызывающих ответ системы врожденного иммунитета. Ранее было показано, что такая обработка позволяет клеткам адаптироваться к условиям внешней среды (повышенное содержание глюкозы), прийти в новое устойчивое состояние, которое влияет на способность клеток отвечать на воздействие внешних стимулов (повышение выброса TNF α при стимуляции LPS) [107].

В качестве стимулов ответов врожденного иммунитета использовали LPS, который является агонистом TLR4 на астроцитах [90] и PIC, который считается агонистом TLR3 рецепторов и вызывает ответы на астроцитах [168]. Для характеристики изменений способности клеток отвечать на стимулы использовали метформин, который является ингибитором митохондриального дыхания (см. п. 1.4).

Для характеристики метаболизма использовали технологию Seahorse, позволяющую получать данные о функциональных параметрах клеточного метаболизма в режиме реального времени [169]. Ранее изменения энергетического метаболизма астроцитов в гипергликемических моделях этим методом охарактеризованы не были.

Перед нами стояли следующие вопросы: 1) как меняется энергетический метаболизм при адаптации астроцитов к различным концентрациям глюкозы; 2) как активация TLR системы влияет на энергетический метаболизм; 3) зависит ли ответ TLR системы от изменений энергетического метаболизма; 4) влияет ли ингибирование первого компонента дыхательной цепи (NADH:убихинон оксидоредуктаза, комплекс I) в митохондриях метформином на влияние TLR на энергетический метаболизм?

3.1.1 Жизнеспособность культивируемых астроцитов после метформина

На предварительном этапе исследования мы оценили, в каких концентрациях метформин оказывает токсичное воздействие на клетки. Для этого двумя методами определили влияние разных концентраций метформина на жизнеспособность клеток: 1) оценка внеклеточной активности лактатдегидрогеназы (LDH); 2) оценка внутриклеточной активности NAD(P)H-зависимых оксидоредуктазных ферментов с помощью 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ).

Астроциты, культивируемые в среде с 5 мМ глюкозы, инкубировали с разными концентрациями метформина 24 ч (Рис. 3). Метформин в концентрации до 10 мМ не увеличивал внеклеточную активность лактатдегидрогеназы (LDH) по сравнению с контрольными клетками, необработанными метформином (Рис. 3а). В тесте с МТТ мы обнаружили снижение метаболической активности клеток при экспозиции с 5 мМ и 10 мМ метформина (Рис. 3б). Для дальнейших исследований была выбрана концентрация 2,5 мМ.

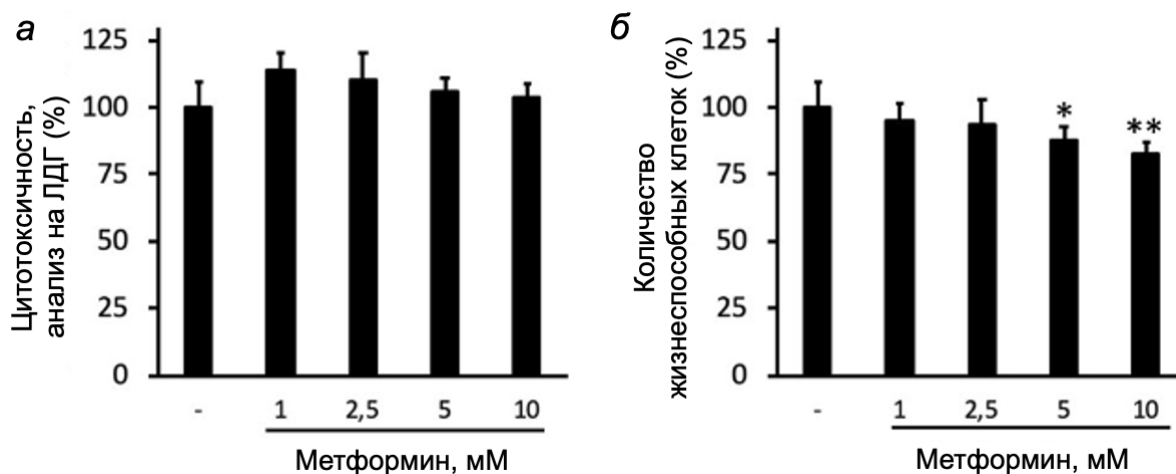


Рис. 3 Анализ жизнеспособности и токсичности клеток в астроцитах, обработанных метформином, методами LDH (а) и МТТ (б). Астроциты инкубировали с метформином 24 ч. Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA, данные представлены как средние \pm стандартное отклонение (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) по сравнению с нестимулированными клетками.

3.1.2. Изменение гликолиза и окислительного фосфорилирования астроцитов при адаптации клеток к высокой концентрации глюкозы.

Ранее изменения энергетического метаболизма астроцитов в гипергликемических моделях не были охарактеризованы. По классической схеме оценивали характеристики гликолиза (ECAR): базальный гликолиз, гликолитическую способность, негликолитическое закисление (Рис. 4а); и характеристики окислительного фосфорилирования (OCR): базальное дыхание, максимальное дыхание, дыхательную емкость и олигомицин-чувствительное потребление кислорода (Рис. 4б).

ECAR (Extracellular Acidification Rate) оценивают по скорости закисления внеклеточной среды. Основным источником такого закисления является лактат, образуемый в результате гликолиза (1 молекула глюкозы \rightarrow 2 молекулы лактата + 2H^+). Обычно, чем интенсивнее гликолиз, тем выше ECAR. Могут быть и другие источники закисления (любые процессы, выделяющие протоны (H^+), в том числе протонные помпы, глутаминолиз). Астроциты участвуют в глутамат-глутаминовом цикле [170], где глутамат, высвобождаемый нейронами, поглощается астроцитами и превращается в глутамин, который затем возвращается в нейроны, поэтому в этих клетках высокий уровень глутаминазы, катализирующей превращение глутамин в глутамат и аммиак. Эти соединения опосредованно могут снижать внеклеточный pH. Базальный гликолиз получают вычитанием негликолитического закисления из базального ECAR (Рис. 4). Наблюдаемый нами рост негликолитического закисления указывает на существование других источников кислот (глутамин, кетоны, помпы протонные). Такой рост часто ассоциирован с нарушениями функций митохондрий, хотя считается, что увеличение дыхательной емкости указывает на увеличение стрессоустойчивости. Можем предположить, что увеличивается активность энергетического метаболизма в астроцитах.

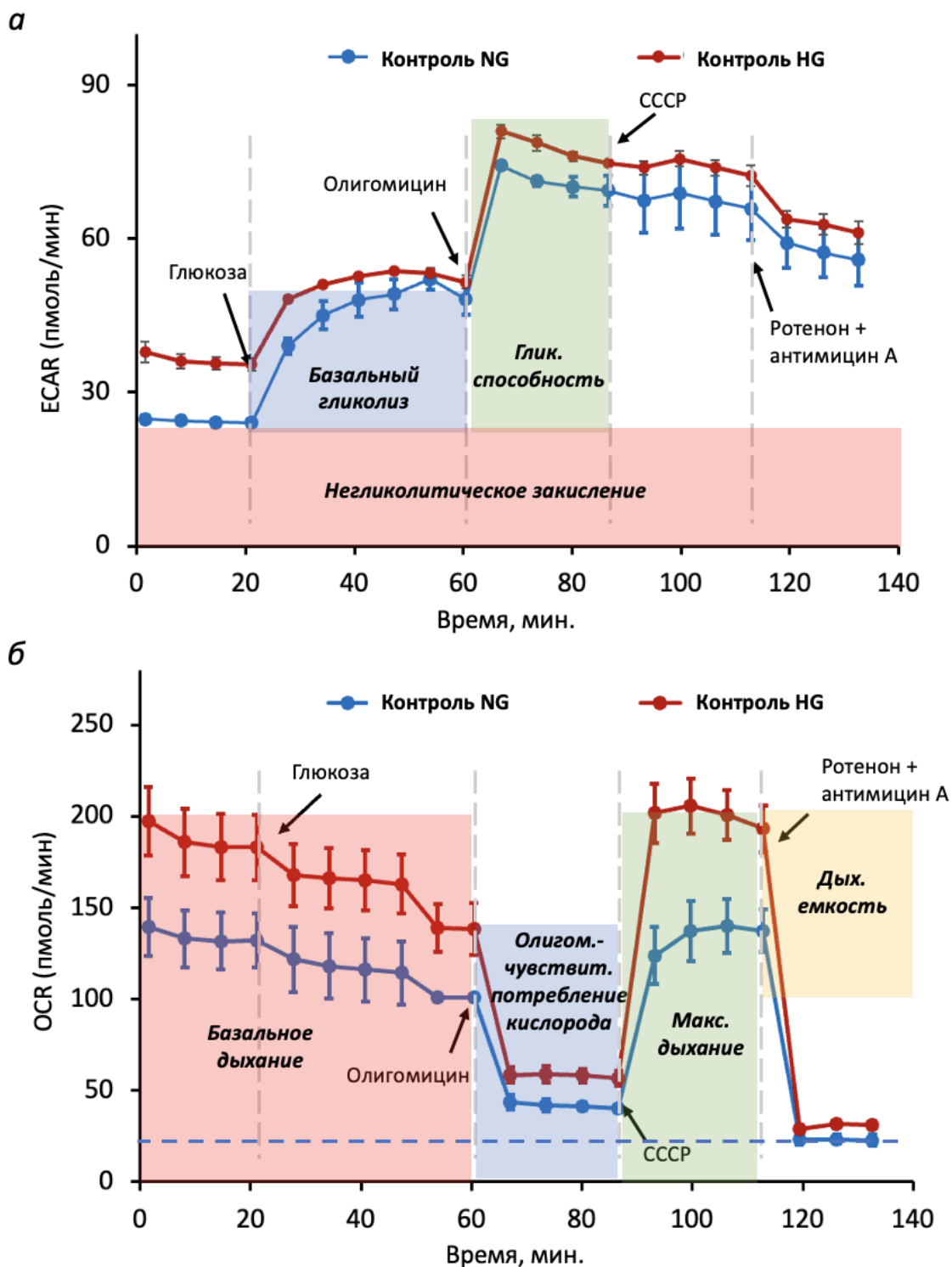


Рис. 4. Зависимость параметров гликолиза (ECAR) (а) и окислительного фосфорилирования (OCR) (б) астроцитов при изменении концентрации глюкозы во внеклеточной среде. В качестве модуляторов митохондриальной функции добавляли субстрат гликолиза (глюкоза, 10 мМ), ингибитор окислительного фосфорилирования (олигомицин, 4,5 мкМ), разобщитель (СССР, 10 мкМ) и ингибитор дыхательной цепи (ротенон 2,5, мкМ + антимицин А, 4 мкМ).

Изменения наблюдаемых параметров приведены на Рис. 4, детали статистической обработки для параметров гликолиза на Рис. 6 и для параметров окислительного фосфорилирования Рис. 7. При сравнении энергетического метаболизма клеток, культивируемых при разных концентрациях глюкозы, было показано, что при гипергликемии снижается базальный гликолиз (Рис. 6б), увеличивается негликолитическое закисление (Рис. 6г) и увеличивается дыхательная емкость митохондрий (Рис. 7д) (рассчитанная как разница между емкостью разобщенного дыхания и базальным дыханием). Следует отметить, что при 48 ч инкубации с глюкозой клетки адаптируются к данным условиям и их изменения в ответах на различные стимулы будут отражать изменения “стационарного” состояния [171–173]. Такая модель позволяет через сравнение ответов на стимулы и обработки сопоставлять изменения взаимодействий внутриклеточных механизмов.

3.1.3. Изменение энергетического метаболизма при активации TLR бактериальной (LPS) и вирусной (PIC) природы у астроцитов, культивируемых при нормальной и высокой глюкозе.

Для ответа на вопрос, как адаптация клеток к разной глюкозе и соответствующие взаимосвязи энергетической системы и системы врожденного иммунитета будут меняться при стимуляции агентами вирусной или бактериальной природы, мы сравнивали LPS, PIC с ответами нестимулированных клеток. Сравнивали ответы астроцитов, культивируемых в нормальной (Рис. 5а) и высокой (Рис. 5б) концентрации глюкозы.

Для нормальной глюкозы (Рис. 5а) LPS не влияет на параметры гликолиза (Рис. 6) и окислительного фосфорилирования (Рис. 7), стимуляция PIC приводит к уменьшению параметра максимального дыхания (Рис. 9в), но не проявляется в изменении параметров гликолиза (Рис. 8). При высокой глюкозе ни LPS, ни PIC не оказывают влияние на энергетический метаболизм.

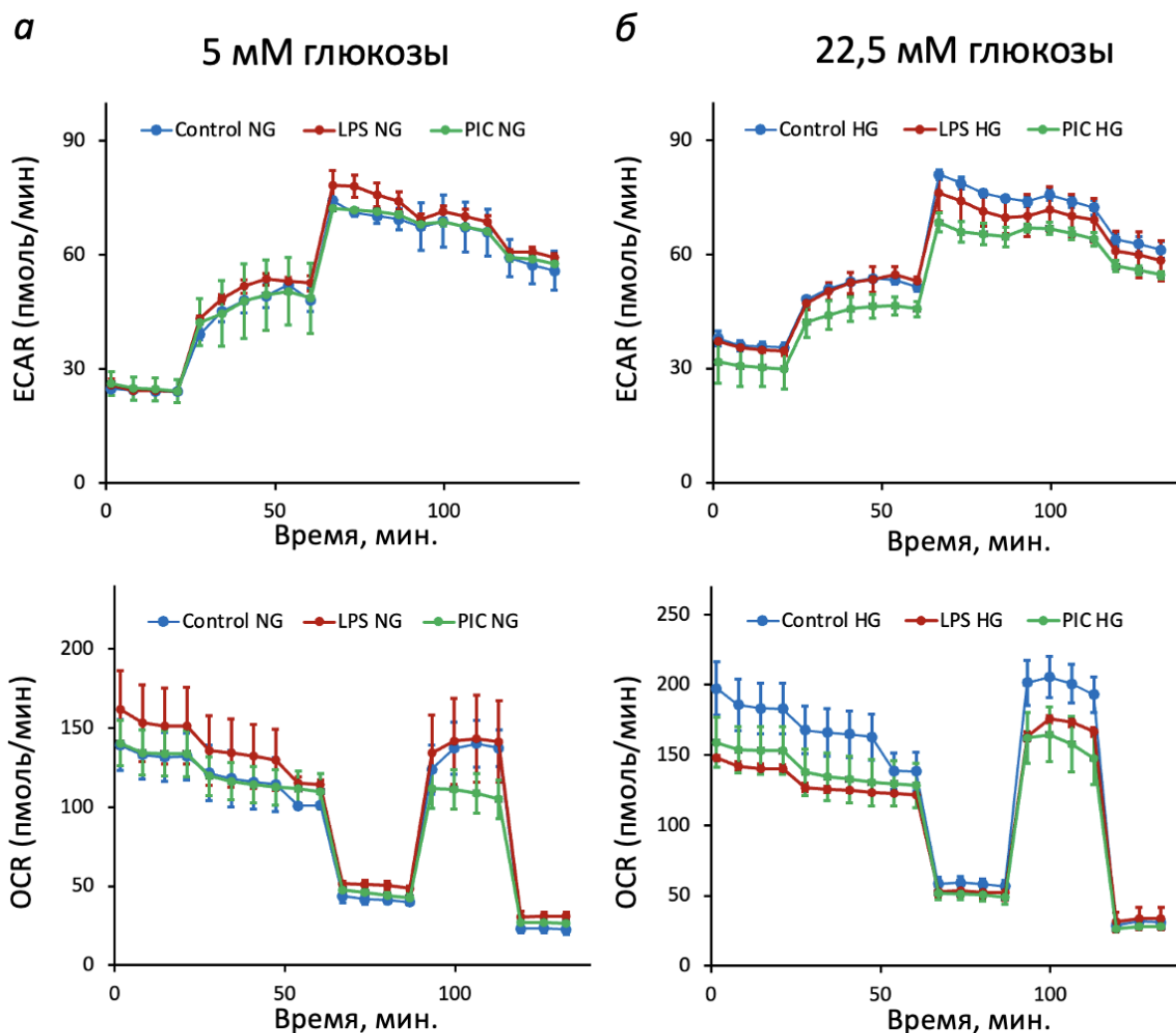


Рис. 5. Зависимость параметров гликолиза (ЕСАР) и окислительного фосфорилирования (OCR) астроцитов, культивируемых в условиях нормогликемии (а) и гипергликемии (б). Астроциты культивировали в среде с нормальной (5 мМ) и повышенной (22,5 мМ) концентрацией глюкозы, после чего стимулировали LPS (100 нг/мл, 4 часа) или PIC (10 мкг/мл, 6 ч). В качестве модуляторов митохондриальной функции добавляли субстрат гликолиза (глюкоза, 10 мМ), ингибитора окислительного фосфорилирования (олигомицин, 4,5 мкМ), разбщителя (СССР, 10 мкМ) и ингибиторов дыхательной цепи (ротенон 2,5, мкМ + антимицин А, 4 мкМ).

3.1.4 Анализ влияния метформина на энергетический метаболизм астроцитов, культивируемых при различной концентрации глюкозы при стимуляции TLR3 и TLR4 рецепторов.

Согласно литературным данным, введение метформина в условиях *in vivo* сопровождается снижением уровня АТФ в гиппокампе, а в культуре астроцитов *in vitro* подавляет окислительное фосфорилирование [174]. В нашей работе данный ингибитор был применен в качестве дополнительного

воздействия, модулирующего энергетический обмен, с целью изучения взаимосвязи между системами врожденного иммунитета и клеточного метаболизма. Для этого проводили сравнение клеток, предварительно культивированных в течение 48 часов в среде с концентрацией глюкозы 5 мМ (нормогликемия, NG) или 22,5 мМ (гипергликемия, HG). Метформин (2,5 мМ) добавляли за 24 ч до стимуляции PIC (10 мкг/мл, 6 ч) или LPS (100 нг/мл, 4ч). В данной серии экспериментов сравнивали необработанные клетки; клетки, обработанные метформином; клетки, обработанные TLR стимулом; клетки, обработанные стимулом и метформином.

3.1.4.1. Влияние метформина на ECAR в LPS-стимулированных астроцитах

На Рисунке 6 представлены результаты анализа скорости внеклеточного закисления в культурах астроцитов, подвергнутых воздействию метформина с последующей LPS-стимуляцией и без нее. Динамика изменения ECAR в зависимости от последовательного введения соединений отражена на Рис. 6а: измерения проводились в исходных условиях (в отсутствие глюкозы в реакционной среде), а также после инъекции D-глюкозы, олигомицина, СССР и, наконец, смеси ротенона с антимицином А. Каждая точка на графике представляет собой усредненный результат, полученный по трем повторностям (лункам) для каждой из сравниваемых экспериментальных групп (Рис. 4а).

Обработка метформином приводила к росту базального гликолиза, причем данное явление наблюдалось вне зависимости от того, в условиях нормо- или гипергликемии культивировались клетки (Рис. 6б). При этом такие параметры, как гликолитическая способность (Рис. 6в) и уровень негликолитического закисления (Рис. 6г), не претерпевали значимых изменений под действием метформина. Последующая стимуляция LPS клеток, уже обработанных метформином, не оказывала влияния на показатели базального гликолиза (Рис. 6б).

Ещё раз отметим, что при адаптации астроцитов к разному уровню глюкозы, для всех обработок не наблюдалось значимых изменений в гликолитической способности энергетической системы (Рис 4в). Это может быть связано с особой ролью гликолиза у астроцитов, по сравнению с другими клетками.

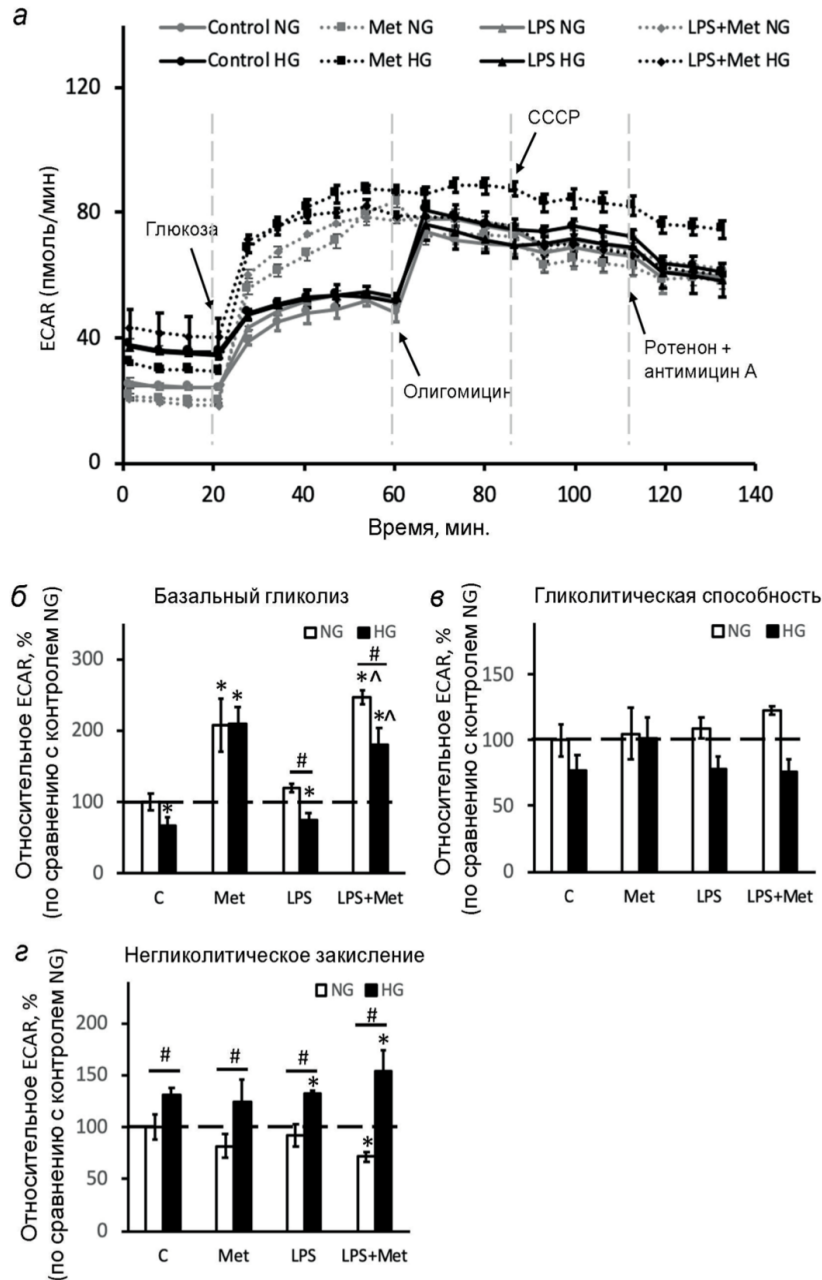


Рис. 6. Влияние стимуляции LPS и предварительной обработки метформином на ECAR в астроцитах, культивируемых в 22,5 мМ (HG) или 5 мМ (NG) глюкозы. *a* – Изменение скорости внеклеточного закисления культурами астроцитов при добавлении субстрата гликолиза (глюкоза), ингибитора окислительного фосфорилирования (олигомицин), разбщителя (CCCP) и ингибиторов дыхательной цепи (ротенон + антимицин А). На диаграммах представлены рассчитываемые по ECAR базальный гликолиз (*б*), гликолитическая способность (*в*) и негликолитическое закисление (*г*). Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение среднего из трех независимых экспериментов, за 100% взято значение ECAR в нестимулированных клетках NG. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками NG; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичные обработки; ^ $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками, культивируемыми в среде с соответствующей концентрацией глюкозы.

3.1.4.2. Влияние метформина на OCR в LPS-стимулированных астроцитах.

Технология XF позволяет одновременно с гликолизом оценивать и функциональную активность митохондрий. Метформин является ингибитором митохондриального комплекса I, он накапливается в митохондриях и обратимо ингибирует дыхательную цепь (NADH:убихинон оксидоредуктазу, комплекс I), что снижает окислительное фосфорилирование (ОФ) и выработку АТФ [175]. Действительно, наблюдаем значительное снижение определяемых параметров процессов митохондриального дыхания: базального дыхания (Рис. 7б), максимального дыхания (Рис. 7в), олигомицин-чувствительного потребления кислорода (Рис. 7г). Интересно, что наблюдается разница в действии метформина на дыхательную емкость системы, а именно, рост этого параметра при клеточной гипергликемии (Рис. 7д). Добавление LPS не влияет на эффекты метформина. Все эти данные также указывают на изменения при клеточной гипергликемии во взаимосвязи процессов энергетического метаболизма, не только количественные, но и качественные.

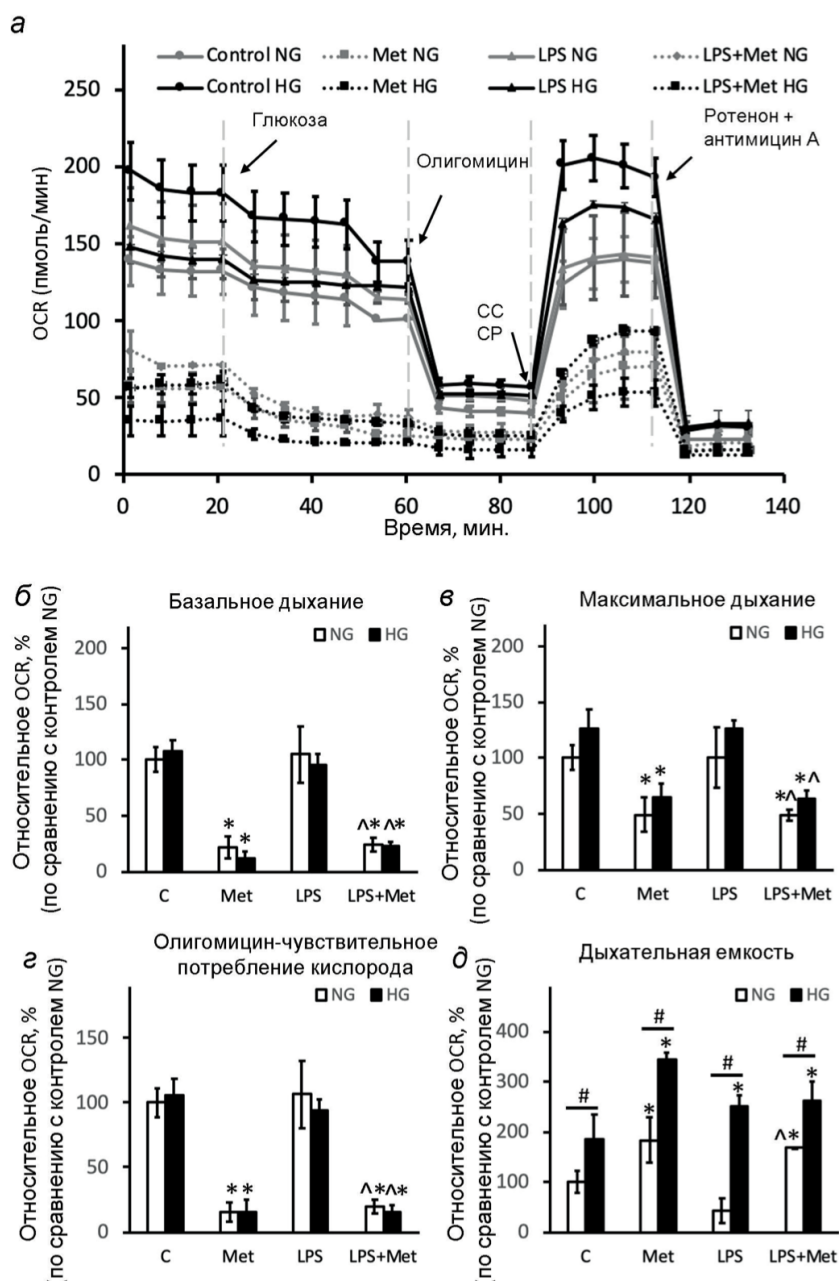


Рис. 7. Влияние стимуляции LPS и предварительной обработки метформином на OCR в астроцитах, культивируемых в 22,5 мМ (HG) или 5 мМ (NG) глюкозы. Влияние LPS на митохондриальные функции астроцитов, оценённые с помощью анализатора Seahorse XFp. *а* – Скорость потребления кислорода культурами астроцитов; Расчётные значения параметров дыхания астроцитов: базальное дыхание (*б*), максимальное стимулированное дыхание (*в*), олигомицин-чувствительное потребление кислорода (*г*), дыхательная емкость (*д*). Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение среднего из трех независимых экспериментов, за 100% взято значение OCR в нестимулированных клетках, культивируемых в среде с NG. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками, культивируемыми в среде с NG; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичные обработки; ^ $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками, культивируемыми в среде с соответствующей концентрацией глюкозы.

3.1.4.3. Влияние метформина на ECAR в P1C-стимулированных астроцитах

Значения ECAR представлены на Рисунке 8. Как уже упоминалось, в наивных клетках, культивируемых в условиях клеточной гипергликемии, снижены уровни базального гликолиза и гликолитической емкости (Рис. 8б, в), повышено негликолитическое закисление (Рис. 8г). Эти параметры не изменялись при стимуляции P1C (Рис. 8б-г). Негликолитическое окисление различается для клеток, адаптированных к различным концентрациям глюкозы, и предварительная обработка метформином усиливала это различие (Рис. 8г).

При добавлении P1C сохраняется активирующее действие метформина на базальный гликолиз (Рис. 8б), гликолитическая емкость не изменялась при всех изучаемых обработках (Рис. 8в). Опять же, сохраняется разница в действии метформина на клетки, культивируемые в нормальных и гипергликемических условиях, и при активации P1C (Рис. 8г). Это предполагает независимое от стимула действие метформина на изучаемые параметры гликолиза.

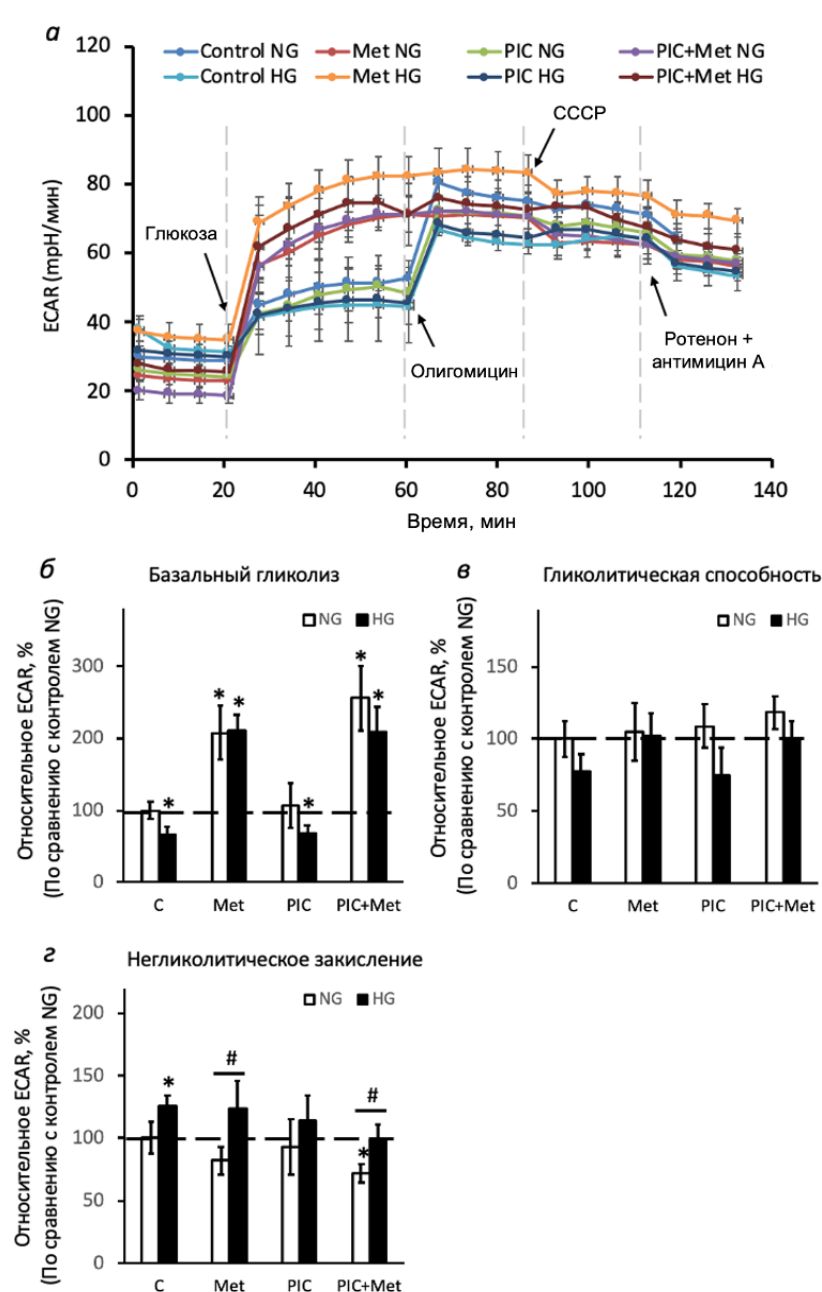


Рис. 8. Влияние стимуляции PIC и предварительной обработки метформином на ECAR в астроцитах, культивируемых в 22,5 мМ (HG) или 5 мМ (NG) глюкозы. Скорость внеклеточного закисления (ECAR) определяли в разные моменты времени после предварительной обработки метформином (2,5 мМ, 24 ч) и poly(I:C) (PIC, 10 мкг/мл, 6 ч). *а* – изменение скорости внеклеточного закисления в культурах астроцитов при добавлении субстрата гликолиза (глюкозы), ингибитора окислительного фосфорилирования (олигомицина), разобщителя (CCCP) и ингибиторов дыхательной цепи (ротенон + антимицин А). На диаграммах показаны базальный гликолиз (*б*), гликолитическая емкость (*в*) и негликолитическое закисление (*з*), рассчитанные по кривым ECAR. Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками, культивируемыми в среде NG; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичную обработку.

3.1.4.4. Влияние метформина на OCR в P1C-стимулированных астроцитах.

На Рисунке 9 представлены данные OCR проведенной серии экспериментов. Как уже обсуждалось, при культивировании астроцитов в условиях гипергликемии основные параметры не меняются (Рис. 9б-г), только дыхательная емкость увеличивается (Рис. 9д). Соответственно, метформин снижает базальное дыхание (Рис. 9б), скорость максимального дыхания (Рис. 9в) и олигомицин-чувствительное дыхание (Рис. 9г) независимо от адаптации к глюкозе и увеличивает дыхательную емкость, причем сильнее при гипергликемии (Рис. 9д). Эти эффекты метформина не изменялись при стимуляции клеток P1C (Рис. 9б-г). Возможно, из-за отсутствия детектируемого влияния P1C на регистрируемое митохондриальное дыхание, поскольку влияние P1C проявляется только для параметра максимальное дыхание (Рис. 9в). В целом, наблюдается независимость проявления действия метформина и P1C на параметры OCR.

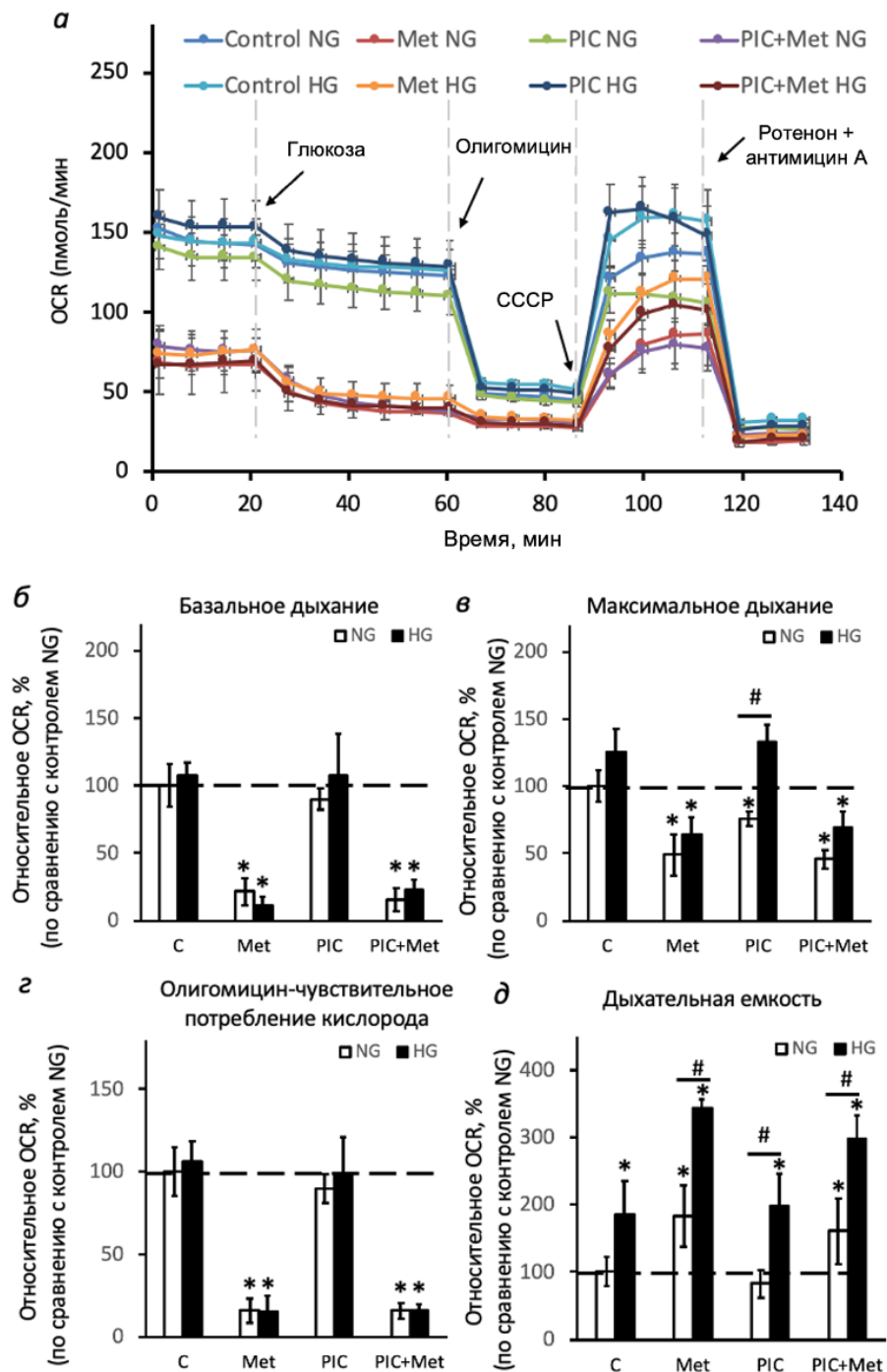


Рис. 9. Влияние стимуляции PIC и предварительной обработки метформином на OCR в астроцитах, культивируемых в 22,5 мМ (HG) или 5 мМ (NG) глюкозы. OCR астроцитов определяли в разные моменты времени после предварительной обработки метформином (2,5 мМ, 24 ч) и poly(I:C) (PIC, 10 мкг/мл, 6 ч). (а) Скорость потребления кислорода культурами астроцитов; расчетные значения параметров дыхания астроцитов: базальное дыхание (б), максимальное стимулированное дыхание (в), поглощение кислорода, чувствительное к олигомицину (г), дыхательная способность (д). Значения представляют собой среднее \pm SD из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками, культивируемыми в среде NG; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичную обработку.

3.1.5. Обсуждение изменений энергетического метаболизма в проведенных экспериментах

Энергетический метаболизм в астроцитах является важным компонентом, выполняющим роль не только в поддержании функционала клеток, но и их взаимодействия с нейронами и остальными клетками нервной системы. Аналогично и их функция при ответе системы врожденного иммунитета на провоспалительные стимулы и роль астроцитов в этих процессах в ЦНС. Этим может объясняться непрямая связь между двумя системами (метаболизма и TLR-сигналинга). Некоторой “забуференности” ответов.

Мы не наблюдали значительных изменений OCR и ECAR в PIC-стимулированных астроцитах. Это отличает астроциты от других типов клеток, в которых стимуляция TLR3 значительно изменяет эти метаболические параметры, а именно пигментный эпителий сетчатки [176], макрофаги [177], дендритные клетки человека подтипа cDC1 [178]. Астроциты участвуют в воспалительных ответах нервной системы, а также в метаболизме глюкозы, включая её хранение в форме гликогена и поступления к нейронам в форме лактата. Сигнальная система TLR и система энергетического метаболизма в значительной степени могут быть независимы от друга. На это указывают и данные об эффекте метформина. Мы показали, что метформин снижает чувствительное к олигомицину поглощение кислорода и увеличивает базальный ECAR, причем оба эффекта не зависят от стимулов (LPS, PIC) и адаптации к глюкозе. Уникальная двойная роль астроцитов как основных участников процессов нейровоспаления и энергетического гомеостаза может привести к появлению механизмов, разделяющих прямую взаимосвязь этих двух процессов.

Метформин накапливается в митохондриях и обратимо ингибирует дыхательную цепь (NADH:убихинон оксидоредуктазу, комплекс I). Это ключевой эффект, запускающий большинство последующих изменений. Ингибирование комплекса I снижает окислительное фосфорилирование (ОФ) и выработку АТФ. Снижение АТФ активирует АМР-активируемую протеинкиназу (АМПК) – главный клеточный сенсор энергии. Активированная АМПК способствует активации ключевых ферментов гликолиза (например, фосфофруктокиназы-2 (PFK-2), что повышает уровень фруктозо-2,6-бисфосфата – мощного активатора

фосфофруктокиназы-1 (ПФК-1), главного регуляторного фермента гликолиза [179]). Клетка увеличивает распад глюкозы, так как производство АТФ через ОФ ограничено. В подтверждение этого можно отметить снижение окислительного фосфорилирования (базальное дыхание, максимальное дыхание, олигомицин-чувствительное потребление кислорода). Как следствие, возрастают процессы гликолиза (базальный гликолиз).

Мы наблюдали, что гликолитическая способность астроцитов не зависела от каких-либо экспериментальных воздействий – будь то изменение концентрации глюкозы в среде, стимуляция LPS, обработка метформином или их комбинация. В то же время во всех экспериментальных группах регистрировалось увеличение негликолитического закисления в условиях гипергликемии. Метформин проявлял свое действие исключительно в отношении базального гликолиза, причем этот эффект наблюдался вне зависимости от гликемического фона, на котором проводилась активация клеток. Параллельно с этим препарат подавлял базальное дыхание митохондрий и окислительное фосфорилирование, что полностью согласуется с его известной функцией ингибитора первого комплекса дыхательной цепи. Ранее в исследовании Li и соавторов [174] на культуре мышинных астроцитов уже демонстрировалось, что миллимолярные концентрации метформина снижают параметры окислительного фосфорилирования, регистрируемые методом Seahorse. Другие авторы также отмечали, что под действием метформина в астроцитах возрастает потребление глюкозы и продукция лактата при одновременном блокировании цикла трикарбоновых кислот и митохондриального дыхания [180].

Зарегистрированный нами эффект – усиление базального гликолиза на фоне подавления базального и максимального митохондриального дыхания, а также окислительного фосфорилирования – свидетельствует о метаболическом перепрограммировании астроцитов. Это переключение биоэнергетического профиля клеток с преобладания аэробного дыхания на преимущественно гликолитический тип впервые было описано Варбургом для опухолевых клеток, однако в настоящее время подобный сдвиг энергетического обмена выявлен для многих типов клеток, включая клетки головного мозга [181]. В основе такого переключения лежат разнообразные механизмы: активация транспорта глюкозы (например, за счет повышения экспрессии транспортера GLUT1) и ключевых ферментов гликолиза, таких

как гексокиназа. Важную регуляторную роль в одновременном снижении митохондриального дыхания и усилении гликолитического потока играет пируватдегидрогеназный комплекс, направляющий пируват (конечный продукт гликолиза) в митохондрии для дальнейшего окисления [182]; ингибирование этого комплекса закономерно ведет к подавлению дыхания и активации гликолиза. Для раковых клеток уже была показана способность метформина индуцировать сдвиг в сторону гликолиза, в частности через стимуляцию экспрессии GLUT1 [183]. Сходные изменения известны и для лимфоцитов, где усиление утилизации глюкозы сопряжено с инсулиновым сигналингом и повышением уровня GLUT1 [184]. В настоящей работе мы впервые демонстрируем Варбург-подобный эффект в астроцитах, что может иметь фундаментальное значение для функционирования мозга. Одним из ключевых энергетических субстратов для нейронов служит лактат, основными продуцентами которого являются астроциты: они выделяют его во внеклеточное пространство, откуда он захватывается соседними нейронами [185]. Таким образом, интенсификация гликолиза способна усиливать трофическую поддержку нейронов со стороны астроцитов.

Итак, мы показали, что острая активация TLR3 или TLR4 не влияет на параметры энергетического метаболизма (и в NG и в HG гипергликемии), а обработка метформином влияет сильно, как сама по себе, так и на фоне активации TLR лигандами. Поэтому на следующем этапе мы характеризовали как меняется воспаление на молекулярном уровне при обработке метформином и стимуляции TLR.

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

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 [212,229].

В сериях экспериментов по характеристике изменения энергетического метаболизма астроцитов в зависимости от их адаптации к разным концентрациям глюкозы и активации TLR бактериальной и вирусной природы было показано модулирующее действие метформина на энергетический метаболизм в этих условиях. Наблюдалось относительно

слабое воздействие стимулов TLR на энергетический метаболизм. Поэтому мы использовали все три агента для характеристики их воздействия на синтез астроцитами цитокинов и других маркеров воспалительного процесса, однако метформин был в фокусе исследования.

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-синтаза) и противовоспалительный интерлейкин 10 (*IL-10*). Эти маркеры являются классическими для оценки клеточных воспалительных ответов и характеристики состояния системы врожденного иммунитета.

Как и в предыдущей серии экспериментов, исследование проводили на культурах астроцитов, культивируемых 48 ч при 5 мМ (NG) и 22,5 мМ (HG) глюкозы перед добавлением стимула. Метформин (2,5 мМ) добавляли за 24 часа до добавления TLR стимулов, уровень маркеров воспаления оценивали через 4 ч при стимуляции LPS (100 нг/мл), через 6 ч при стимуляции PIC (10 мкг/мл).

3.2.1. Влияние метформина на LPS-стимулированный синтез цитокинов в астроцитах, культивируемых при разных концентрациях глюкозы.

Ранее было показано, что LPS оказывает стимулирующее действие на астроциты посредством активации TLR4, что ведет к индукции экспрессии провоспалительных цитокинов и продукции оксилипинов [74,90]. С целью изучения модулирующего влияния метформина нами был проведен анализ уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-6 в ответ на стимуляцию LPS (Рис. 10а-в), а также оценено высвобождение белка IL-6 во внеклеточную среду (Рис. 10г).

В ходе исследования было обнаружено, что предварительное культивирование клеток в условиях повышенной концентрации глюкозы (HG) модифицирует их реакцию на LPS, что выражается в усилении экспрессии генов TNF α , IL-6 и IL-1 β . Сам по себе метформин не оказывал значимого влияния на базальный уровень экспрессии исследуемых цитокинов, однако его присутствие приводило к подавлению LPS-индуцированной экспрессии IL-1 β , причем этот эффект наблюдался вне зависимости от концентрации глюкозы в среде культивирования. Аналогичная картина была зафиксирована и на уровне секреции IL-6: обработка метформином снижала количество белка, высвобождаемого

клетками в ответ на LPS, также независимо от гликемических условий (Рис. 8з).

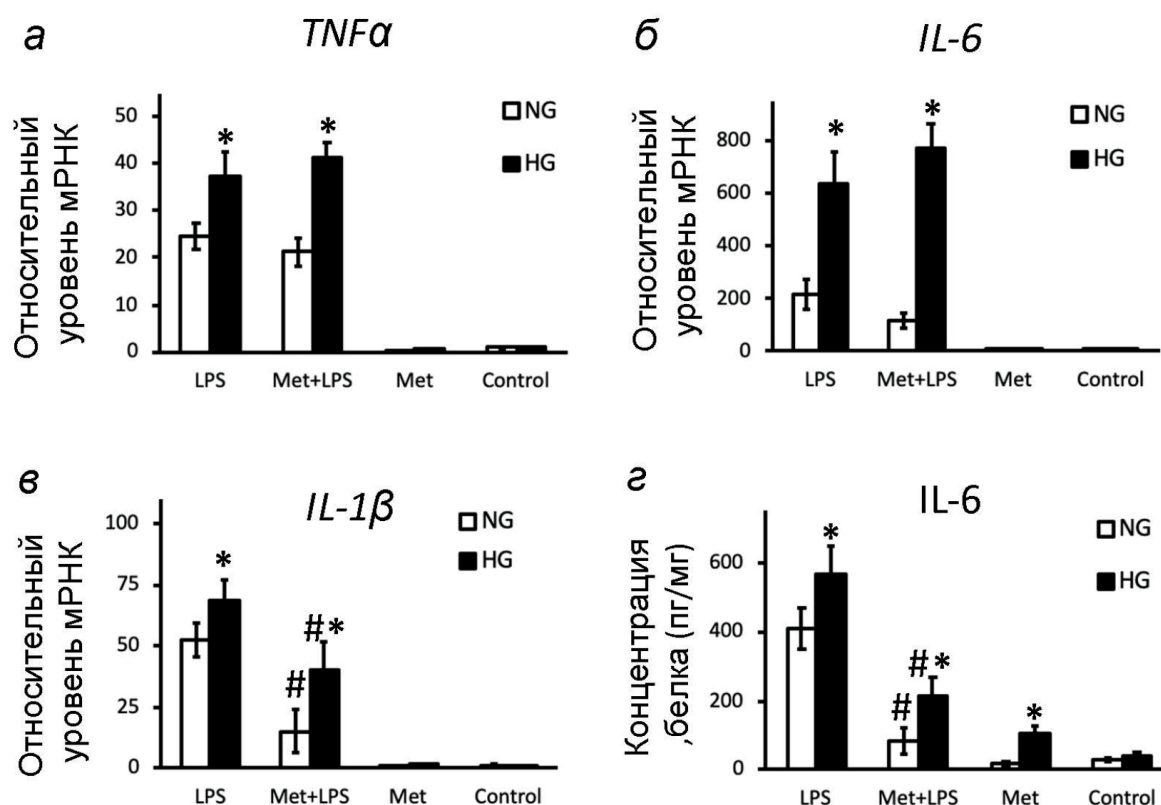


Рис. 10. Влияние метформина на LPS-стимулированную экспрессию генов цитокинов ($TNF\alpha$ (а), $IL-1\beta$ (б), $IL-6$ (в)). К астроцитам добавляли метформин (Met, 2,5 мМ) на 24 ч, затем стимулировали LPS (100 нг/мл) 4 ч. Экспрессию генов определяли методом qPCR, значения были нормализованы к уровням мРНК β -актина, за единицу принята экспрессия в контрольных клетках. Концентрацию IL-6 белка (г) определяли методом ИФА, данные представлены в виде пг/мг белка. Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение среднего из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с клетками, культивируемыми в среде с NG; # $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

На моделях *in vivo* и *in vitro* при воздействии высокой концентрации глюкозы наблюдалось нарушение функций астроцитов на клеточном уровне [100,171–173]. Различные клеточные модели гипергликемии показали, что астроциты приобретают провоспалительные свойства при повышении уровня глюкозы и в дальнейшем изменяют свой ответ на провоспалительные стимулы [14,100,186]. Сдвиг клеточного ответа в сторону увеличения экспрессии и высвобождения провоспалительных цитокинов был отмечен, когда клетки, выращенные при высоком уровне глюкозы в течении 48 часов, стимулировали LPS [107].

Согласно литературным данным, метформин проявляет противовоспалительные свойства: предобработка клеток метформином способна подавлять экспрессию IL-6 в макрофагах, активированных LPS [187], а также снижать продукцию IL-1 β в клетках микроглиальной линии BV2 [188]. Примечательно, что в нашей экспериментальной системе, как и в упомянутом исследовании на микроглии [188], не было зафиксировано влияния метформина на уровень TNF α . На основании полученных данных можно предположить, что противовоспалительное действие метформина носит сходный характер в различных клеточных типах и не модулируется концентрацией глюкозы в среде, однако, по-видимому, реализуется через множественные сигнальные мишени. Это может обуславливать различия в эффектах препарата в отношении отдельных цитокинов, связанные с особенностями регуляции их экспрессии в разных клетках.

3.2.2. Влияние метформина на уровень маркеров воспаления, стимулированных PIS, в астроцитах, культивируемых при разных концентрациях глюкозы.

В рамках данной серии экспериментов проводилась оценка экспрессии генов провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-6, IL-1 β), провоспалительного фермента iNOS и противовоспалительного цитокина IL-10 (Рис. 11*a-e*). Дополнительно для IL-6 было проанализировано его высвобождение во внеклеточную среду на уровне белка (Рис. 11*e*).

Стимуляция PIS приводила к повышению экспрессии всех исследованных маркеров, однако характер ответа для некоторых из них зависел от гликемических условий предварительного культивирования. В то время как уровни экспрессии TNF α (Рис. 11*a*) и IL-6 (Рис. 11*d*) не зависели от концентрации глюкозы в среде, адаптация клеток к гипергликемии сопровождалась усилением экспрессии iNOS (Рис. 11*b*) и, напротив, снижением экспрессии IL-1 β и IL-10 (Рис. 11*b, z*). Полученные данные свидетельствуют о том, что длительное культивирование в условиях повышенного содержания глюкозы модифицирует воспалительный ответ астроцитов на стимуляцию PIS, изменяя баланс между провоспалительными и противовоспалительными медиаторами.

Метформин оказывал противовоспалительное действие при стимуляции PIS, а его влияние на различные маркеры воспаления зависело от концентрации глюкозы в среде культивирования клеток. В условиях NG метформин подавлял экспрессию TNF α (Рис 11*a*) и высвобождение IL-6

(Рис 11e), в то время как экспрессия IL-1 β (Рис 11б) снижалась как при обработке NG, так и HG.

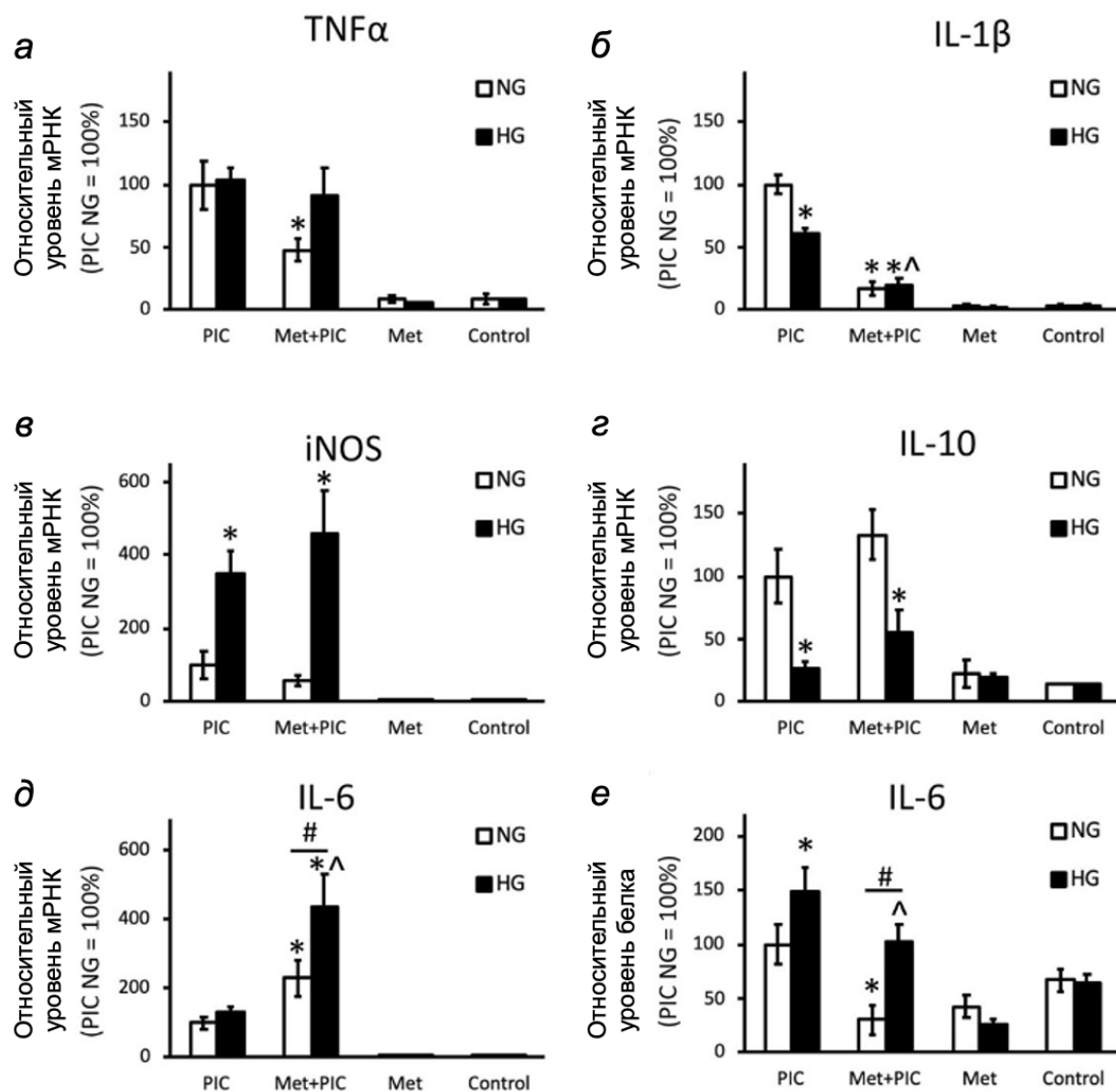


Рис. 11. Сравнение уровней маркеров воспаления в астроцитах, культивированных в HG и NG и стимулированных PIC. К клеткам добавляли метформин (Met, 2,5 мМ) на 24 ч, затем стимулировали 6 ч с PIC (10 мкг/мл). а-д – уровни мРНК маркеров воспаления TNF α , IL-1 β , индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), IL-10, IL-6 определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (qPCR). Значения были нормализованы к уровню мРНК β -актина. е – высвобождение белка IL-6 измеряли методом ИФА в среде культивирования. Результаты выражены в % (экспрессия в клетках, обработанных PIC NG = 100%) Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение из трех независимых экспериментов. * p <0,05 по сравнению с PIC-стимулированными клетками NG, # p <0,05, ^ p <0,05 по сравнению с PIC-стимулированными клетками HG.

При стимуляции астроцитов PIC в условиях нормогликемии наблюдается характерный выраженный провоспалительный ответ, который проявляется в активации экспрессии генов, кодирующих ключевые маркеры воспаления, включая TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-6 и iNOS. Роль астроцитов в реакциях на вирусные инфекции и особенности TLR3-опосредованного иммунного ответа в этих клетках активно изучаются и были подробно охарактеризованы в ряде работ [189–191]. Полученные нами данные об увеличении экспрессии TNF α , IL-6, IL-1 β и iNOS в ответ на PIC согласуются с результатами, опубликованными ранее [107,189,190]. Интересно отметить, что мы наблюдали увеличение экспрессии IL-6 на уровне мРНК и снижение на уровне белка при стимуляции PIC после предварительной обработки метформином. Ранее были показаны такие же изменения при стимуляции LPS (Рис. 10), а также на макрофагах [192]. Об экспрессии IL-6 известно, что, когда экспрессия индуцируется на уровне мРНК, высвобождение белка может значительно запаздывать [193,194]. Это может объяснить наблюдаемые различия в эффекте IL-6 на уровне мРНК и белка.

Поскольку клеточные модели адаптации астроцитов к глюкозе стали привлекать внимание совсем недавно, трудно провести перекрестное сравнение полученных данных в соответствующей литературе. Ранее предлагаемые клеточные модели гипергликемии астроцитов различаются концентрацией глюкозы, временем обработки ею, а также стимулами (LPS, TNF α), но во всех моделях присуща повышенная экспрессия и высвобождение провоспалительных цитокинов [14,107,171]. Наши данные по 48-часовой модели гипергликемии показывают, что по сравнению с контролем ответ на PIC смещен в сторону снижения уровня экспрессии IL-1 β , IL-10, увеличения экспрессии iNOS и высвобождения IL-6. Стимуляция TNF α не зависит от адаптации к глюкозе. Таким образом, если рассматривать высвобождение цитокинов как строго регулируемый и сбалансированный процесс, интегрирующий множественные сигналы, то гипергликемия выступает в роли дестабилизирующего фактора, нарушающего этот тонкий регуляторный баланс.

Адаптация к глюкозе позволяет различать чувствительность клеток к стимуляции TLR3 и TLR4 агонистами. Адаптированные к HG клетки демонстрируют более высокий синтез провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-6, IL-1 β) при стимуляции TLR4. Известно, что TLR3 использует только TRIF-зависимый сигнальный путь, а TLR4 задействует как MyD88-зависимый, так и TRIF-зависимый сигнальные пути [195]. Наблюдаемая

разница в экспрессии цитокинов может отражать изменение этих путей во время адаптации к условиям клеточной гипергликемии. Данные по метформину также указывают на такую возможность, поскольку было показано, что он влияет на сигнальный путь TLR4/MyD88/NF-κB в остеобластах [196].

Как было показано (раздел 3.1), метформин приводит к значительному метаболическому перепрограммированию астроцитов. Метформин также способен модулировать экспрессию цитокинов как в стимулированных PIC, так и в LPS-стимулированных клетках с различной адаптацией к глюкозе. Однако эффекты метформина проявляются по-разному, в зависимости как от концентрации глюкозы, так и от активированного рецептора TLR.

Молекулярные мишени метформина остаются открытым вопросом для будущих исследований, хотя уже накоплены различные данные [197]. Наш подход с использованием моделей клеточной адаптации к глюкозе позволит в дальнейшем выявить эти молекулярные механизмы. Хотя в последнее время метформин уже находится в центре внимания клинических исследований как лечения нейродегенеративных заболеваний, результаты исследований *in vitro/in vivo* и ретроспективного анализа в настоящее время противоречивы [198]. Данные о характеристиках воспаления и уровне глюкозы могут потребоваться для анализа когорт пациентов.

Таким образом, характер внутриклеточной сигнализации, запускаемой TLR3 и TLR4 и ведущей к продукции цитокинов, модулируется метаболическим состоянием клеток. В частности, влияние метформина на клеточный ответ, индуцированный активацией TLR3, наблюдается для таких цитокинов, как IL-1β, IL-6 и TNFα. А для TLR4 только для IL-1β. Метформин снижает синтез провоспалительных цитокинов, что может характеризовать его противовоспалительное действие. Гипергликемия снижает противовоспалительные эффекты метформина.

3.2.3. Влияние метформина на TLR-стимулированное образование АФК.

Учитывая, что гипергликемия способна усиливать генерацию активных форм кислорода в глиальных клетках [14,199], а стимуляция липополисахаридом, в свою очередь, индуцирует их высвобождение [200], нами был проведен анализ уровня АФК в использованных экспериментальных условиях (Рис. 12). В ходе работы установлено, что: 1) концентрация глюкозы в среде культивирования не оказывает влияния на

базальный уровень АФК; 2) обработка метформином также не изменяет этот показатель; 3) LPS (Рис. 12а) и PIC (Рис. 12б) сопоставимо увеличивают примерно в 3 раза уровень АФК; 4) это увеличение не зависит от присутствия метформина. Можно также отметить, что наблюдается различие между действием LPS в высокой и низкой глюкозе, но оно не модулируется метформином и сохраняется в его присутствии (Рис. 12а).

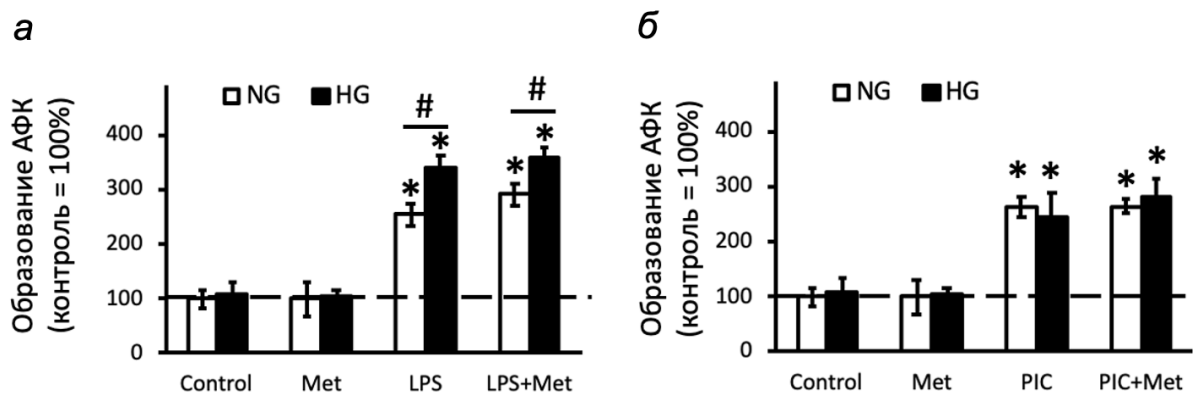


Рис. 12. Влияние метформина на продукцию АФК астроцитами, адаптированными к HG и NG при стимуляции LPS (а) и PIC (б). К клеткам добавляли метформин (Met, 2,5 мМ), стимулировали LPS (100 нг/мл) или PIC (10 мкг/мл) 24 ч. Уровень АФК измеряли с помощью реактива CellROX® Deep Red Reagent, как описано в разделе «Материалы и методы». Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение среднего из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичные обработки.

В исследованиях на кардиомиоцитах было продемонстрировано, что LPS индуцирует продукцию активных форм кислорода, причем этот эффект усиливается на фоне повышенного содержания глюкозы [200]. В нашей работе зафиксировано аналогичное увеличение выброса АФК астроцитами в ответ на стимуляцию LPS, при этом гипергликемия также способствовала более интенсивному высвобождению цитоплазматических АФК. Примечательно, что обработка метформином не влияла на TLR-опосредованную продукцию АФК вне зависимости от концентрации глюкозы в среде, что согласуется с ранее опубликованными результатами, полученными на макрофагах при LPS-стимуляции [201].

3.3. Изменение синтеза оксилипинов при воспалительном ответе клеток при стимуляции TLR4 (LPS) и TLR3 (PIC).

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 [212,229].

При изучении связи между энергетическим метаболизмом клеток и их реакцией на провоспалительные стимулы наименее исследованной областью является система метаболизма оксипинов. Наряду с белковыми маркерами, оксипины являются важным компонентом воспалительной реакции во всех клетках [50], включая астроциты [100].

Известно, что профиль оксипинов, продуцируемых астроцитами, может характеризоваться как провоспалительной, так и противовоспалительной направленностью, что определяется природой стимулирующего воздействия и концентрацией глюкозы в среде культивирования [74,100,202]. Образуются они из разных полиненасыщенных кислот при различных стимулах одновременно, поэтому результирующий физиологический эффект определяется профилем оксипинов (составом смеси).

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 олеоилэтаноламид (OEA);
- 3) циклооксигеназный (COX) путь – простагландины (PG), тромбоксан B₂ (TXB₂), 11-гидроксиэйкозатетраеновая кислота (11-HETE), производные арахидоновой кислоты (AA) и 13-гидроксидокозагексаеновая кислота (13-HDoHE, 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-HDoHE, производное DHA);
- 5) липоксигеназный (LOX) путь – гидроксидокозагексаеновые кислоты (4-/8-/11-/16-/17-HDoHEs, производные DHA), гидроксиэйкозатриеновая кислота (15-HETrE, производное дигомо-γ-линоленовой кислоты), 5-/8-/12-/15-HETE (производные AA), гидроксидокозагексаеновые кислоты (9-/13-HODE, производные LA).

Обработки клеток проводили в одних условиях с предыдущими экспериментами: сравнение двух культур астроцитов, культивируемых 48 ч при 5 мМ (NG) и 22,5 мМ (HG); метформин (2,5 мМ) добавляли за 24 часа до добавления TLR стимулов (LPS (100 нг/мл, 4 ч), PIC (10 мкг/мл, 6 ч).

Ранее был охарактеризован профиль оксипинов при обработке LPS клеток, адаптированных к разным концентрациям глюкозы в течение 12 дней [100]. Изменения профиля оксипинов в наших экспериментальных условиях не изучали. Профиль оксипинов при действии PIC и его зависимость от культивации клеток в разной концентрации глюкозы не исследовали.

Перед нами стояли вопросы:

- как меняется профиль оксипинов при 48-часовой адаптации клеток к разным концентрациям глюкозы и стимуляции LPS 4 ч (LPS NG vs LPS HG);
- как меняется профиль оксипинов при действии PIC 6 ч (PIC NG vs Control NG);
- зависит ли профиль оксипинов при активации TLR3 от адаптации клеток к повышенной концентрации глюкозы (PIC NG vs PIC HG);
- есть ли разница в профиле оксипинов LPS- и PIC-стимулированных астроцитов (LPS NG vs PIC NG; LPS HG vs PIC HG);
- зависит ли базальный синтез оксипинов от изменения энергетического метаболизма (Met vs control NG; Met vs control HG);
- как изменение энергетического метаболизма под действием метформина может влиять на синтез оксипинов при стимуляции TLR (LPS+met vs met NG; LPS+met vs met HG; PIC + met NG; PIC + met NG).

3.3.1. Зависимость синтеза оксипинов от обработки метформином в астроцитах, стимулированных LPS.

В настоящей серии экспериментов исследовалось воздействие метформина на продукцию оксипинов, индуцированную стимуляцией LPS. Совокупность данных по двадцати четырем анализируемым соединениям, включая оксипины и полиненасыщенные жирные кислоты, визуализирована в виде тепловой карты (Рис. 13а).

Установлено, что предварительное культивирование клеток в условиях гипергликемии (HG) приводит к снижению базального уровня высвобождения арахидоновой (AA) и эйкозапентаеновой (EPA) кислот,

тогда как стимуляция LPS сама по себе не оказывает влияния на секрецию этих жирных кислот. В среде с нормальной концентрацией глюкозы (NG) добавление метформина вызывает усиление высвобождения всех исследованных жирных кислот вне зависимости от того, подвергались ли клетки дополнительной LPS-стимуляции; при повышенном содержании глюкозы подобный эффект метформина не регистрируется. Что касается соединений, относящихся к классу эндоканнабиноидов, было обнаружено, что LPS стимулирует продукцию АЕА независимо от гликемического фона, и предобработка метформином нивелирует этот стимулирующий эффект. Уровень же ОЕА оставался стабильным во всех протестированных экспериментальных условиях (Рис. 13а).

При культивировании клеток в условиях гипергликемии и последующей стимуляции LPS наблюдается снижение секреции метаболитов, образующихся при участии циклооксигеназного пути из арахидоновой кислоты. К таким соединениям относятся 11-НЕТЕ, 6-keto-PGF1a, PGD2, TXB2 и PGE2. Добавление метформина подавляет LPS-индуцированный синтез СОХ-зависимых оксипинов, и этот эффект регистрируется вне зависимости от концентрации глюкозы (Рис. 13а).

В отношении оксипинов, продуцируемых через СYP/NE-путь, не было зафиксировано их активации под действием LPS, равно как и модулирующего влияния метформина на этот процесс, независимо от концентрации глюкозы в среде (Рис. 13а). Для группы LOX-зависимых метаболитов было обнаружено, что метформин усиливает образование производных докозагексаеновой кислоты, синтезируемых по данному ферментативному пути – 8-НДоНЕ, 13-НДоНЕ и 4-НДоНЕ, однако этот стимулирующий эффект проявлялся только в условиях нормогликемии.

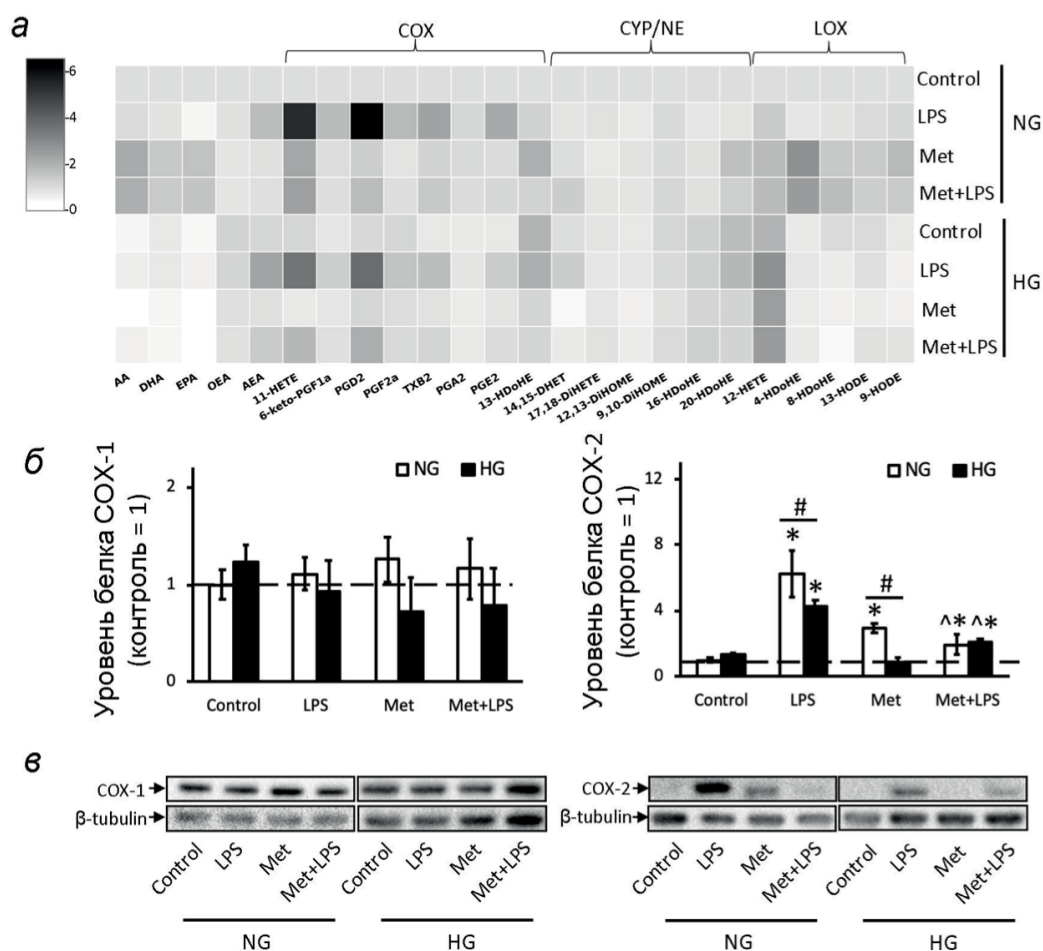


Рис. 13. Влияние метформина (Met) на высвобождение оксилипинов, ПНЖК и экспрессию ферментов COX-1 и COX-2 в астроцитах, стимулированных LPS. Первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 мМ), а затем стимулировали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 4 ч. Концентрации липидов в супернатантах измеряли с помощью сверхэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (UPLC-MS/MS). *а* – На тепловой карте показаны относительные количества каждого липидного медиатора по сравнению с контролем NG. На вертикальной оси отмечены клеточные стимулы, а на горизонтальной оси отложено относительное количество каждого липидного медиатора. Метаболиты разделены на: липоксигеназный (LOX), циклооксигеназный (COX) и цитохромный/неферментативный (CYP/NE) пути, участвующие в их синтезе. *б, в* – Уровни белка COX-1 и COX-2 оценивали с помощью иммуноблоттинга и нормализовали по отношению к уровню экспрессии β-тубулина; *б* – результаты денситометрии представлены по отношению к контрольным, нестимулированным клеткам NG; *в* – приведены репрезентативные изображения иммуноблоттинга для соответствующих белков. Значения представляют собой среднее ± стандартное отклонение из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичные обработки; ^ $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками, культивируемыми в среде с соответствующей концентрацией глюкозы.

Синтез простагландинов в клетках обеспечивается двумя изоформами циклооксигеназ – конститутивной СОХ-1 и индуцибельной СОХ-2. В ходе работы был проведен анализ изменения экспрессии этих ферментов в исследуемых условиях (Рис. 13б, в). Установлено, что в отсутствие стимуляции уровень экспрессии как СОХ-1, так и СОХ-2 не зависит от концентрации глюкозы в среде культивирования. При этом экспрессия СОХ-1 не меняется в ответ на какие-либо воздействия. Что касается СОХ-2, в условиях гипергликемии ее экспрессия оказалась ниже по сравнению с нормогликемией, а обработка метформинном приводила к снижению LPS-индуцированного повышения экспрессии этого фермента независимо от концентрации глюкозы. Примечательно, что в отсутствие стимула, но в условиях нормогликемии, метформин сам по себе оказывал активирующее действие на экспрессию СОХ-2. Полученные данные об изменении экспрессии СОХ-2 хорошо соотносятся с зарегистрированным снижением уровня тех оксипинов, которые образуются в результате циклооксигеназного метаболизма жирных кислот.

Известно, что при длительном (12-дневном) культивировании астроцитов в условиях нормо- или гипергликемии характер LPS-стимулированного синтеза оксипинов изменяется: в клетках, адаптированных к высокому содержанию глюкозы, наблюдается сдвиг профиля в сторону провоспалительных медиаторов за счет усиления продукции оксипинов циклооксигеназного пути, однако общий уровень индуцированного LPS синтеза при гипергликемии снижается [100]. Сравнение экспериментальных моделей 12-дневной [100] и 48-часовой культивации в среде с повышенной концентрацией глюкозы выявляет сходную направленность эффекта гипергликемии на образование СОХ-производных метаболитов, хотя при более длительной инкубации явления метаболической толерантности выражены значительно сильнее.

Различия между двумя моделями затрагивают характер высвобождения жирных кислот. Так, в 12-дневных культурах, выдержанных в условиях гипергликемии, регистрировалось увеличение секреции полиненасыщенных жирных кислот (АА, ДНА, ЕРА). В модели 2-дневной обработки, напротив, наблюдалось снижение выброса АА и ЕРА. Интересно, что метформин не изменял уровень высвобождения жирных кислот в условиях гипергликемии, однако в среде с нормальным содержанием глюкозы его добавление приводило к значительному росту их концентрации. Молекулярные механизмы этого явления пока не ясны,

однако совокупность имеющихся данных позволяет предположить, что регуляция синтеза оксипинов и процесса высвобождения полиненасыщенных жирных кислот во внеклеточное пространство осуществляется независимо, что уже высказывалось в качестве гипотезы ранее [100].

Экспрессия COX-2 коррелировала со снижением продукции оксипинов циклооксигеназного пути, причём метформин подавлял синтез этих соединений. Среди исследованных оксипинов выделялся анандамид (AEA): его LPS-индуцированный синтез возрастал в условиях гипергликемии. Роль анандамида в литературе освещена слабо: с одной стороны, на модели диабета у крыс он проявлял противовоспалительные свойства [203], с другой – при синдроме поликистозных яичников его уровень в крови служил маркером заболевания, а метформин снижал как концентрацию AEA, так и тяжесть симптомов [204]. В нашей системе метформин также ингибировал синтез AEA, что согласуется с последними данными.

3.3.2. Влияние стимуляции РС на профили оксипинов в астроцитах, адаптированных к высоким или нормальным концентрациям глюкозы.

Мы оценили изменения в профилях оксипинов, определяемых во внеклеточной среде, после обработки клеток РС и метформином (Рис. 14).

Данные по 24 анализируемым оксипинам и полиненасыщенным жирным кислотам представлены в виде тепловой карты (Рис. 14a).

Культивирование клеток в среде NG снижало базальные уровни AA и EAA (Рис. 14a). РС не стимулировал высвобождение кислот в этих экспериментальных условиях. Предварительная обработка метформином усиливала высвобождение ПНЖК во внеклеточную среду, но только для NG-адаптированных клеток. Более того, этот эффект был еще более выражен в присутствии РС. Таким образом, в моделях NG и HG существует принципиальное различие в группе полиненасыщенных жирных кислот в чувствительности клеток к метформину.

По группе эндоканнабиноидов: РС стимулировал синтез AEA независимо от концентрации глюкозы, а метформин снижал этот эффект; уровень OEA во внеклеточной среде был немного повышен в модели HG, но не проявлял чувствительности к обработке метформином (Рис. 14a).

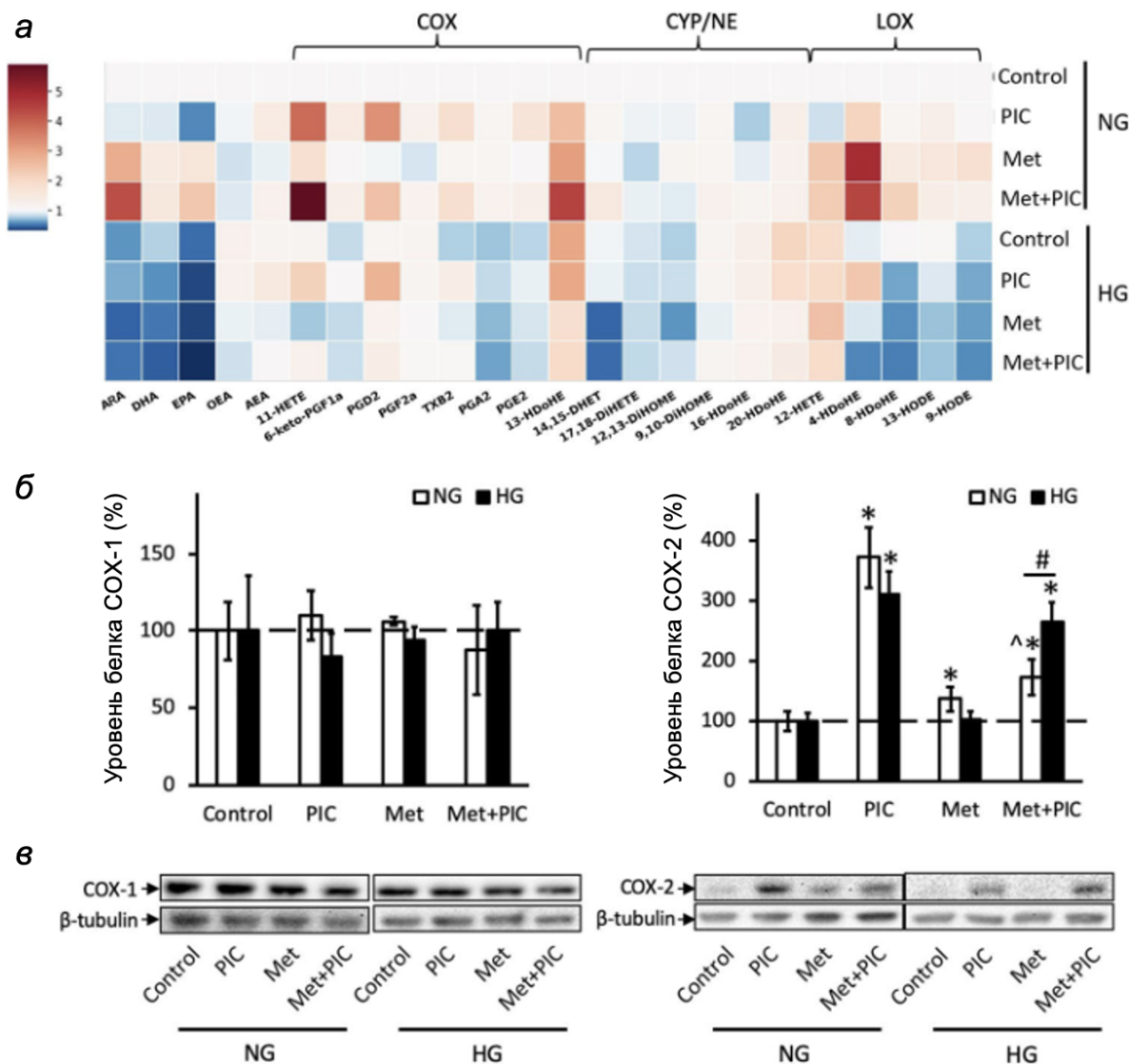


Рис. 14. Влияние PIC-стимуляции и обработки метформином на высвобождение оксилипинов и экспрессию циклооксигеназ в астроцитах, культивируемых в HG и NG. Астроциты предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 мМ) и затем в течение 6 ч poly(I:C) (PIC, 10 мкг/мл). *а* – концентрации оксилипинов в супернатантах измеряли с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (UPLC-MS/MS). 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*, *в* – уровни белков COX-1 и COX-2 оценивали методом иммуноблоттинга и нормировали на нагрузочный контроль β -тубулина. Пример является репрезентативным для трех независимых экспериментов. Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками, # $p < 0,05$, $p^{\wedge} < 0,05$ по сравнению с PIC-стимулированными клетками.

Сравнение моделей NG и HG для производных метаболической ветви COX выявило различия между моделями в чувствительности к P1С, а также в синтезе производных АА и ДНА. Разница между моделями NG и HG наблюдалась только для 13-НDoHE, метаболита ДНА, в нестимулированных клетках (контроль) и при добавлении метформина. Концентрация других метаболитов не зависела от используемой модели глюкозы и лечения метформинем. В NG-модели P1С стимулировал синтез оксипинов 11-HETE, 6-кето-PGF_{2α}, PGD₂, TXB₂, PGE₂ по сравнению с клетками, адаптированными к HG и стимулированными P1С. Метформин снижал стимулированный P1С синтез COX-производных оксипинов в HG (11-HETE, 6-кето-PGF_{1α}, PGD₂, TXB₂, 13-НDoHE) и повышал/не влиял на него в NG-модели (11-HETE, 6-кето-PGF_{1α}, TXB₂, 13-НDoHE) (Рис. 14.а).

Для производных CYP/NE мы не наблюдали различий в их базальных уровнях или активации под действием P1С и/или метформина при различных концентрациях глюкозы в организме (Рис. 14а). Исключение составил 14,15-DHET, образующийся из АА. Метформин в модели HG снижал синтез 14,15-DHET как самостоятельно, так и при совместном применении с P1С (Рис. 14а).

Для группы производных LOX базальные уровни метаболитов, а также при стимуляции P1С также не отличались в моделях NG/HG, однако метформин стимулировал синтез производного ДНА 4-НDoHE в нормальной среде (Рис. 14а).

Как и в экспериментах с LPS мы оценили изменения в уровнях экспрессии циклооксигеназ (COX-1, COX-2) в наших экспериментальных условиях (Рис. 14б, в). В нестимулированных клетках экспрессия COX-1 и COX-2 также не зависела от концентрации глюкозы, а экспрессия COX-1 не изменялась в ответ на все экспериментальные обработки. P1С стимулировал экспрессию COX-2 как в модели NG, так и в модели HG. Метформин снижал стимулированную P1С экспрессию COX-2 (Рис. 14б, в), но только для NG-адаптированных клеток.

Проведение экспериментов по единым протоколам позволяют сравнить профили оксипинов при разных типах TLR стимуляции. В целом, профили оксипинов качественно сходны при активации TLR3 (Рис. 14) и TLR4 (Рис. 13), различаются количественно, в первую очередь, в синтезе COX-производных оксипинов. В частности, только активация TLR4 увеличивает синтез PGF_{2α}, в то время как активация TLR3, но не TLR4, увеличивает синтез 13-НDoHE и 4-НDoHE.

Концентрация NG снижает синтез 11-НЕТЕ, 6-кето-PGF_{1α}, PGD₂, PGE₂, TXB₂ по сравнению с NG при стимуляции PIC. Другими словами, ответ становится менее выраженным, а соотношение в оксипиновом профиле изменяется. Для LPS мы также ранее наблюдали снижение чувствительности клеток в ответ на стимулы в модели NG (Рис. 13).

Метформин способен снижать синтез оксипинов, но существует заметная разница в активации TLR4 и TLR3. При стимуляции LPS ("бактериальное воспаление"), метформин снижает синтез оксипинов независимо от адаптации к глюкозе, тогда как при стимуляции PIC ("вирусное воспаление") метформин снижает синтез оксипинов только в модели NG. При этом наибольшие различия наблюдались в снижении концентрации PGD₂ и TXB₂ (в клетках, стимулированных TLR3, метформин снижает их концентрацию в модели NG и не оказывает влияния в NG). Более того, синтез 11-НЕТЕ при обработке метформином PIC-стимулированных клеток снижался в модели NG и наоборот повышался в NG. Интересно, что метформин снижал PIC-стимулированную экспрессию COX-2, но только для NG-адаптированных клеток (Рис. 14). Хотя для LPS его снижающий эффект проявлялся как для NG, так и для NG (Рис. 13).

Метформин значимым образом меняет энергетический метаболизм клетки (раздел 3.1). Можно предположить, что метформин проявляет противовоспалительное действие, снижая синтез провоспалительных оксипинов независимо от адаптации клеток к глюкозе при активации TLR4, а в случае активации TLR3 он эффективен в модели NG.

3.4. Выявление возможных различий во внутриклеточных молекулярных механизмах при стимулах LPS и PIC при разных адаптациях и модуляции метформином.

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 [212,229].

Для характеристики внутриклеточных сигнальных путей, которые могут быть задействованы в реализации взаимосвязи энергетического метаболизма и воспаления, в проведенной серии экспериментов (аналогично п. 3.1-3.3) проводили выделение белка и определение их иммуноферментным методом.

3.4.1. Внутриклеточные молекулярные механизмы, участвующие в LPS-стимулированном ответе астроцитов, культивируемых при высокой концентрации глюкозы.

Согласно литературным данным, обработка астроцитов LPS индуцирует активацию митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК) ERK1/2 [205] и транскрипционного фактора STAT3 [206]. В исследованиях на макрофагах было продемонстрировано, что метформин способен подавлять LPS-индуцированную активацию ERK1/2 [192], а в модели травмы спинного мозга у крыс *in vivo* обнаружено его ингибирующее влияние на STAT3 в астроцитах [207]. В связи с этим для выяснения внутриклеточных сигнальных механизмов действия метформина в условиях разного гликемического фона мы оценили уровень фосфорилирования ERK1/2 и STAT3 методом иммуноблоттинга (Рис. 15). Установлено, что культивирование при повышенной концентрации глюкозы само по себе снижает активность ERK1/2 (Рис. 15а), но не влияет на STAT3 (Рис. 15б). При стимуляции LPS уровень фосфорилирования обоих белков не зависел от содержания глюкозы в среде. Метформин уменьшал LPS-индуцированную активацию ERK1/2 и STAT3, причем это действие наблюдалось и в нестимулированных клетках (Рис. 15а, б). Выраженность эффекта метформина различалась в зависимости от концентрации глюкозы, при которой культивировались астроциты.

На непрямую связь между антигликемическими и противовоспалительными эффектами метформина указывает его воздействие на активность STAT3, не зависящее от концентрации глюкозы. Как уже отмечалось, в модели *in vivo* травмы спинного мозга у крыс метформин снижал активацию STAT3 в астроцитах [207]. Полученные нами *in vitro* данные полностью согласуются с этим наблюдением: препарат подавлял фосфорилирование STAT3 независимо от наличия LPS, хотя в присутствии стимула эффект усиливался. Учитывая ранее установленную взаимосвязь между LPS, STAT3 и продукцией IL-6 в клетках мозга [208], можно предположить, что зарегистрированное нами снижение секреции IL-6 под действием метформина опосредовано ингибированием STAT3-зависимого сигналинга. Примечательно, что противовоспалительный потенциал метформина реализуется в большей степени в условиях нормогликемии.

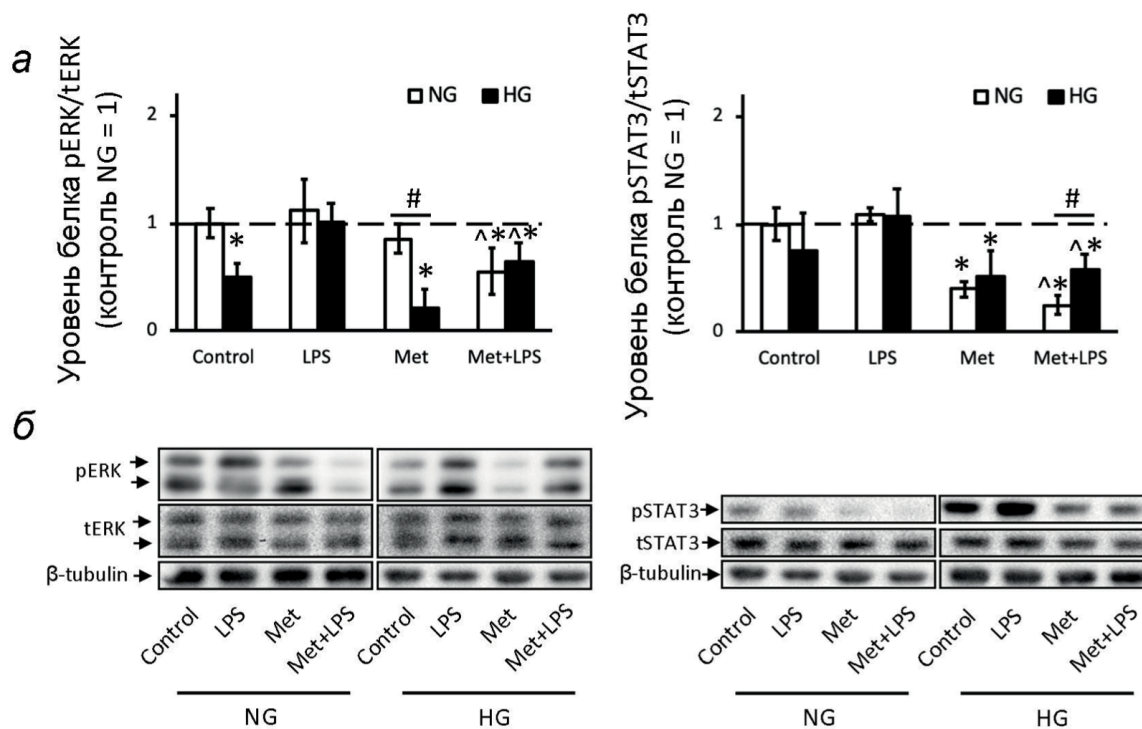


Рис. 15. Влияние глюкозы на активность MAPK ERK1/2 и транскрипционного фактора STAT3 в астроцитах, предобработанных метформином и стимулированных LPS. Первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 мМ), а затем стимулировали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 4 ч. Уровни фосфорилированной формы белка (p-STAT3, p-ERK1/2) и общей формы белка (t-STAT3, t-ERK1/2) оценивали с помощью иммуноблоттинга и нормализовали по отношению к уровню экспрессии β -тубулина. *а* – результаты денситометрии представлены по отношению к контрольным, нестимулированным клеткам. *б* – приведены репрезентативные изображения вестерн-блота для соответствующих белков. Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение среднего из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными клетками культивируемыми в среде с NG; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичные обработки; ^ $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками, культивируемыми в среде с соответствующей концентрацией глюкозы.

Сходная картина наблюдается и для киназы ERK1/2. Ранее было показано, что в астроцитах в ответ на LPS происходит активация ERK1/2 [205], тогда как в макрофагах метформин подавляет LPS-индуцированное фосфорилирование ERK1/2 [192]. В нашей работе метформин также снижал LPS-стимулированную активность ERK1/2 вне зависимости от концентрации глюкозы. Более того, в условиях гипергликемии препарат ингибировал базальную активность ERK даже без стимуляции LPS. Хотя прямое сопоставление первичных культур и клеточных линий требует

осторожности, интересно отметить, что на модели нейробластомы SH-SY5Y снижение активности ERK1/2 наблюдалось при дефиците глюкозы [209]. Это позволяет предположить существование сенсорной системы, реагирующей на отклонения внеклеточной концентрации глюкозы от физиологической нормы, компонентом которой может выступать ERK1/2.

3.4.2. Внутриклеточные молекулярные механизмы, участвующие в PIC-стимулированном ответе астроцитов, культивируемых при высокой концентрации глюкозы.

С целью изучения внутриклеточных сигнальных путей, обуславливающих различия в адаптации астроцитов к разным концентрациям глюкозы, был проведен анализ изменений активности киназ ERK1/2 и p38, а также транскрипционного фактора STAT3 при стимуляции PIC (Рис. 16а-в).

Было обнаружено, что PIC стимулирует активность p38 независимо от концентрации глюкозы в среде (Рис. 16а). STAT3 (Рис. 16б) и ERK1/2 (Рис. 16в) не меняли своей активности при стимуляции PIC (Рис. 16в). Интересно, что метформин оказывал влияние на все тестируемые активности, а именно стимулировал активность p38 в модели NG (Рис. 16а) и снижал активность ERK1/2 и STAT3 как в моделях HG, так и NG (Рис. 16б, в). Изменения чувствительности к метформину оказались заметны только для p38, метформин не влиял на активность этой киназы в среде NG (Рис. 16а). Предварительная обработка клеток метформином и их дальнейшее стимулирование PIC значительно активировала p38 (Рис. 16а) и снижала активность STAT3 (Рис. 16б) при культивировании клеток в концентрациях HG и NG.

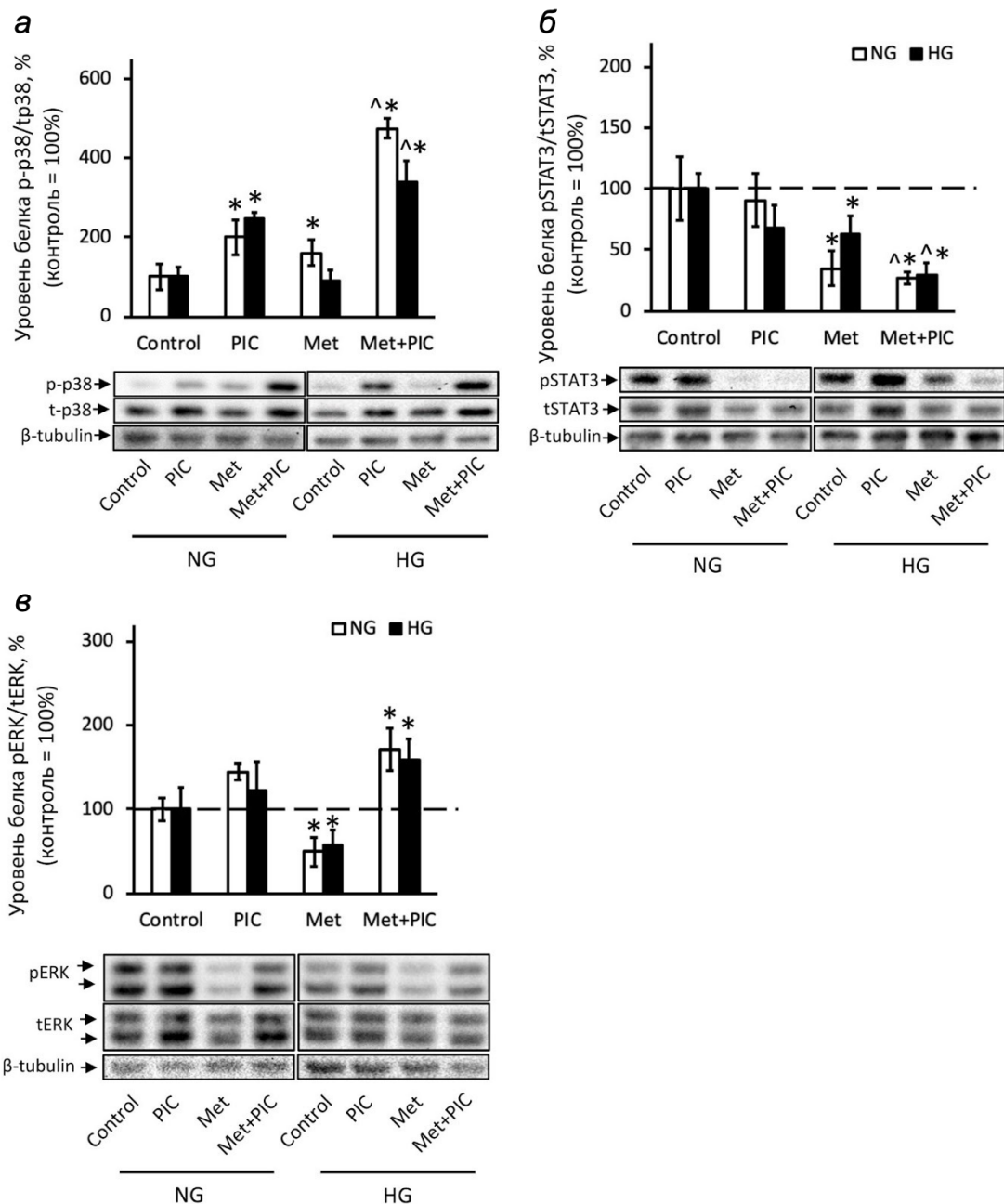


Рис. 16. Влияние глюкозы на активность p38, ERK1/2 MAPK и транскрипционного фактора STAT3 в астроцитах, предобработанных метформином и стимулированных PIC. Первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 мМ), а затем стимулировали poly(I:C) (PIC, 10 мкг/мл) в течение 6 ч. Уровни фосфорилированной формы белка (p-p38 (а), p-STAT3 (б), p-ERK1/2 (в)) и общей формы белка (trp38 (а), tSTAT3 (б), tERK1/2 (в)) оценивали с помощью иммуноблоттинга и нормализовали по отношению к уровню экспрессии β-тубулина. Результаты денситометрии представлены по отношению к контрольным, нестимулированным клеткам. Пример является репрезентативным для трех независимых экспериментов. Значения представляют собой средние ± стандартное отклонение из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$, по сравнению с нестимулированными клетками, # $p < 0,05$, [^] $p < 0,05$ по сравнению с PIC-стимулированными клетками.

PI3K стимулирует активность p38, но не ERK1/2 и STAT3, причем этот эффект не зависит от адаптации клеток к глюкозе. Наблюдаемые изменения активности ERK1/2, согласуются с полученными ранее для астроцитов данными [210]. Было показано, что PI3K индуцирует фосфорилирование ERK и p38 в первичной микроглии крысы [211]. Это еще раз указывает на различия в регуляции сигнальных путей между разными типами клеток. Следует отметить, что концентрация HG влияет на активацию p38 и JNK MAPK при стимуляции TLR4 на астроцитах [107], то есть сигнальные пути одного и того же типа клеток имеют разную чувствительность к адаптации к глюкозе. Метформин повышает активность p38 и снижает активность STAT3 в PI3K-стимулированных астроцитах независимо от концентрации глюкозы. Примечательно, что в модели повреждения спинного мозга у крыс *in vivo* метформин также снижал активацию STAT3 в астроцитах [207].

Мы обнаружили, что TLR3-опосредованная сигнализация в астроцитах, адаптированных к высокому содержанию глюкозы, связана с ремоделированием врожденного иммунного ответа, что приводит к изменению профилей цитокинов и оксиприна. Эти изменения не зависят напрямую от энергетического метаболизма, как показало лечение метформином. Хотя метформин проявляет противовоспалительные свойства в исследуемой модели, его действие указывает на не прямое взаимодействие между энергетическим метаболизмом и врожденным иммунным ответом на активацию TLR3. Это разграничивает сигнальные пути TLR3 и TLR4 в астроцитах, причем метформин влияет только на активацию TLR4 [212]. В настоящее время молекулярный механизм еще не до конца изучен. Важно отметить, что астроциты отличаются от других классических иммунных клеток не только происхождением: астроциты имеют эктодермальное, нейроэпителиальное происхождение, а макрофаги, микроглия и другие – миелиоидное [213]. Астроциты глубоко вовлечены как в воспалительную реакцию, так и в поглощение, хранение и поступление глюкозы в нейроны [8,214]. Модель адаптации астроцитов к высоким концентрациям глюкозы мы Примененный в работе, он открывает новые возможности для раскрытия сложного молекулярного механизма, стоящего за взаимодействием между метаболической и врожденной иммунными системами.

3.5. Оценка роли АТФ как провоспалительного стимула.

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 [230].

Известно, что АТФ не только синтезируется и потребляется в энергетическом метаболизме клетки, но и служит сигналом для других клеток. Сигнал передается через пуриnergические рецепторы, активация которых играет важную роль в жизнедеятельности астроцитов [112]. Поэтому мы охарактеризовали влияние АТФ на воспалительные ответы клеток, цитокины и оксипирины. Сравнивали клеточные модели гипергликемии и культивируемые при нормальной концентрации глюкозы.

3.5.1. Влияние стимуляции АТФ на профили оксипиринов в астроцитах, адаптированных к высоким или нормальным концентрациям глюкозы.

Для характеристики влияния АТФ на синтез оксипиринов мы исследовали изменения их внеклеточных профилей во время краткосрочной (15 минут) и среднесрочной (4 часа) стимуляции астроцитов АТФ (100 мкМ). Выбранная концентрация является физиологической, вызывает осцилляции кальция в астроцитах [128,129], что считается важным для нормальной коммуникации этих клеток [112].

Данные по 41 проанализированным оксипиринам и жирным кислотам представлены в виде тепловой карты (Рис. 17а).

Обнаруженные соединения делили на группы, как описано в разделе 3.3. 15-минутная АТФ-стимуляция астроцитов, выращенных в среде с нормальной глюкозой, индуцировала высвобождение производных СОХ, таких как PGD2, TXB2, 12-ННТ и 11-НЕТЕ (Рис. 17б).

В культурах, предварительно адаптированных к высокому содержанию глюкозы (Рис. 17б), также регистрировалось существенное повышение уровня метаболитов СОХ-пути – PGD2, 12-ННТ и TXB2, тогда как содержание продукта СУР-пути 18-НЕРЕ, напротив, значительно снижалось.

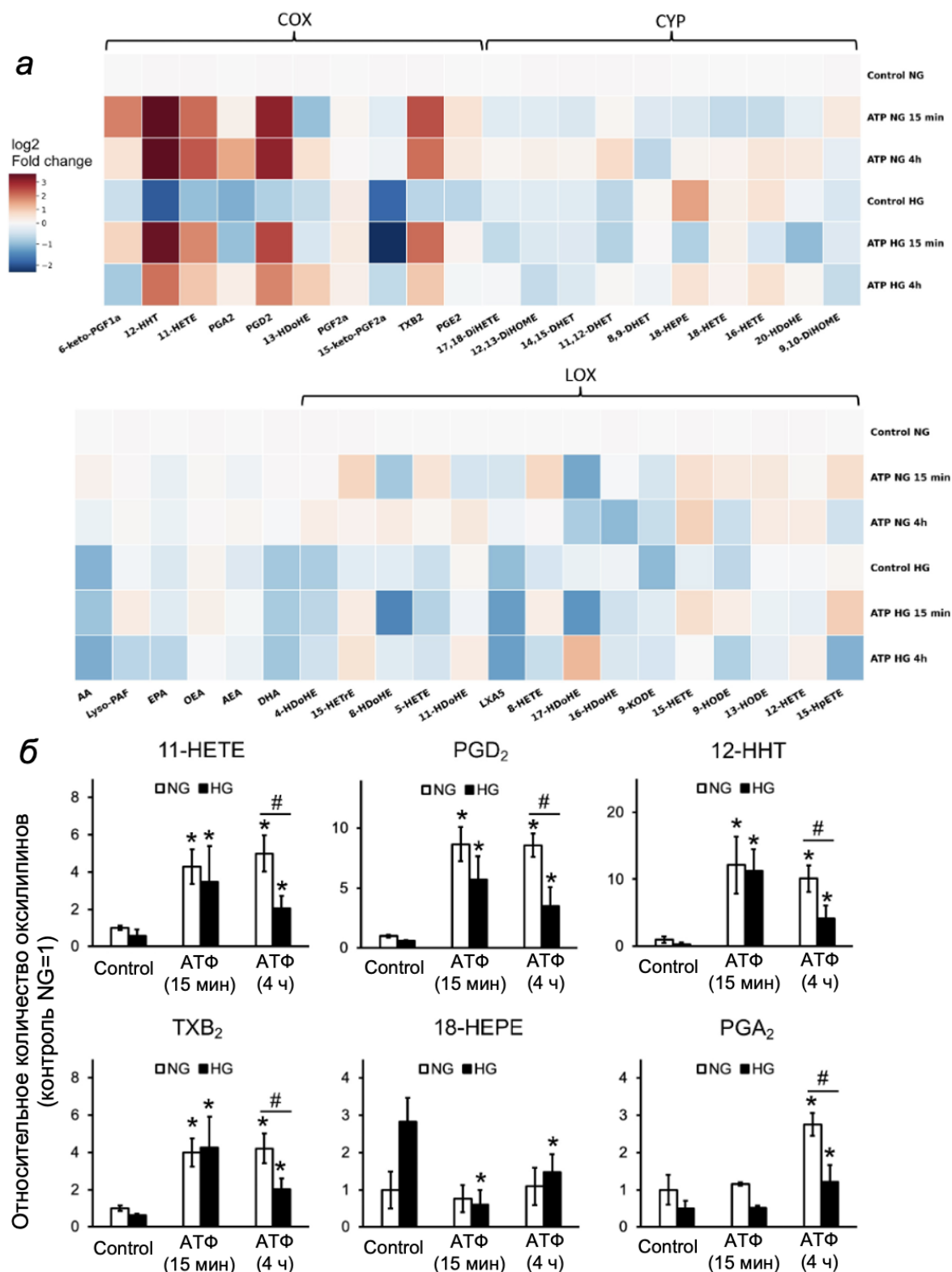


Рис. 17. Влияние АТФ-стимуляции на высвобождение оксипинов в астроцитах, культивируемых в НГ и НГ. Астроциты стимулировались в течение 15 мин или 4 ч с помощью АТФ (100 мкМ). Концентрации оксипинов в супернатантах измерялись с помощью сверхэффективной жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (UPLC-MS/MS). Тепловая карта (а) показывает относительное количество каждого липидного медиатора по сравнению с контролем. Ось X показывает

стимулы, а ось Y показывает кратность изменения (шкала отношения \log_2) каждого липидного медиатора. Метаболиты были разделены на основе путей, вовлеченных в их синтез: липоксигеназа (LOX), циклооксигеназа (COX) и цитохром (CYP). (б) Относительная концентрация метаболитов 11-НЕТЕ, 18-НЕРЕ, PGD2, 12-ННТ, TXB2 и PGA2. Значения представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками, # $p < 0,05$ по сравнению с клетками, культивируемыми в NG.

Четырехчасовая стимуляция АТФ астроцитов, культивируемых в NG, вызывала высвобождение тех же оксилипинов (Рис. 17б), уровни которых также изменялись при 15-минутной стимуляции: производные COX - PGD2, 12-ННТ, TXB2, 11-НЕТЕ (Рис. 17б). Концентрация простагландина A2 (PGA2) также была значительно увеличена (Рис. 17б).

При стимуляции астроцитов, культивируемых в условиях NG, наблюдалось увеличение концентраций PGD2, 12-ННТ, TXB2, PGA2 и 11-НЕТЕ (Рис. 17б). Обратите внимание, что для каждого из этих соединений увеличение было меньше, чем при культивировании клеток в среде с нормальным уровнем глюкозы. Количество производного CYP 18-НЕРЕ снизилось (Рис. 17б), что также согласуется с изменениями, обнаруженными при анализе профиля оксилипинов во время 15-минутной стимуляции АТФ.

Таким образом, из полученных данных можно сделать вывод, что как 4-часовая, так и 15-минутная стимуляция клеток АТФ вызывает активацию COX-пути и увеличение синтеза производных метаболитов AA, но не производных других ПНЖК. Синтез оксилипинов при стимуляции астроцитов АТФ снижается, когда клетки адаптированы к высокому уровню глюкозы.

3.5.2. Влияние метформина на стимулированный АТФ синтез оксилипина в астроцитах, культивируемых при различных концентрациях глюкозы.

Как было продемонстрировано в предыдущих экспериментах, метформин способен существенно модулировать ответ астроцитов на стимуляцию TLR4 и TLR3, причем характер этого эффекта зависит от концентрации глюкозы и проявляется, в частности, в синтезе оксилипинов. В связи с этим представляло интерес исследовать действие метформина в условиях активации пуриnergических рецепторов АТФ. Клетки обрабатывали в течение 24 ч метформином, затем стимулировали АТФ в

течение 15 мин или 4 ч и измеряли 41 липидное соединение во внеклеточной среде.

Поскольку метформин сам по себе влияет на синтез оксипинов (Рис. 18), для выявления синергических эффектов мы оценили оксипины, для которых изменение концентрации при комбинированной стимуляции АТФ и предварительной обработке метформинном не объяснялось независимыми эффектами этих факторов. Результаты представлены в виде вулканной диаграммы (Рис. 18а, б), показывающего оксипины, для которых наблюдалось взаимодействие между такими факторами, как стимуляция АТФ и предварительная обработка метформинном, для астроцитов, культивируемых в среде с нормальной (Рис. 18а) и высокой (Рис. 18б) концентрацией глюкозы. Ось Y показывает $-\log_{10}$ р-значения уровня значимости гипотезы о том, что АТФ и метформин действуют независимо. Ось X показывает кратное изменение эффекта взаимодействия краткосрочной стимуляции АТФ и предварительной обработки метформинном, которое рассчитывалось как разница между средней концентрацией во время обработки обоими стимулами и концентрацией во время обработки каждым стимулом отдельно, суммированной с концентрацией соответствующего липидного медиатора в контрольных клетках. Положительные значения этого выражения означают, что взаимодействие между стимулами привело к более высокому уровню липидного медиатора, чем было бы в случае, если бы стимулы обрабатывались независимо, а отрицательные значения означают, что он ниже. Красные точки обозначают соединения, которые имели (скорректированное) р-значение $< 0,05$. Соединения, которые изменились незначительно, обозначены серым цветом.

Для астроцитов, культивируемых в нормальной среде глюкозы, синергетические эффекты 15-минутной стимуляции АТФ и метформинном наблюдались для ряда оксипинов (Рис. 18а, в), таких как производные циклооксигеназы 11-НЕТЕ, 12-ННТ и PGD2 и производное липоксигеназы 15-НЕТЕ. Для этих липидных медиаторов концентрации при комбинированной стимуляции АТФ и метформинном были значительно выше, чем сумма эффектов этих стимулов по отдельности.

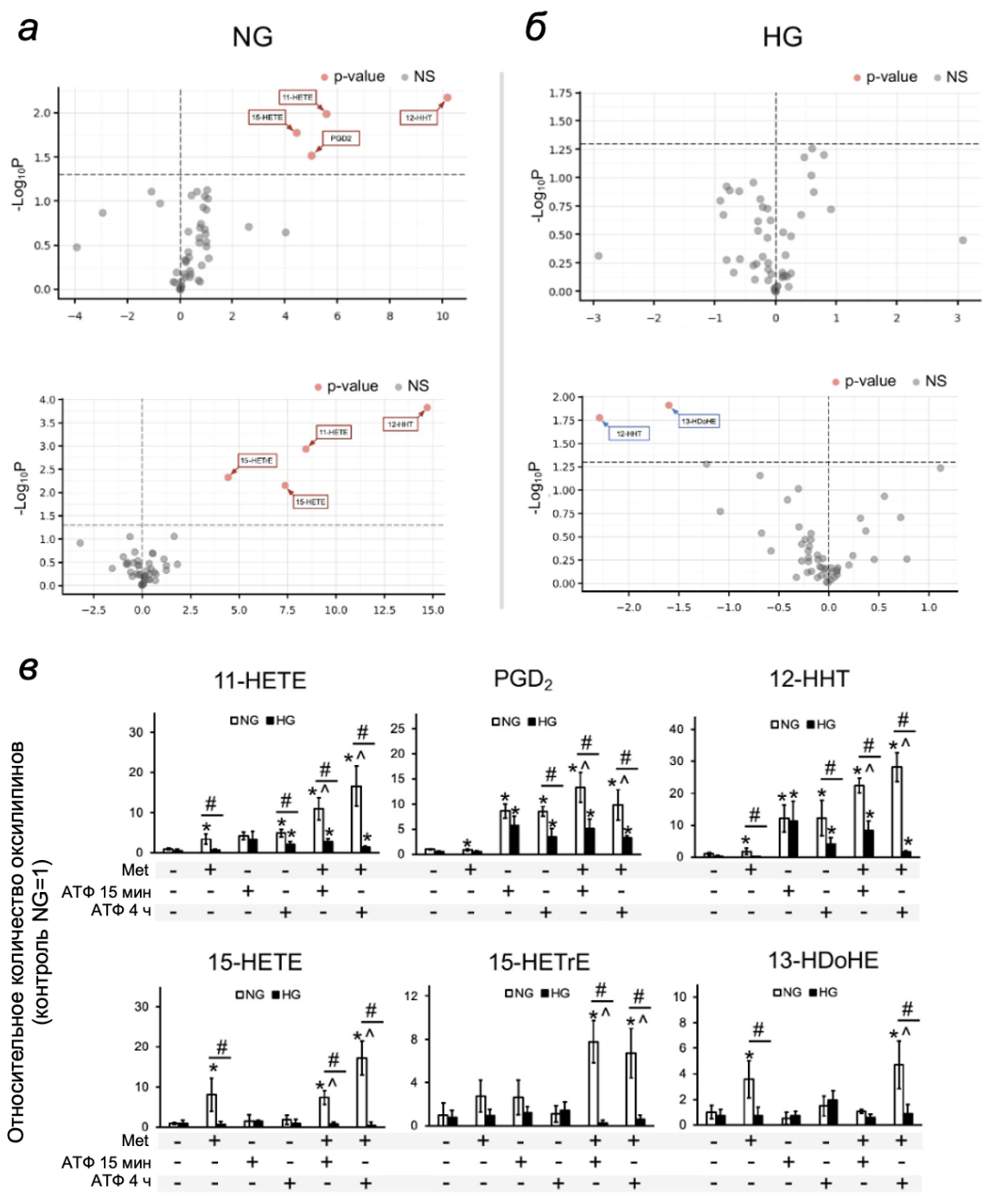


Рис. 18. Влияние метформина (Met) на выброс оксипинов и ПНЖК астроцитами, стимулированный АТФ. Астроциты предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 мМ) и затем выдерживали в течение 15 мин или 4 ч с АТФ (100 мкМ). *а-б* – вулканический график, на котором выделены соединения, концентрации которых показали значительные изменения. Соединения с незначительными изменениями отмечены серым цветом, а красные точки обозначают соединения, которые имели р-значение (скорректированное) менее 0,05. *в* – относительная концентрация метаболитов 11-НЕТЕ, PGD₂, 12-ННТ, 15-НЕТе, 15-НЕТrЕ и 13-НДоНЕ. Значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение из трех независимых экспериментов. **p*<0,05 по сравнению с нестимулированными клетками,

$p < 0,05$ по сравнению с клетками, культивируемыми на NG, $\wedge p < 0,05$ для гипотезы о том, что оба стимула (АТФ и Met) действуют независимо для клеток, культивируемых в среде с соответствующей концентрацией глюкозы (двухфакторный дисперсионный анализ).

Для клеток, культивируемых в среде с нормальной глюкозой (Рис. 18а, в), наблюдался синергический эффект метформина и АТФ (4 ч) для производных COX 12-ННТ и 11-НЕТЕ и производного LOX 15-НЕТЕ, а также при кратковременной стимуляции. В то же время для PGD2 не наблюдалось эффектов взаимодействия, но наблюдался синергический эффект для производного липоксигеназного пути 15-НЕТrE.

Примечательно, что во время адаптации астроцитов к гипергликемическим условиям не наблюдалось эффектов взаимодействия между АТФ 15 мин и метформином ни для одного из анализируемых оксипинов (Рис. 18б, в). Значительные изменения наблюдались для разных оксипинов через четыре часа стимуляции АТФ, чем при кратковременной стимуляции. Синергических эффектов не наблюдалось ни для одного из исследованных липидных медиаторов. Концентрация 12-ННТ снижалась при совместном воздействии АТФ и метформина, тогда как противоположный (синергический) эффект для этого оксипина наблюдался для клеток, культивируемых в среде с нормальной концентрацией глюкозы.

3.5.3. Изменения уровней воспалительных маркеров в АТФ-стимулированных астроцитах, культивируемых при высокой концентрации глюкозы.

Для характеристики влияния АТФ на воспалительные реакции астроцитов мы оценили уровень экспрессии провоспалительных интерлейкинов IL-6, IL-1 β , цитокинов фактора некроза опухоли-альфа (TNF α), провоспалительные ферменты iNOS (индуцибельная NO-синтаза) и COX-2 (циклооксигеназа 2) и противовоспалительный интерлейкин 10 (IL-10) (Рис. 19). Стимуляция астроцитов АТФ не вызывала увеличения экспрессии воспалительных маркеров как при нормо-, так и гипергликемии. Предварительная обработка астроцитов метформином увеличивала экспрессию COX-2 для клеток в NG (Рис. 19а). Совместная стимуляция астроцитов АТФ и метформином увеличивала экспрессию TNF α (Рис. 19в), IL-6 (Рис. 19д) и IL-10 (Рис. 19е) для клеток, культивируемых в среде с

нормальной глюкозой. Для клеток, культивируемых в НГ, не наблюдалось никаких эффектов АТФ и метформина.

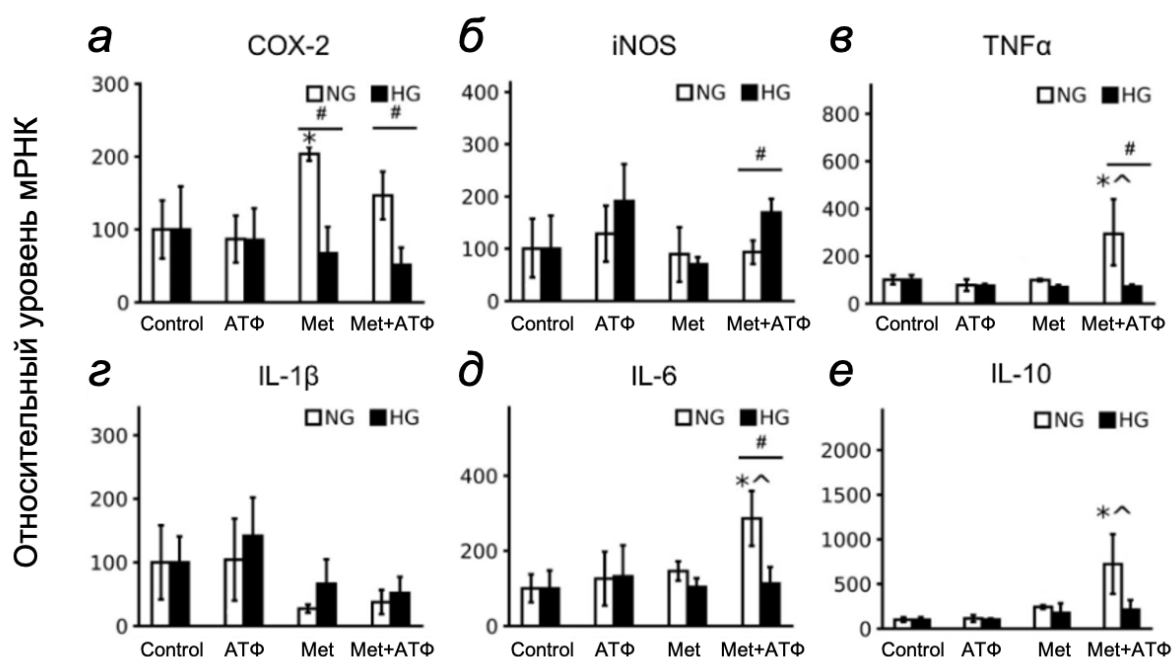


Рис. 19. Влияние уровня глюкозы на чувствительность астроцитов к АТФ и эффектам метформина. Астроциты предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 мМ) и затем выдерживали в течение 4 ч с АТФ (100 мкМ). *a-e* – уровни мРНК воспалительных маркеров TNFα, IL-1β, iNOS, IL-10, COX-2 и IL-6 определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (qPCR). Результаты выражены в % (экспрессия в контроле = 100%). Значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками, # $p < 0,05$ по сравнению с клетками, культивируемыми в NG, ^ $p < 0,05$ по сравнению с клетками, стимулированными АТФ.

3.5.4. Внутриклеточные механизмы, участвующие в АТФ-стимулированном ответе астроцитов при адаптации к высокому уровню глюкозы и предварительной обработке метформином.

Для выяснения внутриклеточных молекулярных механизмов, лежащих в основе изменений в ответах астроцитов, активность внутриклеточных маркеров оценивалась при стимуляции 100 мкМ АТФ в течение 15 мин (Рис. 20).

Циклооксигеназа 1 (COX-1, Рис. 20*a*) и относительное количество активной формы цитозольной фосфолипазы А2 (сPLA2, Рис. 20*б*) были проанализированы для определения механизмов, вовлеченных в изменения профилей оксипинов. Уровень экспрессии COX-1 не претерпевал изменений при стимуляции АТФ независимо от концентрации глюкозы в

среде культивирования. В клетках, культивируемых в условиях нормогликемии, добавление АТФ приводило к повышению уровня активной формы cPLA2 (Рис. 20б), тогда как в культурах, адаптированных к высокому содержанию глюкозы, подобной активации не наблюдалось (Рис. 20б). Метформин не оказывал влияния ни на экспрессию СОХ-1, ни на активацию cPLA2 (Рис. 20а, б).

В ответ на стимуляцию АТФ в астроцитах наблюдалось повышение уровня фосфорилирования киназ ERK1/2 (Рис. 20в) и p38 (Рис. 20г). Степень фосфорилирования ERK1/2 не зависела от концентрации глюкозы в среде культивирования. Обработка метформином клеток, находившихся в условиях нормогликемии, приводила к снижению фосфорилирования ERK1/2 как в базальном состоянии, так и при добавлении АТФ (Рис. 20в). В отношении p38 было обнаружено, что в среде с нормальным содержанием глюкозы метформин сам по себе повышал уровень ее фосфорилирования. АТФ-индуцированная активация p38 была менее выражена в клетках, адаптированных к высокому содержанию глюкозы (Рис. 20г). При этом предобработка метформином не оказывала влияния на стимулированное АТФ фосфорилирование p38 (Рис. 20г).

Уровни фосфорилированной формы факторов транскрипции NF-κB (Рис. 20д), а также сигнального преобразователя и активатора транскрипции-3 (STAT3) (Рис. 20е) не изменялись под действием АТФ. Предварительная обработка клеток метформином значительно снижала уровни STAT3, но не NF-κB, и этот эффект был очевиден только для клеток, культивируемых в среде NG, причем независимо от присутствия АТФ (Рис. 20д, е).

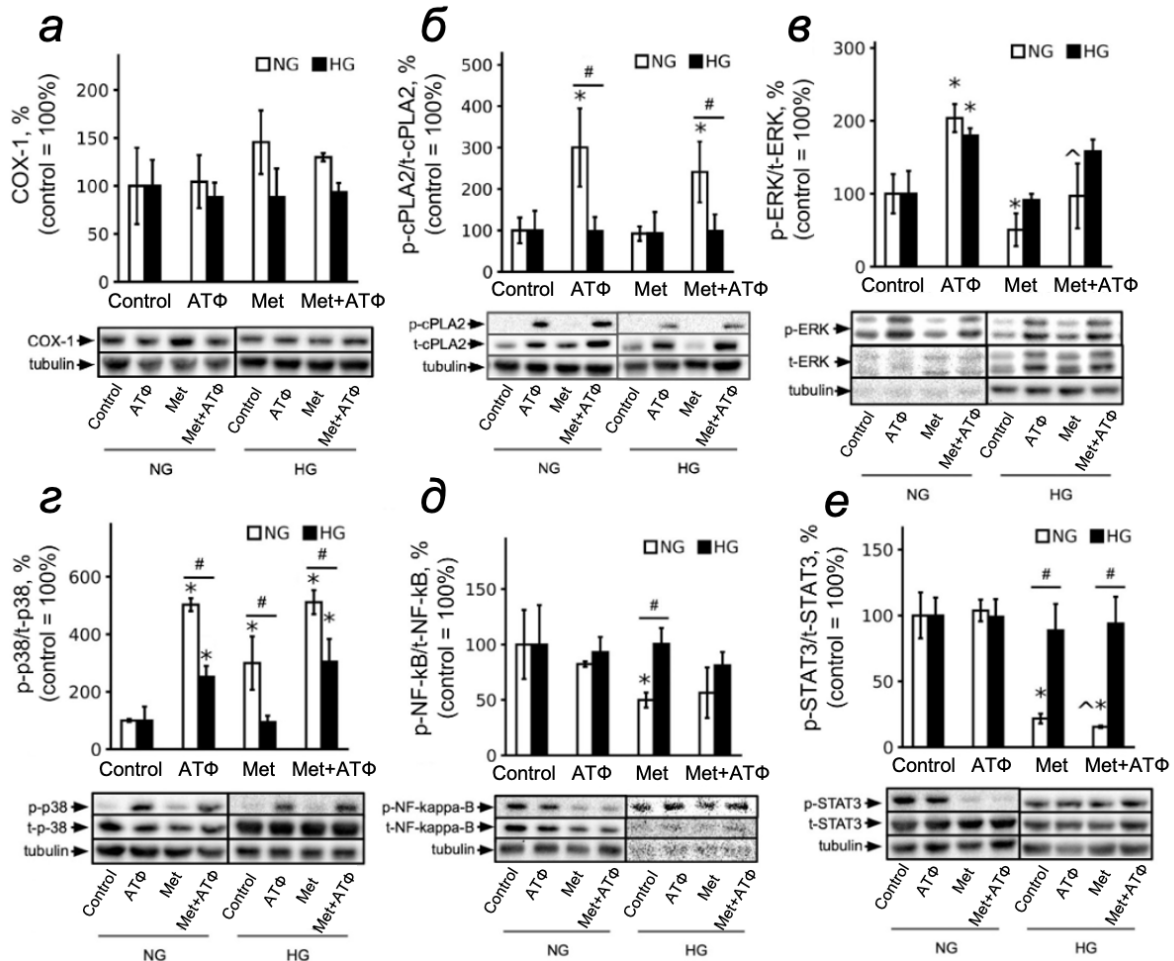


Рис. 20. Сравнение активности COX-1, cPLA2, ERK1/2 и p38 MAPK, NF-κB и STAT3 в астроцитах, стимулированных АТФ и обработанных метформинном. Астроциты предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформинном (Met, 2,5 мМ) и затем выдерживали в течение 15 мин с АТФ (100 мкМ). *a-e* – уровни белков COX-1, p-cPLA2, cPLA2, p-p38, p38, p-ERK1/2, ERK1/2, p-STAT3, STAT3, p-NF-κB и NF-κB оценивали с помощью иммуноблоттинга и нормализовали по контрольной нагрузке β-тубулина. Пример является репрезентативным для трех независимых экспериментов. Результаты выражены как кратные изменения относительно необработанных клеток. Значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными клетками, # $p < 0,05$ по сравнению с клетками, культивируемыми в NG, ^ $p < 0,05$ по сравнению с клетками, стимулированными АТФ.

Хотя внеклеточный АТФ широко обсуждался как участник воспалительного процесса в астроцитах [19,215], наши данные указывают на то, что его роль более сложная. АТФ не вызывает изменений в экспрессии провоспалительных маркеров (COX-2, iNOS, TNFα, IL-1β, IL-6, IL-10), но влияет на синтез оксипинов (PGD2, TxB2, 12-NHT, 11-НЕТЕ, PGA2, 18-НЕРЕ). Ранее были данные о влиянии АТФ на синтез отдельных

простагландинов, например, наблюдалось увеличение PGD2 [139], TXB2 [216] и PGE2 [217,218]. В этих исследованиях определение простагландинов проводилось в бессывороточной среде, что влияет на профиль синтезируемых астроцитами оксипинов [100]. В настоящее время трудно сделать окончательное заключение, является ли изменение профилей оксипинов, наблюдаемое при действии АТФ, сдвигом в сторону усиления воспаления или его разрешения. Для точного ответа нужны эксперименты с влиянием смеси профиля оксипинов. Но можно обсуждать знания о действии отдельных веществ. TXB2 (его нестабильный предшественник TxA2) и 11-НЕТЕ в основном считаются провоспалительными веществами [219]. Простагландин D2 (PGD2), являющийся основным представителем простагландинов в центральной нервной системе, способен проявлять как провоспалительные, так и противовоспалительные свойства. Двойственность его эффектов обусловлена возможностью взаимодействия с разными типами рецепторов или метаболического превращения в циклопентеновые простагландины [220]. Циклопентенон PGA2, производное PGE2, считается противовоспалительным соединением [221]. 12-ННТ [222] и 18-НЕРЕ [223] оба проявляют противовоспалительные свойства. Хотя многие отдельные оксипины высвобождаются в низких концентрациях, ранее предполагалось, что их эффекты могут суммироваться, и низкие концентрации оксипинов могут быть суммированы [69]. Учитывая это, можно предположить, что спектр оксипинов, стимулированных АТФ, смещается в сторону противовоспалительной активности. Появление PGA2 при длительном воздействии АТФ также подтверждает это предположение, т.е. сдвиг синтеза оксипинов, индуцированного АТФ, в сторону противовоспалительного профиля еще больше усиливается.

АТФ является глиотрансмиттером, и его устойчивое увеличение наблюдается при различных патологических процессах в ЦНС [7,19,224], поэтому он был предложен в качестве участника провоспалительной части воспалительного ответа, в то время как наши данные предполагают, что АТФ участвует в процессах разрешения. Наши результаты с воспалительными маркерами также согласуются с данными по оксипинам и ставят под сомнение утверждение об АТФ как провоспалительном агенте. Действительно, мы не наблюдали эффекта АТФ на экспрессию СОХ-2, индуцируемого ключевого фермента превращения арахидоновой кислоты в простагландины, 11-ННТ и другие оксипины

[50]. Другие провоспалительные маркеры, то есть iNOS, TNF α , IL-1 β , IL-6 и IL-10, не стимулировались АТФ даже после 4 часов обработки. Отсутствие эффекта на экспрессию маркеров хорошо коррелирует с отсутствием эффекта АТФ на активацию провоспалительного фактора транскрипции гена NF- κ B. Наши данные согласуются с другими: показано, что АТФ не вызывает высвобождение IL-1 β [225], TNF α [226], индуцируемой синтазы оксида азота iNOS [227].

Показано, что длительное культивирование астроцитов в условиях высокой глюкозы увеличивает высвобождение АТФ [186]. Данные, полученные на эндотелиальных клетках, свидетельствуют о том, что высокие уровни глюкозы могут напрямую влиять на чувствительность рецепторов P2X7 и P2X4 к АТФ [228]. Можно было бы ожидать, что действие АТФ будет снижено в адаптированных к HG астроцитах. Действительно, мы наблюдали снижение активности sPLA2 и p38 для HG. Кроме того, активность синтеза оксипиринов была снижена при длительной обработке (4 ч) АТФ для HG. Однако кратковременная стимуляция (15 мин) АТФ не выявила никакой разницы во влиянии АТФ на синтез оксипирина в NG и HG. Это не подтверждает гипотезу о сниженной чувствительности пуриnergических рецепторов к АТФ в астроцитах во время адаптации к HG. Характеристика возможных изменений активности пуриnergических рецепторов во время адаптации астроцитов к высокой глюкозе требует дополнительных исследований. Важно, что чувствительность клеток к действию АТФ изменяется в процессе адаптации к HG, но это, по-видимому, количественные, а не качественные изменения.

Обсудим сравнение потенциала метформина как противовоспалительного агента при действии стимулов толл-подобных рецепторов (TLR), TLR4 [212] и TLR3 [229] и АТФ [230]. Независимо от концентрации глюкозы в среде культивирования, метформин подавлял индуцированное LPS высвобождение IL-1 β и IL-6, а также снижал активность STAT3 и ERK1/2 MAPK [212]. В отличие от TLR4-сигналинга, активация TLR3 выявила зависимость эффектов метформина от гликемических условий: препарат снижал PIC-стимулированную экспрессию IL-1 β при обеих концентрациях глюкозы, тогда как подавление экспрессии TNF α и высвобождения IL-6 под действием метформина наблюдалось только в условиях нормогликемии. Метформин значительно активировал p38 MAPK и снижал активность STAT3 в стимулированных PIC клетках независимо от концентрации глюкозы [229]. В настоящем

исследовании мы показали, что метформин влияет на активность ERK, STAT3 и NF-κB независимо от присутствия АТФ [230]. Эффекты метформина были очевидны в NG, а не в клетках, культивируемых HG. Сравнение этих эффектов метформина на TLR-стимулированных клетках и АТФ-стимулированных клетках дополнительно указывает на то, что АТФ нельзя отнести к чистому провоспалительному стимулу на астроцитах [230].

Сравним эффекты метформина на синтез оксипинов для трех стимулов. Метформин снизил стимулированное LPS высвобождение оксипинов, полученных из COX, и анандамида независимо от концентрации глюкозы. Различные эффекты адаптации к глюкозе наблюдались при анализе высвобождения оксипинов во время стимуляции PIC. Метформин снизил стимулированный PIC синтез оксипинов, полученных из COX, в NG (11-НЕТЕ, 6-кето-PGF1α, PGD2, TXB2, 13-НДоНЕ) и увеличил/не повлиял на него в модели NG (11-НЕТЕ, 6-кето-PGF1α, TXB2, 13-НДоНЕ). Используя АТФ в качестве стимула, мы обнаружили потенцирующий эффект метформина (увеличение высвобождения 11-НЕТЕ, PGD2, 12-ННТ, 15-НЕТЕ, 13-НДоНЕ, 15-НЕТrE), который был преимущественно очевиден в клетках, культивируемых в NG. Результаты показывают, что метформин можно рассматривать не только как противовоспалительное средство, но и как средство, способствующее разрешению воспаления.

Интересный результат с увеличением синтеза провоспалительных цитокинов при костимуляции АТФ с метформином. Возникает вопрос, какие молекулярные механизмы могут лежать в основе такого эффекта? Полученные данные позволяют предположить, что наблюдаемое явление требует сочетания двух сигналов, сходящихся на общих внутриклеточных путях. Ключевым компонентом выступает АТФ-зависимая пуриnergическая сигнализация. Внеклеточный АТФ через P2-рецепторы запускает в астроцитах мобилизацию Ca²⁺ и активирует киназы ERK1/2 и p38 MAPK [230–232]. Однако, согласно полученным результатам, активации только этих киназ недостаточно для индукции цитокинов — сам по себе АТФ не вызывает их экспрессию, смещая метаболизм арахидоновой кислоты в сторону синтеза противовоспалительных оксипинов [230]. Вторым необходимым компонентом является метформин. В условиях нормогликемии он выступает в роли костимулятора, изменяя сигнальный ландшафт клетки: подавляя STAT3 и ERK1/2, метформин парадоксальным

образом повышает базальную активность p38 MAPK и экспрессию COX-2 [22,230,233]. Таким образом, метформин создает «праймированное» состояние клетки. При добавлении АТФ сигналы от обоих стимулов конвергируют на общих внутриклеточных узлах (MAPK → cPLA2 → COX), и их совокупная активность достигает порога, необходимого для транскрипции цитокинов [230,232]. Индукция как провоспалительных (TNF α , IL-6), так и противовоспалительных (IL-10) молекул при отсутствии активации NF- κ B позволяет рассматривать этот ответ не как классическое воспаление, а как модуляцию, направленную на регуляцию и разрешение воспалительного процесса [230]. Нивелирование этих эффектов в среде с высоким содержанием глюкозы (22,5 мМ) дает дополнительное подтверждение предложенному механизму. Гипергликемия нарушает оба звена сигнализации: с одной стороны, подавляется пуриnergическая передача – снижается АТФ-индуцированное фосфорилирование p38 MAPK и cPLA2, вероятно, вследствие десенсibilизации P2-рецепторов [186,230]; с другой стороны, высокий уровень глюкозы лишает метформин его сигнальной эффективности – способность модулировать p38, STAT3, ERK1/2 и COX-2 полностью утрачивается [22,230]. Без метформин-зависимого «праймирования» активации, запускаемой одним лишь АТФ, вновь становится недостаточно для индукции генов цитокинов.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейровоспаление является одним из ключевых патологических процессов, лежащих в основе развития и прогрессирования нейродегенеративных заболеваний, метаболического синдрома и диабетических осложнений центральной нервной системы. Астроциты, будучи наиболее многочисленной популяцией глиальных клеток головного мозга, играют центральную роль в поддержании гомеостаза нервной ткани, обеспечивая метаболическую поддержку нейронов, регуляцию синаптической передачи и формирование гематоэнцефалического барьера [7]. При этом астроциты активно участвуют в воспалительных реакциях, реализуемых через систему Толл-подобных рецепторов (TLR), в частности TLR4 и TLR3, активация которых агонистами LPS и polyI:C (PIC), соответственно, приводит к запуску провоспалительных сигнальных каскадов с продукцией цитокинов, оксилипинов и активных форм кислорода [9,10,90]. Наличие двух важных функций, энергетической и врожденного иммунитета, интегрирующих астроциты с другими клетками, отличает астроциты от классических клеток иммунной системы, макрофагов.

Целью настоящей работы было установить, каким образом изменения энергетического метаболизма астроцитов при адаптации к различным концентрациям глюкозы влияют на характер ответа при активации TLR3/TLR4 и пуринергической системы. В ходе исследования на первичной культуре астроцитов крысы, адаптированных к нормогликемическим (NG, 5 мМ) и гипергликемическим (HG, 22,5 мМ) условиям в течение 48 часов, с использованием метаболического анализатора Seahorse XFp было установлено, что длительная адаптация к повышенной концентрации глюкозы существенно перестраивает базальные параметры гликолиза (ECAR) и митохондриального дыхания (OCR) астроцитов, формируя отличный от нормогликемии метаболический фенотип. Показано, что этот сдвиг в энергетическом метаболизме при адаптации к HG определяет характер и выраженность ответа астроцитов на активацию врожденного иммунитета: при стимуляции TLR4 (LPS) в условиях гипергликемии наблюдалось усиление экспрессии провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-6 (Таблица 3), повышение продукции COX-зависимых оксилипинов (11-НЕТЕ, 6-кето-PGF1 α , PGD2, TXB2, PGE2) (Таблица 4), активация сигнальных путей ERK1/2 и STAT3 (Таблица 3), а также увеличение продукции АФК по сравнению с

нормогликемическими условиями. В то же время при активации TLR3 (PIC) метаболическая адаптация к HG оказывала иное влияние на воспалительный профиль: выявлены различия в модуляции экспрессии TNF α , IL-1 β , IL-6, iNOS и IL-10 (Таблица 3), а также преимущественное вовлечение LOX-зависимых путей и ДНА-производных оксипинов (4-HDoHE) (Таблица 4), что отражает различия в сигнальных каскадах MyD88- и TRIF-зависимых путей при TLR4 и TLR3 соответственно. Полученные данные о влиянии метаболической адаптации астроцитов к глюкозе на TLR-зависимые ответы дополнены результатами исследования пуринергической системы: установлено, что внеклеточный АТР, действуя в том числе через P2X7-рецепторы, активирует в астроцитах сигнальные каскады MAPK (ERK1/2, p38), STAT3 и NF- κ B (Таблица 3), а характер этого ответа также модулируется условиями гликемии, что указывает на существование перекрёстных взаимодействий между метаболическим статусом клетки, TLR- и пуринергической сигнализацией. Таким образом, совокупность полученных результатов демонстрирует, что адаптация астроцитов к повышенной концентрации глюкозы формирует провоспалительный метаболический контекст, который усиливает и качественно изменяет ответы на активацию как TLR3/TLR4, так и пуринергических рецепторов, что имеет значение для понимания механизмов нейровоспаления.

Метформин – препарат первой линии терапии сахарного диабета 2-го типа – в последние годы привлекает повышенное внимание исследователей в контексте его потенциальных нейропротекторных и противовоспалительных свойств [6,22,147]. Основные механизмы его действия связаны с активацией AMP-активируемой протеинкиназы (АМПК), ингибированием комплекса I дыхательной цепи митохондрий, а также модуляцией сигнальных путей NF- κ B и mTOR [23,26,148]. Вместе с тем, вопрос о влиянии метформина непосредственно на метаболизм и воспалительные реакции астроцитов при различных условиях гликемии и TLR-зависимой стимуляции оставался недостаточно изученным, что и определило актуальность настоящего исследования.

Таблица 3. Влияние уровня глюкозы в среде на базовый уровень и активацию / изменение экспрессии элементов внутриклеточного сигналинга и маркеров воспаления.

Элементы сигналинга / маркеры воспаления	LPS	PIC	АТФ
ERK 1/2	X	X	↑
p38		↑	↑
STAT3	X	X	X
TNF α	↑	↑	X
IL-1 β	↑	↑	X
IL-6	↑	↑	X
IL-10		↑	X
iNOS		↑	X

X обозначает отсутствие эффекта, стрелки – направление эффекта при его наличии. ↑ указывает, что сила эффекта не зависит от глюкозы. ↑ – эффект более выражен в нормальной глюкозе. ↑ – эффект более выражен в высокой глюкозе. Цвет фона обозначает различия в базовом уровне фосфорилирования / экспрессии белка или гена. Белый фон – отсутствие различий. Зеленый фон – базовый уровень выше в нормальной глюкозе. Красный фон – базовый уровень выше в высокой глюкозе.

Таблица 4. Влияние уровня глюкозы в среде на базовый уровень и выброс полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и оксипинов.

Путь	Кислота	LPS	PIC	АТФ
ПНЖК	AA	X	X	X
	DHA	X	X	X
	EPA	X	X	X
	AEA	↑	↑	X
	OEA	X	X	X

COX-pathway	11-HETE	↑	↑	↑
	PGD2	↑	↑	↑
	TXB2	↑	↑	↑
	6-keto-PGF1 α	↑	↑	X
	PGE2	↑	↑	X
	13-HDoHE	X	↑	X
	PGF2 α	↑	X	X
	PGA2	X	X	↑
	12-HHT	X	X	↑
LOX-pathway	12-HETE	↑	↑	X
	4-HDoHE	X	X	X
	8-HDoHE	X	X	X
	13-HODE	X	X	X
	9-HODE	X	X	X
CYP-pathway	18-HEPE	X	X	↓
	14,15-DHET	X	X	X
	17,18-DiHETE	X	X	X
	9,10-DiHOME	X	X	X
	12,13-DiHOME	X	X	X
	16-HDoHE	X	X	X
	20-HDoHE	X	X	X

X обозначает отсутствие эффекта, стрелки – направление эффекта при его наличии. ↑ указывает, что сила эффекта не зависит от глюкозы. ↑ – эффект более выражен в нормальной глюкозе. ↑ – эффект более выражен в высокой глюкозе. Цвет фона обозначает различия в базовом уровне высвобождения ПНЖК и оксилипинов. Белый фон – отсутствие различий. Зеленый фон – базовый уровень выше в нормальной глюкозе. Красный фон – базовый уровень выше в высокой глюкозе.

В данной работе было проведено комплексное исследование влияния метформина на энергетический метаболизм и TLR-зависимое воспаление в первичной культуре астроцитов крысы в условиях нормо- (NG, 5 мМ) и гипергликемии (HG, 22,5 мМ). С помощью метаболического анализатора Seahorse XFp были охарактеризованы параметры гликолиза (ECAR) и митохондриального дыхания (OCR) астроцитов. Установлено, что условия гипергликемии (48-часовое культивирование в HG) существенно влияют на базальные метаболические параметры астроцитов. Показано, что метформин модулирует энергетический метаболизм астроцитов, причём его эффекты различаются в условиях нормо- и гипергликемии, а также зависят от типа TLR-стимуляции. При анализе влияния метформина на LPS-стимулированные (TLR4) астроциты выявлено изменение показателей ECAR и OCR, свидетельствующее о перераспределении метаболических потоков между гликолизом и окислительным фосфорилированием [174,175,180]. При стимуляции PIC (TLR3) метформин также оказывал влияние на метаболические параметры, однако характер этого влияния отличался от наблюдаемого при TLR4-стимуляции, что указывает на зависимость эффектов метформина от типа активируемого сигнального пути. Данные результаты согласуются с представлениями о том, что метформин ингибирует комплекс I дыхательной цепи, что приводит к компенсаторному усилению гликолиза через АМПК-зависимую активацию фосфофруктокиназы-2 (PFK-2).

Исследование воспалительного профиля астроцитов показало, что метформин дифференциально влияет на экспрессию провоспалительных и противовоспалительных медиаторов при TLR4- и TLR3-зависимой стимуляции. При LPS-стимуляции (TLR4) метформин модулировал экспрессию TNF α , IL-1 β и IL-6, причём в условиях гипергликемии наблюдалось усиление эффекта, что согласуется с данными о повышенной восприимчивости астроцитов к воспалительной активации при высоком уровне глюкозы [14,100,186]. Отмечено, что уровень IL-6 регулировался особым образом, что может быть связано с его плеiotропным характером и двойственной ролью в нейровоспалении [193,194]. При PIC-стимуляции (TLR3) метформин влиял на экспрессию TNF α , IL-1 β , IL-6, iNOS и IL-10 (Рис. 21), при этом характер модуляции отличался от наблюдаемого при TLR4-активации, что отражает различия в сигнальных каскадах MyD88- и TRIF-зависимых путей [195].

Впервые было проведено комплексное исследование влияния метформина на профиль оксипинов в астроцитах при TLR-зависимой стимуляции методом UPLC-MS/MS. Установлено, что при LPS-стимуляции происходит значительное усиление продукции COX-зависимых оксипинов (11-HETE, 6-кето-PGF1 α , PGD2, TXB2, PGE2), а метформин модулирует данный ответ. При PIC-стимуляции наблюдался отличный от TLR4-зависимого профиль изменений оксипинов, с преимущественным вовлечением LOX-зависимых путей и ДНА-производных (4-HDoHE) (Рис. 21). Важно, что влияние гипергликемии на оксипиновый профиль существенно различалось при TLR4- и TLR3-стимуляции, указывая на специфичность метаболического контекста в регуляции липидных медиаторов воспаления [50,100].

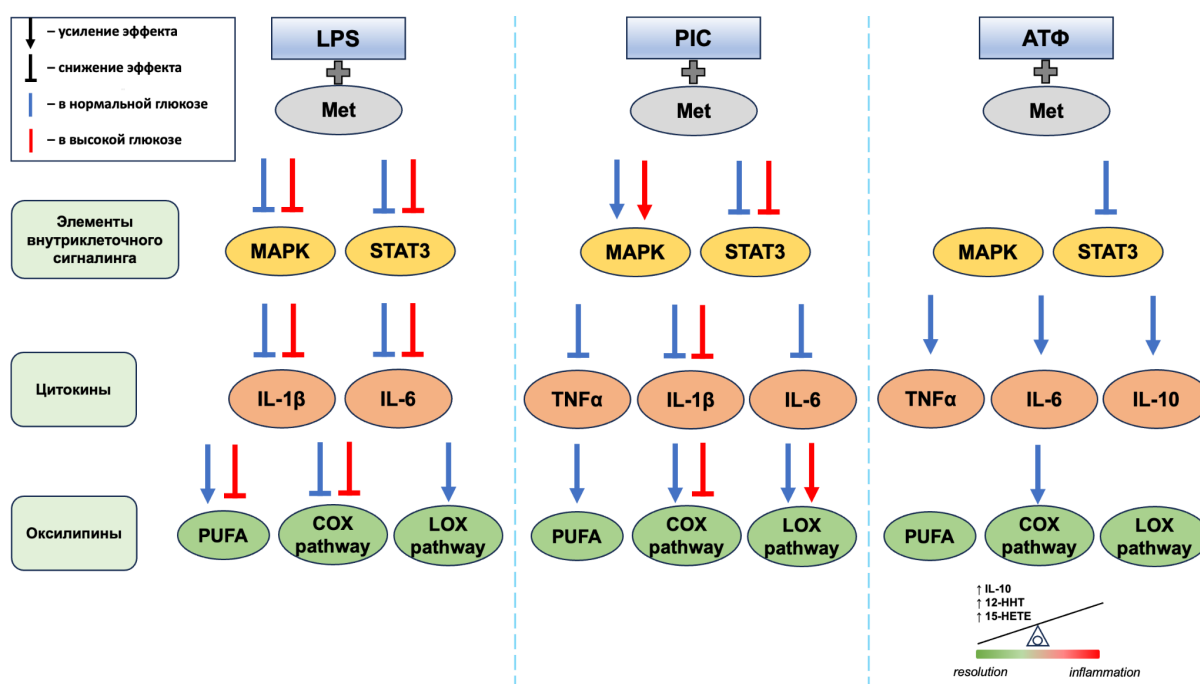


Рис. 21. Влияние метформина на стимуляцию астроцитов в разных уровнях глюкозы. ↓ – увеличение активации / экспрессии/ высвобождения относительно стимуляции (при наличии эффекта) или относительно контроля (при его отсутствии). ↑ – снижение активации / экспрессии/ высвобождения относительно стимуляции (при наличии эффекта) или относительно контроля (при его отсутствии). Синим цветом обозначены эффекты в нормальной глюкозе, красным – в высокой.

Изучение внутриклеточных сигнальных путей продемонстрировало, что метформин влияет на активацию ERK1/2 и STAT3 при LPS-стимуляции астроцитов. Показано, что метформин снижает LPS-индуцированное фосфорилирование ERK и STAT3, причём этот эффект зависит от условий гликемии [192,205,207]. Данные результаты свидетельствуют о том, что

противовоспалительное действие метформина в астроцитах может реализовываться через подавление MAPK- и STAT3-зависимых сигнальных каскадов, помимо его классического AMPK-зависимого механизма (Рис. 21).

В целом, совокупность полученных данных позволяет говорить о том, что метформин является комплексным модулятором метаболизма и воспалительного ответа астроцитов, действие которого зависит от типа TLR-стимуляции и условий гликемии. Влияние метформина на TLR4- и TLR3-зависимые ответы реализуется через различные механизмы: при TLR4-стимуляции ключевую роль играют пути ERK и STAT3, COX-зависимый синтез оксилипинов и NF-κB-опосредованная экспрессия цитокинов; при TLR3-стимуляции более выражено вовлечение TRIF-зависимых путей и LOX-опосредованного метаболизма полиненасыщенных жирных кислот. Гипергликемия, как правило, усиливает провоспалительный ответ астроцитов и модифицирует чувствительность к действию метформина.

Результаты исследования дополняют теоретические представления о роли астроцитов в нейровоспалении при метаболических нарушениях и расширяют понимание механизмов действия метформина 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. Практическая значимость работы определяется возможностью использования полученных данных для обоснования применения метформина в качестве потенциального нейропротекторного средства у пациентов с метаболическим синдромом и сахарным диабетом 2-го типа.

5. 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-1β и IL-6 независимо от глюкозы. При TLR3-активации его противовоспалительные эффекты (на TNFα и IL-6) зависят от гликемического статуса.
4. Метформин оказывает многоуровневое противовоспалительное действие: снижает активацию NF-κB/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 СОКРАЩЕНИЙ

TLR – Толл-подобный рецептор

LPS – липополисахарид

PIC – 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

СYP – цитохром P450

cPLA2 – цитозольная фосфолипаза A2

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

АФК – активные формы кислорода

OCR – скорость потребления кислорода

ECAR – скорость внеклеточного закисления

СССР – карбонилцианид м-хлорфенилгидразон

АМРК – АМФ-активируемая протеинкиназа

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. O'Neill, L.A.J., Kishton, R.J., Rathmell, J. (2016) A guide to immunometabolism for immunologists, *Nat. Rev. Immunol.*, **16**, 553–65, doi: 10.1038/nri.2016.70.
2. Kumar, V., Stewart, J.H. (2024) Pattern-Recognition Receptors and Immunometabolic Reprogramming: What We Know and What to Explore, *J. Innate Immun.*, **16**, 295–323, doi: 10.1159/000539278.
3. Kelly, B., O'Neill, L.A.J. (2015) Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity, *Cell Res.*, **25**, 771–84, doi: 10.1038/cr.2015.68.
4. 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., Weyand, 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.
5. Frank-Cannon, T.C., Alto, L.T., McAlpine, F.E., Tansey, M.G. (2009) Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?, *Mol. Neurodegener.*, **4**, doi: 10.1186/1750-1326-4-47.
6. Kruczkowska, W., Gałęziowska, J., Buczek, P., Płuciennik, E., Kciuk, M., Śliwińska, A. (2025) Overview of Metformin and Neurodegeneration: A Comprehensive Review, *Pharmaceuticals (Basel)*, **18**, doi: 10.3390/ph18040486.
7. Verkhatsky, A., Butt, A., Li, B., Illes, P., Zorec, R., Semyanov, A., Tang, Y., Sofroniew, M. V. (2023) Astrocytes in human central nervous system diseases: a frontier for new therapies, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **8**, doi: 10.1038/S41392-023-01628-9,.
8. 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.
9. Li, L., Acioglu, C., Heary, R.F., Elkabes, S. (2021) Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases, *Brain Behav. Immun.*, **91**, 740–55, doi: 10.1016/j.bbi.2020.10.007.
10. 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**, doi: 10.3390/IJMS19010113,.
11. Marinelli, C., Di Liddo, R., Facci, L., Bertalot, T., Conconi, M.T., Zusso, M., Skaper, S.D., Giusti, P. (2015) Ligand engagement of Toll-like receptors regulates their expression in cortical microglia and astrocytes, *J. Neuroinflammation*, **12**, doi: 10.1186/S12974-015-0458-6,.
 12. Calì, C., Cantando, I., Veloz Castillo, M.F., Gonzalez, L., Bezzi, P. (2024) Metabolic Reprogramming of Astrocytes in Pathological Conditions: Implications for Neurodegenerative Diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, doi: 10.3390/ijms25168922.
 13. Lauro, C., Limatola, C. (2020) Metabolic Reprogramming of Microglia in the Regulation of the Innate Inflammatory Response, *Front. Immunol.*, **11**, doi: 10.3389/fimmu.2020.00493.
 14. 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.
 15. Bahniwal, M., Little, J.P., Klegeris, A. (2017) High Glucose Enhances Neurotoxicity and Inflammatory Cytokine Secretion by Stimulated Human Astrocytes, *Curr. Alzheimer Res.*, **14**, doi: 10.2174/1567205014666170117104053.
 16. Xiao, Y., Pietzner, A., Rohwer, N., Jung, A., Rothe, M., Weylandt, K.H., Elbelt, U. (2023) Bioactive oxylipins in type 2 diabetes mellitus patients with and without hypertriglyceridemia, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **14**, doi: 10.3389/FENDO.2023.1195247,.
 17. 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.
 18. Chistyakov, D. V., Kovalenko, L. V., Donnikov, M.Y., Sergeeva, M.G. (2023) Blood Oxylipin Profiles as Markers of Oncological Diseases, *Biochemistry (Mosc)*, **88**, 621–9, doi: 10.1134/S000629792305005X.
 19. Di Virgilio, F., Vultaggio-Poma, V., Falzoni, S., Giuliani, A.L. (2023) Extracellular ATP: A powerful inflammatory mediator in the central nervous system, *Neuropharmacology*, **224**, doi: 10.1016/j.neuropharm.2022.109333.

20. Franke, H., Verkhratsky, A., Burnstock, G., Illes, P. (2012) Pathophysiology of astroglial purinergic signalling, *Purinergic Signal.*, **8**, 629, doi: 10.1007/s11302-012-9300-0.
21. Verkhratsky, A., Burnstock, G. (2014) Biology of purinergic signalling: Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance, *BioEssays*, **36**, 697–705, doi: 10.1002/BIES.201400024,.
22. Lin, H., Ao, H., Guo, G., Liu, M. (2023) The Role and Mechanism of Metformin in Inflammatory Diseases, *J. Inflamm. Res.*, **16**, 5545–64, doi: 10.2147/JIR.S436147.
23. Lamoia, T.E., Shulman, G.I. (2021) Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action, *Endocr. Rev.*, **42**, 77–96, doi: 10.1210/endrev/bnaa023.
24. Akter, K.A., Sharma, S., Sifat, A.E., Zhang, Y., Patel, D.K., Cucullo, L., Abbruscato, T.J. (2024) Metformin ameliorates neuroinflammatory environment for neurons and astrocytes during in vitro and in vivo stroke and tobacco smoke chemical exposure: Role of Nrf2 activation, *Redox Biol.*, **75**, doi: 10.1016/j.redox.2024.103266.
25. Wang, G., Cui, W., Chen, S., Shao, Z., Li, Y., Wang, W., Mao, L., Li, J., Mei, X. (2021) Metformin alleviates high glucose-induced ER stress and inflammation by inhibiting the interaction between caveolin1 and AMPK α in rat astrocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **534**, 908–13, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.075.
26. Li, N., Zhou, T., Fei, E. (2022) Actions of Metformin in the Brain: A New Perspective of Metformin Treatments in Related Neurological Disorders, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, doi: 10.3390/ijms23158281.
27. Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, **1**, 135–45, doi: 10.1038/35100529.
28. Takeda, K., Akira, S. (2015) Toll-like receptors, *Curr. Protoc. Immunol.*, **109**, 14.12.1-14.12.10, doi: 10.1002/0471142735.im1412s109.
29. Matzinger, P. (2002) The danger model: a renewed sense of self, *Science*, **296**, 301–5, doi: 10.1126/science.1071059.
30. Medzhitov, R., Schneider, D.S., Soares, M.P. (2012) Disease tolerance as a defense strategy, *Science*, **335**, 936–41, doi: 10.1126/science.1214935.
31. Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity, *Trends Immunol.*, **28**, 138–45, doi: 10.1016/j.it.2007.01.005.

32. Carpenter, S., O'Neill, L.A.J. (2024) From periphery to center stage: 50 years of advancements in innate immunity, *Cell*, **187**, 2030–51, doi: 10.1016/j.cell.2024.03.036.
33. Medzhitov, R., Horng, T. (2009) Transcriptional control of the inflammatory response, *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 692–703, doi: 10.1038/nri2634.
34. Newton, K., Dixit, V.M. (2012) Signaling in innate immunity and inflammation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, doi: 10.1101/cshperspect.a006049.
35. 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.
36. 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.
37. Nathan, C., Ding, A. (2010) Nonresolving Inflammation, *Cell*, **140**, 871–82, doi: 10.1016/j.cell.2010.02.029.
38. Serhan, C.N. (2017) Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms, *FASEB J.*, **31**, 1273–88, doi: 10.1096/fj.201601222R.
39. Dennis, E.A., Norris, P.C. (2015) Eicosanoid storm in infection and inflammation, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 511–23, doi: 10.1038/NRI3859.
40. 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.
41. 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.
42. Kawasaki, T., Kawai, T. (2014) Toll-like receptor signaling pathways, *Front. Immunol.*, **5**, doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
43. Hopfner, K.P., Hornung, V. (2020) Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 501–21, doi: 10.1038/s41580-020-0244-x.
44. Karki, R., Kanneganti, T.D. (2021) The ‘cytokine storm’: molecular mechanisms and therapeutic prospects, *Trends Immunol.*, **42**, 681–705, doi: 10.1016/j.it.2021.06.001.

45. Shen, H., Tesar, B.M., Walker, W.E., Goldstein, D.R. (2008) Dual Signaling of MyD88 and TRIF Is Critical for Maximal TLR4-Induced Dendritic Cell Maturation, *The Journal of Immunology*, **181**, 1849–58, doi: 10.4049/JIMMUNOL.181.3.1849,.
46. Pereira, M., Durso, D.F., Bryant, C.E., Kurt-Jones, E.A., Silverman, N., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T. (2022) The IRAK4 scaffold integrates TLR4-driven TRIF and MYD88 signaling pathways, *Cell Rep.*, **40**, doi: 10.1016/j.celrep.2022.111225.
47. Zhang, C., Yang, Y. (2024) Targeting toll-like receptor 4 (TLR4) and the NLRP3 inflammasome: Novel and emerging therapeutic targets for hyperuricaemia nephropathy, *Biomolecules and Biomedicine*, **24**, 688–97, doi: 10.17305/BB.2023.9838,.
48. Jiang, Z., Mak, T.W., Sen, G., Li, X. (2004) Toll-like receptor 3-mediated activation of NF- κ B and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN- β , *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 3533–8, doi: 10.1073/PNAS.0308496101,.
49. Luan, X., Wang, L., Song, G., Zhou, W. (2024) Innate immune responses to RNA: sensing and signaling, *Front. Immunol.*, **15**, doi: 10.3389/FIMMU.2024.1287940,.
50. Melissa Gabbs., Leng, S., Devassy, J.G., Monirujjaman, M., Aukema, H.M. (2015) Advances in our understanding of oxylipins derived from dietary PUFAs 1,2, *Advances in Nutrition*, **6**, 513–40, doi: 10.3945/an.114.007732.
51. Rouzer, C.A., Marnett, L.J. (2009) Cyclooxygenases: Structural and functional insights, *J. Lipid Res.*, **50**, doi: 10.1194/jlr.R800042-JLR200.
52. 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.
53. Chen, S., Zou, H. (2022) Lipoxygenase Metabolism: Critical Pathways in Microglia-mediated Neuroinflammation and Neurodevelopmental Disorders, *Neurochem. Res.*, **47**, 3213–20, doi: 10.1007/S11064-022-03645-6,.
54. Imig, J.D., Hammock, B.D. (2009) Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8**, 794–805, doi: 10.1038/NRD2875,.
55. Gilroy, D.W., Edin, M.L., Maeyer, R.P.H.D., Bystrom, J., Newson, J., Lih, F.B., Stables, M., Zeldin, D.C., Bishop-Bailey, D. (2016) CYP450-derived

- oxylipins mediate inflammatory resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **113**, E3240–9, doi: 10.1073/PNAS.1521453113,.
56. Serhan, C.N., Chiang, N., Dalli, J., Levy, B.D. (2015) Lipid mediators in the resolution of inflammation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A016311,.
 57. Livne-Bar, I., Wei, J., Liu, H.H., Alqawlaq, S., Won, G.J., Tuccitto, A., Gronert, K., Flanagan, J.G., Sivak, J.M. (2017) Astrocyte-derived lipoxins A 4 and B 4 promote neuroprotection from acute and chronic injury, *Journal of Clinical Investigation*, **127**, 4403–14, doi: 10.1172/JCI77398,.
 58. Shi, Z., He, Z., Wang, D.W. (2022) CYP450 Epoxygenase Metabolites, Epoxyeicosatrienoic Acids, as Novel Anti-Inflammatory Mediators, *Molecules*, **27**, doi: 10.3390/MOLECULES27123873,.
 59. Weiser, M.J., Butt, C.M., Mohajeri, M.H. (2016) Docosahexaenoic acid and cognition throughout the lifespan, *Nutrients*, **8**, doi: 10.3390/NU8020099,.
 60. Serhan, C.N., Levy, B.D. (2018) Resolvins in inflammation: Emergence of the pro-resolving superfamily of mediators, *Journal of Clinical Investigation*, **128**, 2657–69, doi: 10.1172/JCI97943,.
 61. Myers, M.N., Chirivi, M., dos Santos Neto, J.M., Parales-Girón, J., Worden, L.C., Lock, A.L., Contreras, G.A. (2025) Dynamics of oxylipin biosynthesis in systemic inflammation: insights from a large animal model of endotoxemia, *Front. Immunol.*, **16**, doi: 10.3389/FIMMU.2025.1595888,.
 62. Misheva, M., Johnson, J., McCullagh, J. (2022) Role of Oxylipins in the Inflammatory-Related Diseases NAFLD, Obesity, and Type 2 Diabetes, *Metabolites*, **12**, doi: 10.3390/METABO12121238,.
 63. Xiao, Y., Pietzner, A., Rohwer, N., Jung, A., Rothe, M., Weylandt, K.H., Elbelt, U. (2023) Bioactive oxylipins in type 2 diabetes mellitus patients with and without hypertriglyceridemia, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **14**, doi: 10.3389/fendo.2023.1195247.
 64. Wang, W., Zhong, X., Guo, J. (2021) Role of 2-series prostaglandins in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease (Review), *Int. J. Mol. Med.*, **47**, doi: 10.3892/IJMM.2021.4947,.
 65. 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.

66. Crouch, M.J., Kosaraju, R., Guesdon, W., Armstrong, M., Reisdorph, N., Jain, R., Fenton, J., Shaikh, S.R. (2019) Frontline Science: A reduction in DHA-derived mediators in male obesity contributes toward defects in select B cell subsets and circulating antibody, *J. Leukoc. Biol.*, **106**, 241–57, doi: 10.1002/JLB.3HI1017-405RR.
67. Jiménez-Franco, A., Castañé, H., Martínez-Navidad, C., Placed-Gallego, C., Hernández-Aguilera, A., Fernández-Arroyo, S., Samarra, I., Canela-Capdevila, M., Arenas, M., Zorzano, A., Hernández-Alvarez, M.I., Castillo, D. del., Paris, M., Menendez, J.A., Camps, J., Joven, J. (2024) Metabolic adaptations in severe obesity: Insights from circulating oxylipins before and after weight loss, *Clinical Nutrition*, **43**, 246–58, doi: 10.1016/j.clnu.2023.12.002.
68. Buczynski, M.W., Dumlaio, 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.
69. 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.
70. 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.
71. Azbukina, N. V., Lopachev, A. V., Chistyakov, D. V., Goriainov, S. V., Astakhova, A.A., Poleshuk, V. V., Kazanskaya, R.B., Fedorova, T.N., Sergeeva, M.G. (2020) Oxylipin Profiles in Plasma of Patients with Wilson’s Disease, *Metabolites*, **10**, doi: 10.3390/metabo10060222.
72. 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, *J. Mass Spectrom.*, **56**, doi: 10.1002/jms.4781.
73. Joffre, C., Joffre, C. (2019) Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism in the Brain and Brain Cells, *Feed Your Mind - How Does Nutrition Modulate Brain Function throughout Life?*, doi: 10.5772/INTECHOPEN.88232.
74. 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**, doi: 10.3390/IJMS21051780,.
75. 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,.
 76. Font-Nieves, M., Sans-Fons, M.G., Gorina, R., Bonfill-Teixidor, E., Salas-Perdomo, A., Mañquez-Kisinousky, L., Santalucia, T., Planas, A.M. (2012) Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E 2 production in astrocytes, *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 6454–68, doi: 10.1074/JBC.M111.327874,.
 77. 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 a β degradation capacity of human fetal astrocytes in an ex vivo assay, *Front. Neurosci.*, **11**, doi: 10.3389/FNINS.2017.00299,.
 78. 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.
 79. Loftus, R.M., Finlay, D.K. (2016) Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator, *J. Biol. Chem.*, **291**, 1–10, doi: 10.1074/jbc.R115.693903.
 80. Warburg Berlin-Dahlem, O. THE METABOLISM OF CARCINOMA CELLS.
 81. Burda, J.E., Sofroniew, M. V. (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease, *Neuron*, **81**, 229–48, doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.034.
 82. Sofroniew, M. V. (2020) Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity, *Trends Immunol.*, **41**, 758–70, doi: 10.1016/j.it.2020.07.004.
 83. Verkhatsky, A., Arranz, A.M., Ciuba, K., Pękowska, A. (2022) Evolution of neuroglia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1518**, 120–30, doi: 10.1111/NYAS.14917,.
 84. von Bartheld, C.S., Bahney, J., Herculano-Houzel, S. (2016) The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150

- years of cell counting, *Journal of Comparative Neurology*, **524**, 3865–95, doi: 10.1002/CNE.24040,.
85. Sofroniew, M. V., Vinters, H. V. (2010) Astrocytes: Biology and pathology, *Acta Neuropathol.*, **119**, 7–35, doi: 10.1007/S00401-009-0619-8,.
 86. Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., Barres, B.A. (2001) Control of synapse number by glia, *Science (1979)*., **291**, 657–61, doi: 10.1126/SCIENCE.291.5504.657,.
 87. 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., Pfrieger, 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,.
 88. Colombo, E., Farina, C. (2016) Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation, *Trends Immunol.*, **37**, 608–20, doi: 10.1016/j.it.2016.06.006.
 89. Whitney, N.P., Eidem, T.M., Peng, H., Huang, Y., Zheng, J.C. (2009) Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: Relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders, *J. Neurochem.*, **108**, 1343–59, doi: 10.1111/J.1471-4159.2009.05886.X,.
 90. Chistyakov, D. V., Aleshin, S.E., Astakhova, A.A., Sergeeva, M.G., Reiser, G. (2015) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) α and γ Of rat brain astrocytes in the course of activation by toll-like receptor agonists, *J. Neurochem.*, **134**, 113–24, doi: 10.1111/JNC.13101,.

91. Gorina, R., Font-Nieves, M., Márquez-Kisinousky, L., Santalucia, T., Planas, A.M. (2011) Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways, *Glia*, **59**, 242–55, doi: 10.1002/glia.21094.
92. Lee, M.S., Kim, Y.J. (2007) Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk, *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 447–80, doi: 10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.76.060605.122847,.
93. 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**, doi: 10.3390/CELLS8121553,.
94. Popli, S., Chakravarty, S., Fan, S., Glanz, A., Aras, S., Nagy, L.E., Sen, G.C., Chakravarti, R., Chattopadhyay, S. (2022) IRF3 inhibits nuclear translocation of NF-κB to prevent viral inflammation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **119**, doi: 10.1073/PNAS.2121385119/-/DCSUPPLEMENTAL.
95. Chen, Y., Lin, J., Zhao, Y., Ma, X., Yi, H. (2021) Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses, *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, **22**, 609–32, doi: 10.1631/JZUS.B2000808,.
96. Kielian, T. (2009) Overview of toll-like receptors in the CNS, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **336**, 1–14, doi: 10.1007/978-3-642-00549-7_1,.
97. Frenkel, D., Trudler, D., Farfara, D. (2010) Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: Towards future therapeutic application, *Mediators Inflamm.*, **2010**, doi: 10.1155/2010/497987,.
98. 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, *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20*, **20**, doi: 10.3390/ijms20163894.
99. Staricha, K., Meyers, N., Garvin, J., Liu, Q., Rarick, K., Harder, D., Cohen, S. (2020) Effect of High Glucose Condition on Glucose Metabolism in Primary Astrocytes, *Brain Res.*, **1732**, 146702, doi: 10.1016/j.brainres.2020.146702.
100. 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.
101. Iadecola, C., Nedergaard, M. (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature, *Nat. Neurosci.*, **10**, 1369–76, doi: 10.1038/nn2003.
 102. Chuquet, J., Quilichini, P., Nimchinsky, E.A., Buzsáki, G. (2010) Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex, *J. Neurosci.*, **30**, 15298–303, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0762-10.2010.
 103. Pellerin, L., Magistretti, P.J. (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 10625–9, doi: 10.1073/pnas.91.22.10625.
 104. Bouzier-Sore, A.K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J.M., Pellerin, L. (2006) Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study, *Eur. J. Neurosci.*, **24**, 1687–94, doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05056.x.
 105. Bak, L.K., Walls, A.B. (2018) Astrocytic glycogen metabolism in the healthy and diseased brain, *Journal of Biological Chemistry*, **293**, 7108–16, doi: 10.1074/jbc.R117.803239.
 106. Wu, H., Mi, Y., Zheng, C., Zhang, Y., Xu, S., Zhu, J., Jin, T. (2025) Metabolic reprogramming of glial cells: Fatty acid pathways as regulators of remyelination in multiple sclerosis, *Neurobiol. Dis.*, **217**, doi: 10.1016/j.nbd.2025.107179.
 107. 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**, doi: 10.1016/J.NEUINT.2019.104513.
 108. McCarthy, K.D., De Vellis, J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue, *J. Cell Biol.*, **85**, 890–902, doi: 10.1083/jcb.85.3.890.
 109. Khakh, B.S., Burnstock, G. (2009) The double life of ATP, *Sci. Am.*, **301**, 84–92, doi: 10.1038/scientificamerican1209-84.
 110. Dubyak, G.R. (1991) Signal transduction by P2-purinergetic receptors for extracellular ATP, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **4**, 295–300, doi: 10.1165/ajrcmb/4.4.295.

111. Kuboyama, K., Harada, H., Tozaki-Saitoh, H., Tsuda, M., Ushijima, K., Inoue, K. (2011) Astrocytic P2Y(1) receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **31**, 1930–41, doi: 10.1038/jcbfm.2011.49.
112. Lim, D., Semyanov, A., Genazzani, A., Verkhratsky, A. (2021) Calcium signaling in neuroglia, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **362**, 1–53, doi: 10.1016/bs.ircmb.2021.01.003.
113. Verkhratsky, A. (2021) Early evolutionary history (from bacteria to hemichordata) of the omnipresent purinergic signalling: A tribute to Geoff Burnstock inquisitive mind, *Biochem. Pharmacol.*, **187**, doi: 10.1016/j.bcp.2020.114261.
114. Miras-Portugal, M.T., Menéndez-Méndez, A., Gómez-Villafuertes, R., Ortega, F., Delicado, E.G., Pérez-Sen, R., Gualix, J. (2019) Physiopathological Role of the Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT) in the Central Nervous System: Relevance of the Vesicular Nucleotide Release as a Potential Therapeutic Target, *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, doi: 10.3389/fncel.2019.00224.
115. Taruno, A. (2018) ATP release channels, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, doi: 10.3390/IJMS19030808,.
116. Zimmermann, H. (2021) History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling, *Biochem. Pharmacol.*, **187**, doi: 10.1016/j.bcp.2020.114322.
117. Newman, E.A. (2001) Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells, *J. Neurosci.*, **21**, 2215–23, doi: 10.1523/jneurosci.21-07-02215.2001.
118. Beamer, E., Gölöncsér, F., Horváth, G., Beko, K., Otrókoci, L., Koványi, B., Sperlágh, B. (2016) Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior, *Neuropharmacology*, **104**, 94–104, doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.019.
119. Illes, P., Verkhratsky, A., Burnstock, G., Franke, H. (2012) P2X receptors and their roles in astroglia in the central and peripheral nervous system, *Neuroscientist*, **18**, 422–38, doi: 10.1177/1073858411418524.
120. Fitz, J.G. (2007) Regulation of Cellular Atp Release, *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.*, **118**, 199.

121. Brandao-Burch, A., Key, M.L., Patel, J.J., Arnett, T.R., Orriss, I.R. (2012) The P2X7 Receptor is an Important Regulator of Extracellular ATP Levels, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **3**, doi: 10.3389/fendo.2012.00041.
122. Idzko, M., Ferrari, D., Eltzschig, H.K. (2014) Nucleotide signalling during inflammation, *Nature*, **509**, 310–7, doi: 10.1038/nature13085.
123. Cauwels, A., Rogge, E., Vandendriessche, B., Shiva, S., Brouckaert, P. (2014) Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality, *Cell Death Dis.*, **5**, doi: 10.1038/cddis.2014.70.
124. Pedata, F., Melani, A., Pugliese, A.M., Coppi, E., Cipriani, S., Traini, C. (2007) The role of ATP and adenosine in the brain under normoxic and ischemic conditions, *Purinergic Signal.*, **3**, 299–310, doi: 10.1007/s11302-007-9085-8.
125. Burnstock, G. (2018) Purine and purinergic receptors, *Brain Neurosci. Adv.*, **2**, doi: 10.1177/2398212818817494.
126. North, R.A., Verkhratsky, A. (2006) Purinergic transmission in the central nervous system, *Pflugers Arch.*, **452**, 479–85, doi: 10.1007/s00424-006-0060-y.
127. Liang, X., Samways, D.S.K., Wolf, K., Bowles, E.A., Richards, J.P., Bruno, J., Dutertre, S., DiPaolo, R.J., Egan, T.M. (2015) Quantifying Ca²⁺ current and permeability in ATP-gated P2X7 receptors, *Journal of Biological Chemistry*, **290**, 7930–42, doi: 10.1074/jbc.M114.627810.
128. Sergeeva, M., Strokin, M., Wang, H., Ubl, J.J., Reiser, G. (2003) Arachidonic acid in astrocytes blocks Ca²⁺ oscillations by inhibiting store-operated Ca²⁺ entry, and causes delayed Ca²⁺ influx, *Cell Calcium*, **33**, 283–92, doi: 10.1016/S0143-4160(03)00011-3.
129. Strokin, M., Sergeeva, M., Reiser, G. (2011) Proinflammatory treatment of astrocytes with lipopolysaccharide results in augmented Ca²⁺ signaling through increased expression of inositol phospholipase A2 (iPLA2), *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **300**, doi: 10.1152/ajpcell.00428.2010.
130. Hirayama, Y., Ikeda-Matsuo, Y., Notomi, S., Enaida, H., Kinouchi, H., Koizumi, S. (2015) Astrocyte-mediated ischemic tolerance, *J. Neurosci.*, **35**, 3794–805, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4218-14.2015.
131. Papp, L., Vizi, E.S., Sperl agh, B. (2007) P2X7 receptor mediated phosphorylation of p38MAP kinase in the hippocampus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**, 568–74, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.02.014.

132. Amstrup, J., Novak, I. (2003) P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx, *Biochem. J.*, **374**, 51–61, doi: 10.1042/BJ20030585.
133. Liu, W., Li, D., Zhang, M., Yin, J., Wang, P., Liu, P., Song, Z., Ni, B., Peng, Y. (2025) ATP/P2X7 receptor signal aggravates ischemic stroke injury by activating Th17 cells via STAT3/IL-21 pathway, *Front. Immunol.*, **16**, doi: 10.3389/fimmu.2025.1558307.
134. Territo, P.R., Zarrinmayeh, H. (2021) P2X7 Receptors in Neurodegeneration: Potential Therapeutic Applications From Basic to Clinical Approaches, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, doi: 10.3389/fncel.2021.617036.
135. Feng, L., Chen, Y., Ding, R., Fu, Z., Yang, S., Deng, X., Zeng, J. (2015) P2X7R blockade prevents NLRP3 inflammasome activation and brain injury in a rat model of intracerebral hemorrhage: involvement of peroxynitrite, *J. Neuroinflammation*, **12**, doi: 10.1186/s12974-015-0409-2.
136. Zhang, Y., Yin, H.-Y., Rubini, P., Tang, Y., Illes, P. (2022) A Possible Causal Involvement of Neuroinflammatory, Purinergic P2X7 Receptors in Psychiatric Disorders, *Curr. Neuropharmacol.*, **20**, 2142–55, doi: 10.2174/1570159x20666220302152400.
137. Bedetta, M., Pizzo, P., Lia, A. (2025) The Multifaceted Role of P2X7R in Microglia and Astrocytes, *Neurochem. Res.*, **50**, doi: 10.1007/s11064-025-04502-y.
138. Kopp, R., Krautloher, A., Ramírez-Fernández, A., Nicke, A. (2019) P2X7 Interactions and Signaling - Making Head or Tail of It, *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, doi: 10.3389/fnmol.2019.00183.
139. Gebicke-Haerter, P.J., Wurster, S., Schobert, A., Hertting, G. (1988) P2-purinoceptor induced prostaglandin synthesis in primary rat astrocyte cultures, *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.*, **338**, 704–7, doi: 10.1007/BF00165638,.
140. Brambilla, R., Neary, J.T., Cattabeni, F., Cottini, L., D'Ippolito, G., Schiller, P.C., Abbracchio, M.P. (2002) Induction of COX-2 and reactive gliosis by P2Y receptors in rat cortical astrocytes is dependent on ERK1/2 but independent of calcium signalling, *J. Neurochem.*, **83**, 1285–96, doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01239.x.
141. Domercq, M., Brambilla, L., Pilati, E., Marchaland, J., Volterra, A., Bezzi, P. (2006) P2Y1 Receptor-evoked Glutamate Exocytosis from Astrocytes,

- Journal of Biological Chemistry*, **281**, 30684–96, doi: 10.1074/jbc.m606429200.
142. Alharbi, S.H. (2024) Anti-inflammatory role of glucagon-like peptide 1 receptor agonists and its clinical implications, *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.*, **15**, doi: 10.1177/20420188231222367.
 143. Ceriello, A. (2008) Thiazolidinediones as anti-inflammatory and anti-atherogenic agents, *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, **24**, 14–26, doi: 10.1002/dmrr.790.
 144. Alsereidi, F.R., Khashim, Z., Marzook, H., Gupta, A., Al-Rawi, A.M., Ramadan, M.M., Saleh, M.A. (2024) Targeting inflammatory signaling pathways with SGLT2 inhibitors: Insights into cardiovascular health and cardiac cell improvement, *Curr. Probl. Cardiol.*, **49**, doi: 10.1016/j.cpcardiol.2024.102524.
 145. Bai, B., Chen, H. (2021) Metformin: A Novel Weapon Against Inflammation, *Front. Pharmacol.*, **12**, doi: 10.3389/fphar.2021.622262.
 146. Al-kuraishy, H.M., Sulaiman, G.M., Saad, H.M., Mohammed, H.A., Abomughaid, M.M., Al-Gareeb, A.I., Albuhadily, A.K. (2025) The Effect of Metformin on Astrocytes in Parkinson’s Disease: Challenges and Opportunities, *Mol. Neurobiol.*, **62**, 15055–69, doi: 10.1007/s12035-025-05098-8.
 147. Nowell, J., Blunt, E., Gupta, D., Edison, P. (2023) Antidiabetic agents as a novel treatment for Alzheimer’s and Parkinson’s disease, *Ageing Res. Rev.*, **89**, doi: 10.1016/j.arr.2023.101979.
 148. Cameron, A.R., Morrison, V.L., Levin, D., Mohan, M., Forteach, C., Beall, C., McNeilly, A.D., Balfour, D.J.K., Savinko, T., Wong, A.K.F., Viollet, B., Sakamoto, K., Fagerholm, S.C., Foretz, M., Lang, C.C., Rena, G. (2016) Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status, *Circ. Res.*, **119**, 652–65, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308445.
 149. Kodali, M., Attaluri, S., Madhu, L.N., Shuai, B., Upadhya, R., Gonzalez, J.J., Rao, X., Shetty, A.K. (2021) Metformin treatment in late middle age improves cognitive function with alleviation of microglial activation and enhancement of autophagy in the hippocampus, *Ageing Cell*, **20**, doi: 10.1111/accel.13277.
 150. Prakash, R., Li, W., Qu, Z., Johnson, M.A., Fagan, S.C., Ergul, A. (2013) Vascularization pattern after ischemic stroke is different in control versus diabetic rats: relevance to stroke recovery, *Stroke*, **44**, 2875–82, doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001660.

151. Ryu, Y.K., Go, J., Park, H.Y., Choi, Y.K., Seo, Y.J., Choi, J.H., Rhee, M., Lee, T.G., Lee, C.H., Kim, K.S. (2020) Metformin regulates astrocyte reactivity in Parkinson's disease and normal aging, *Neuropharmacology*, **175**, doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108173.
152. Pilipenko, V., Narbute, K., Pupure, J., Langrate, I.K., Muceniece, R., Kluša, V. (2020) Neuroprotective potential of antihyperglycemic drug metformin in streptozocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease, *Eur. J. Pharmacol.*, **881**, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173290.
153. Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action, *Journal of Clinical Investigation*, **108**, 1167–74, doi: 10.1172/JCI13505,.
154. Yan, Z., Tian, X., Zhu, J., Lu, Z., Yu, L., Zhang, D., Liu, Y., Yang, C., Zhu, Q., Cao, X. (2018) Metformin suppresses UHMWPE particle-induced osteolysis in the mouse calvaria by promoting polarization of macrophages to an anti-inflammatory phenotype, *Mol. Med.*, **24**, doi: 10.1186/s10020-018-0013-x.
155. Vasamsetti, S.B., Karnewar, S., Kanugula, A.K., Thatipalli, A.R., Kumar, J.M., Kotamraju, S. (2015) Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis, *Diabetes*, **64**, 2028–41, doi: 10.2337/db14-1225.
156. Colombo, S.L., Moncada, S. (2009) AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells, *Biochem. J.*, **421**, 163–9, doi: 10.1042/BJ20090613.
157. Zhao, B., Wang, X., Zheng, J., Wang, H., Liu, J. (2016) Effects of metformin treatment on glioma-induced brain edema, *Am. J. Transl. Res.*, **8**, 3351.
158. Wang, M., Tian, T., Zhou, H., Jiang, S.Y., Jiao, Y.Y., Zhu, Z., Xia, J., Ma, J.H., Du, R.H. (2024) Metformin normalizes mitochondrial function to delay astrocyte senescence in a mouse model of Parkinson's disease through Mfn2-cGAS signaling, *J. Neuroinflammation*, **21**, doi: 10.1186/s12974-024-03072-0.
159. do Nascimento, N.B., Farias, H.R., Schons, T., Padilha, A.P.Z., Costa, M.V., Peres, A.M., da Silva, L. dos S., Dantas, R.M., Ramos, J.M.O., Rodrigues, M.S., Telles, F., Guma, F.T.C.R., Moreira, J.C.F., Bast,

- R.K.S.S., de Bem, A.F., de Oliveira, J. (2026) Metformin Ameliorates Cognitive Deficits and Neuroinflammation in a Mouse Model of Familial Hypercholesterolemia, *Neurochem. Res.*, **51**, doi: 10.1007/s11064-025-04658-7.
160. Hohnholt, M.C., Blumrich, E.M., Waagepetersen, H.S., Dringen, R. (2017) The antidiabetic drug metformin decreases mitochondrial respiration and tricarboxylic acid cycle activity in cultured primary rat astrocytes, *J. Neurosci. Res.*, **95**, 2307–20, doi: 10.1002/jnr.24050.
161. Madiraju, A.K., Qiu, Y., Perry, R.J., Rahimi, Y., Zhang, X.M., Zhang, D., Camporez, J.P.G., Cline, G.W., Butrico, G.M., Kemp, B.E., Casals, G., Steinberg, G.R., Vatner, D.F., Petersen, K.F., Shulman, G.I. (2018) Metformin inhibits gluconeogenesis via a redox-dependent mechanism in vivo, *Nat. Med.*, **24**, 1384–94, doi: 10.1038/s41591-018-0125-4.
162. Svirskiene, N., Svirskis, G., Jankeviciute, S., Borutaite, V. (2025) Effect of metformin on spontaneous calcium signaling in cultured astrocytes during normoxic and hypoxic conditions, *Arch. Biochem. Biophys.*, **771**, doi: 10.1016/j.abb.2025.110494.
163. De Oliveira, W.H., De Santana Nunes, A.K., De França, M.E.R., Dos Santos, L.A., Lós, D.B., Rocha, S.W.S., De Sousa Barbosa, K.P., Rodrigues, G.B., Peixoto, C.A. (2016) Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice, *Brain Res.*, **1644**, 149–60, doi: 10.1016/J.BRAINRES.2016.05.013,.
164. Wang, C., Liu, C., Gao, K., Zhao, H., Zhou, Z., Shen, Z., Guo, Y., Li, Z., Yao, T., Mei, X. (2016) Metformin preconditioning provide neuroprotection through enhancement of autophagy and suppression of inflammation and apoptosis after spinal cord injury, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **477**, 534–40, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.148.
165. Karimipour, M., Shojaei Zarghani, S., Mohajer Milani, M., Soraya, H. (2018) Pre-Treatment with Metformin in Comparison with Post-Treatment Reduces Cerebral Ischemia Reperfusion Induced Injuries in Rats, *Bull. Emerg. Trauma*, **6**, 115–21, doi: 10.29252/BEAT-060205,.
166. Zhou, Z., Tang, Y., Jin, X., Chen, C., Lu, Y., Liu, L., Shen, C. (2016) Metformin Inhibits Advanced Glycation End Products-Induced Inflammatory Response in Murine Macrophages Partly through AMPK Activation and RAGE/NF B Pathway Suppression, *J. Diabetes Res.*, **2016**, doi: 10.1155/2016/4847812,.

167. Zhu, X.C., Jiang, T., Zhang, Q.Q., Cao, L., Tan, M.S., Wang, H.F., Ding, Z.Z., Tan, L., Yu, J.T. (2015) Chronic Metformin Preconditioning Provides Neuroprotection via Suppression of NF- κ B-Mediated Inflammatory Pathway in Rats with Permanent Cerebral Ischemia, *Mol. Neurobiol.*, **52**, 375–85, doi: 10.1007/S12035-014-8866-7,.
168. 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**, doi: 10.3390/IJMS19010113.
169. Yoo, I., Ahn, I., Lee, J., Lee, N. (2024) Extracellular flux assay (Seahorse assay): Diverse applications in metabolic research across biological disciplines, *Mol. Cells*, **47**, doi: 10.1016/J.MOCELL.2024.100095,.
170. Westergaard, N., Sonnewald, U., Schousboe, A. (1995) Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: The glutamate/glutamine cycle revisited, *Dev. Neurosci.*, **17**, 203–11, doi: 10.1159/000111288,.
171. 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,.
172. 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,.
173. 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**, 57–73, doi: 10.1042/AN20090048,.
174. Li, W., Chaudhari, K., Shetty, R., Winters, A., Gao, X., Hu, Z., Ge, W.P., Sumien, N., Forster, M., Liu, R., Yang, S.H. (2019) Metformin Alters Locomotor and Cognitive Function and Brain Metabolism in Normoglycemic Mice, *Aging Dis.*, **10**, 949–63, doi: 10.14336/AD.2019.0120.
175. Bridges, H.R., Jones, A.J.Y., Pollak, M.N., Hirst, J. (2014) Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria, *Biochemical Journal*, **462**, 475–87, doi: 10.1042/BJ20140620,.
176. Scott, L.M., Vincent, E.E., Hudson, N., Neal, C., Jones, N., Lavelle, E.C., Campbell, M., Halestrap, A.P., Dick, A.D., Theodoropoulou, S. (2021)

- Interleukin-33 regulates metabolic reprogramming of the retinal pigment epithelium in response to immune stressors, *JCI Insight*, **6**, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.129429.
177. Ahmed, D., Roy, D., Jaworski, A., Edwards, A., Abizaid, A., Kumar, A., Golshani, A., Cassol, E. (2019) Differential remodeling of the electron transport chain is required to support TLR3 and TLR4 signaling and cytokine production in macrophages, *Sci. Rep.*, **9**, doi: 10.1038/S41598-019-55295-4,.
 178. Basit, F., van Oorschot, T., van Buggenum, J., Derks, R.J.E., Kostidis, S., Giera, M., de Vries, I.J.M. (2022) Metabolomic and lipidomic signatures associated with activation of human cDC1 (BDCA3+/CD141+) dendritic cells, *Immunology*, **165**, 99–109, doi: 10.1111/IMM.13409,.
 179. Jeon, S.M. (2016) Regulation and function of AMPK in physiology and diseases, *Exp. Mol. Med.*, **48**, e245, doi: 10.1038/EMM.2016.81.
 180. Westhaus, A., Blumrich, E.M., Dringen, R. (2017) The Antidiabetic Drug Metformin Stimulates Glycolytic Lactate Production in Cultured Primary Rat Astrocytes, *Neurochem. Res.*, **42**, 294–305, doi: 10.1007/S11064-015-1733-8,.
 181. Barros, L.F., Ruminot, I., San Martín, A., Lerchundi, R., Fernández-Moncada, I., Baeza-Lehnert, F. (2021) Aerobic Glycolysis in the Brain: Warburg and Crabtree Contra Pasteur, *Neurochem. Res.*, **46**, 15–22, doi: 10.1007/S11064-020-02964-W,.
 182. Zhang, J., Zhang, L., Nie, J., Lin, Y., Li, Y., Xu, W., Zhao, J.Y., Zhao, S.M., Wang, C. (2021) Calcineurin inactivation inhibits pyruvate dehydrogenase complex activity and induces the Warburg effect, *Oncogene*, **40**, 6692–702, doi: 10.1038/S41388-021-02065-0,.
 183. Alhourani, A.H., Tidwell, T.R., Bokil, A.A., Røslund, G. V., Tronstad, K.J., Søreide, K., Hagland, H.R. (2021) Metformin treatment response is dependent on glucose growth conditions and metabolic phenotype in colorectal cancer cells, *Sci. Rep.*, **11**, doi: 10.1038/S41598-021-89861-6,.
 184. Frauwirth, K.A., Riley, J.L., Harris, M.H., Parry, R. V., Rathmell, J.C., Plas, D.R., Elstrom, R.L., June, C.H., Thompson, C.B. (2002) The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism, *Immunity*, **16**, 769–77, doi: 10.1016/S1074-7613(02)00323-0.
 185. Mason, S. (2017) Lactate Shuttles in Neuroenergetics-Homeostasis, Allostasis and Beyond, *Front. Neurosci.*, **11**, doi: 10.3389/fnins.2017.00043.

186. Li, W., Choudhury, G.R., Winters, A., Prah, J., Lin, W., Liu, R., Yang, S.H. (2018) Hyperglycemia Alters Astrocyte Metabolism and Inhibits Astrocyte Proliferation, *Aging Dis.*, **9**, 674–84, doi: 10.14336/AD.2017.1208.
187. Xian, H., Liu, Y., Rundberg Nilsson, A., Gatchalian, R., Crother, T.R., Tourtellotte, W.G., Zhang, Y., Aleman-Muench, G.R., Lewis, G., Chen, W., Kang, S., Luevanos, M., Trudler, D., Lipton, S.A., Soroosh, P., Tejjaro, J., de la Torre, J.C., Arditi, M., Karin, M., Sanchez-Lopez, E. (2021) Metformin inhibition of mitochondrial ATP and DNA synthesis abrogates NLRP3 inflammasome activation and pulmonary inflammation, *Immunity*, **54**, 1463-1477.e11, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2021.05.004,.
188. Tayara, K., Espinosa-Oliva, A.M., García-Domínguez, I., Ismaiel, A.A., Boza-Serrano, A., Deierborg, T., Machado, A., Herrera, A.J., Venero, J.L., de Pablos, R.M. (2018) Divergent Effects of Metformin on an Inflammatory Model of Parkinson’s Disease, *Front. Cell. Neurosci.*, **12**, doi: 10.3389/fncel.2018.00440.
189. Scumpia, P.O., Kelly, K.M., Reeves, W.H., Stevens, B.R. (2005) Double-stranded RNA signals antiviral and inflammatory programs and dysfunctional glutamate transport in TLR3-expressing astrocytes, *Glia*, **52**, 153–62, doi: 10.1002/GLIA.20234,.
190. Kim, H., Yang, E., Lee, J., Kim, S.H., Shin, J.S., Park, J.Y., Choi, S.J., Kim, S.J., Choi, I.H. (2008) Double-stranded RNA mediates interferon regulatory factor 3 activation and interleukin-6 production by engaging Toll-like receptor 3 in human brain astrocytes, *Immunology*, **124**, 480–8, doi: 10.1111/J.1365-2567.2007.02799.X,.
191. Mielcarska, M.B., Bossowska-Nowicka, M., Gregorczyk-Zboroch, K.P., Wyżewski, Z., Szulc-Dąbrowska, L., Gieryńska, M., Toka, F.N. (2019) Syk and HRs regulate TLR3-mediated antiviral response in murine astrocytes, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, doi: 10.1155/2019/6927380,.
192. Kim, J., Kwak, H.J., Cha, J.Y., Jeong, Y.S., Rhee, S.D., Kim, K.R., Cheon, H.G. (2014) Metformin suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in murine macrophages via Activating Transcription Factor-3 (ATF-3) induction, *Journal of Biological Chemistry*, **289**, 23246–55, doi: 10.1074/JBC.M114.577908,.
193. Israelsson, P., Dehlin, E., Nagaev, I., Lundin, E., Ottander, U., Mincheva-Nilsson, L. (2020) Cytokine mRNA and protein expression by cell cultures of epithelial ovarian cancer—Methodological considerations on the choice

- of analytical method for cytokine analyses, *American Journal of Reproductive Immunology*, **84**, doi: 10.1111/AJI.13249,.
194. Jin, J., Sundararaj, K.P., Samuvel, D.J., Zhang, X., Li, Y., Lu, Z., Lopes-Virella, M.F., Huang, Y. (2012) Different signaling mechanisms regulating IL-6 expression by LPS between gingival fibroblasts and mononuclear cells: Seeking the common target, *Clinical Immunology*, **143**, 188–99, doi: 10.1016/j.clim.2012.01.019.
 195. Kawai, T., Akira, S. (2011) Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity, *Immunity*, **34**, 637–50, doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.
 196. Zheng, L., Shen, X., Ye, J., Xie, Y., Yan, S. (2019) Metformin alleviates hyperglycemia-induced apoptosis and differentiation suppression in osteoblasts through inhibiting the TLR4 signaling pathway, *Life Sci.*, **216**, 29–38, doi: 10.1016/j.lfs.2018.11.008.
 197. Sakata, N. (2024) The anti-inflammatory effect of metformin: The molecular targets, *Genes to Cells*, **29**, 183–91, doi: 10.1111/GTC.13098,.
 198. Du, M.R., Gao, Q.Y., Liu, C.L., Bai, L.Y., Li, T., Wei, F.L. (2022) Exploring the Pharmacological Potential of Metformin for Neurodegenerative Diseases, *Front. Aging Neurosci.*, **14**, doi: 10.3389/FNAGI.2022.838173,.
 199. Quan, Y., Jiang, C.T., Xue, B., Zhu, S.G., Wang, X. (2011) High glucose stimulates TNF α and MCP-1 expression in rat microglia via ROS and NF- κ B pathways, *Acta Pharmacol. Sin.*, **32**, 188–93, doi: 10.1038/APS.2010.174,.
 200. Qiu, Z., He, Y., Ming, H., Lei, S., Leng, Y., Xia, Z.Y. (2019) Lipopolysaccharide (LPS) Aggravates High Glucose- and Hypoxia/Reoxygenation-Induced Injury through Activating ROS-Dependent NLRP3 Inflammasome-Mediated Pyroptosis in H9C2 Cardiomyocytes, *J. Diabetes Res.*, **2019**, doi: 10.1155/2019/8151836,.
 201. Kajiwarra, C., Kusaka, Y., Kimura, S., Yamaguchi, T., Nanjo, Y., Ishii, Y., Uono, H., Standiford, T.J., Tateda, K. (2018) Metformin Mediates Protection against Legionella Pneumonia through Activation of AMPK and Mitochondrial Reactive Oxygen Species, *The Journal of Immunology*, **200**, 623–31, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1700474,.
 202. 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' oxylipin profiles reduces neurotoxicity, *Metabolites*, **11**, doi: 10.3390/METABO11080498,.
203. de Moraes, H., de Souza, C.P., da Silva, L.M., Ferreira, D.M., Baggio, C.H., Vanvossen, A.C., Cristina de Carvalho, M., da Silva-Santos, J.E., Bertoglio, L.J., Cunha, J.M., Zanoveli, J.M. (2016) Anandamide reverses depressive-like behavior, neurochemical abnormalities and oxidative-stress parameters in streptozotocin-diabetic rats: Role of CB1 receptors, *European Neuropsychopharmacology*, **26**, 1590–600, doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.08.007.
 204. Cui, N., Feng, X., Zhao, Z., Zhang, J., Xu, Y., Wang, L., Hao, G. (2017) Restored Plasma Anandamide and Endometrial Expression of Fatty Acid Amide Hydrolase in Women With Polycystic Ovary Syndrome by the Combination Use of Diane-35 and Metformin, *Clin. Ther.*, **39**, 751–8, doi: 10.1016/J.CLINTHERA.2017.02.007,.
 205. 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,.
 206. Liu, X., Tian, Y., Lu, N., Gin, T., Cheng, C.H.K., Chan, M.T.V. (2013) Stat3 Inhibition Attenuates Mechanical Allodynia through Transcriptional Regulation of Chemokine Expression in Spinal Astrocytes, *PLoS One*, **8**, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0075804,.
 207. Ge, A., Wang, S., Miao, B., Yan, M. (2018) Effects of metformin on the expression of AMPK and STAT3 in the spinal dorsal horn of rats with neuropathic pain, *Mol. Med. Rep.*, **17**, 5229–37, doi: 10.3892/MMR.2018.8541,.
 208. Beurel, E., Jope, R.S. (2009) Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain, *J. Neuroinflammation*, **6**, doi: 10.1186/1742-2094-6-9,.
 209. Lamichhane, S., Bastola, T., Pariyar, R., Lee, E.S., Lee, H.S., Lee, D.H., Seo, J. (2017) ROS production and ERK activity are involved in the effects of D-β-hydroxybutyrate and metformin in a glucose deficient condition, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, doi: 10.3390/IJMS18030674,.
 210. Murgas, P., Cornejo, F.A., Merino, G., Von Bernhardt, R. (2014) SR-A regulates the inflammatory activation of astrocytes, *Neurotox. Res.*, **25**, 68–80, doi: 10.1007/S12640-013-9432-1,.

211. de Oliveira, A.C.P., Yousif, N.M., Bhatia, H.S., Hermanek, J., Huell, M., Fiebich, B.L. (2016) Poly(I: C) Increases the expression of mPGES-1 and COX-2 in rat primary microglia, *J. Neuroinflammation*, **13**, doi: 10.1186/S12974-015-0473-7,.
212. Gorbatenko, V.O., Goriainov, S. V., Babenko, V.A., Plotnikov, E.Y., Sergeeva, M.G., Chistyakov, D. V. (2022) Anti-Inflammatory Properties of Metformin During Cultivation of Primary Rat Astrocytes in a Medium with High Glucose Concentration, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 577–89, doi: 10.1134/S000629792207001X,.
213. Sofroniew, M. V. (2014) Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators, *Neuroscientist*, **20**, 160–72, doi: 10.1177/1073858413504466.
214. Giovannoni, F., Quintana, F.J. (2020) The Role of Astrocytes in CNS Inflammation, *Trends Immunol.*, **41**, 805–19, doi: 10.1016/j.it.2020.07.007.
215. Adzic, M., Stevanovic, I., Josipovic, N., Laketa, D., Lavrnja, I., Bjelobaba, I.M., Bozic, I., Jovanovic, M., Milosevic, M., Nedeljkovic, N. (2017) Extracellular ATP induces graded reactive response of astrocytes and strengthens their antioxidative defense in vitro, *J. Neurosci. Res.*, **95**, 1053–66, doi: 10.1002/JNR.23950,.
216. Bruner, G., Murphy, S. (1990) ATP-Evoked Arachidonic Acid Mobilization in Astrocytes Is via a P2Y-Purinergic Receptor, *J. Neurochem.*, **55**, 1569–75, doi: 10.1111/J.1471-4159.1990.TB04940.X,.
217. Xu, K., Evans, D.B., Kawabata, K., Zeramardini, R., Klavus, J., Murray, C.J.L. (2003) Household catastrophic health expenditure: A multicountry analysis, *Lancet*, **362**, 111–7, doi: 10.1016/S0140-6736(03)13861-5.
218. Strokin, M., Sergeeva, M., Reiser, G. (2007) Prostaglandin synthesis in rat brain astrocytes is under the control of the n-3 docosahexaenoic acid, released by group VIB calcium-independent phospholipase A2, *J. Neurochem.*, **102**, 1771–82, doi: 10.1111/J.1471-4159.2007.04663.X,.
219. Kalyvas, A., Baskakis, C., Magrioti, V., Constantinou-Kokotou, V., Stephens, D., Lopez-Vales, R., Lu, J.Q., Yong, V.W., Dennis, E.A., Kokotos, G., David, S. (2009) Differing roles for members of the phospholipase A2 superfamily in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Brain*, **132**, 1221–35, doi: 10.1093/BRAIN/AWP002,.
220. Joo, M., Sadikot, R.T. (2012) PGD synthase and PGD 2 in immune response, *Mediators Inflamm.*, **2012**, doi: 10.1155/2012/503128,.

221. Storer, P.D., Xu, J., Chavis, J.A., Drew, P.D. (2005) Cyclopentenone prostaglandins PGA₂ and 15-deoxy- Δ 12,14 PGJ₂ suppress activation of marine microglia and astrocytes: Implications for multiple sclerosis, *J. Neurosci. Res.*, **80**, 66–74, doi: 10.1002/JNR.20413,.
222. Nagatake, T., Kunisawa, J. (2019) Emerging roles of metabolites of ω 3 and ω 6 essential fatty acids in the control of intestinal inflammation, *Int. Immunol.*, **31**, 569–77, doi: 10.1093/INTIMM/DXY086,.
223. Weylandt, K.H., Krause, L.F., Gomolka, B., Chiu, C.Y., Bilal, S., Nadolny, A., Waechter, S.F., Fischer, A., Rothe, M., Kang, J.X. (2011) Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF- α , *Carcinogenesis*, **32**, 897–903, doi: 10.1093/CARCIN/BGR049,.
224. Schock, S.C., Munyao, N., Yakubchuk, Y., Sabourin, L.A., Hakim, A.M., Ventureyra, E.C.G., Thompson, C.S. (2007) Cortical spreading depression releases ATP into the extracellular space and purinergic receptor activation contributes to the induction of ischemic tolerance, *Brain Res.*, **1168**, 129–38, doi: 10.1016/j.brainres.2007.06.070.
225. Clark, A.K., Staniland, A.A., Marchand, F., Kaan, T.K.Y., McMahon, S.B., Malcangio, M. (2010) P2X₇-dependent release of interleukin-1 β and nociception in the spinal cord following lipopolysaccharide, *Journal of Neuroscience*, **30**, 573–82, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3295-09.2010,.
226. Kucher, B.M., Neary, J.T. (2005) Bi-functional effects of ATP/P₂ receptor activation on tumor necrosis factor- α release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes, *J. Neurochem.*, **92**, 525–35, doi: 10.1111/J.1471-4159.2004.02885.X,.
227. Murakami, K., Nakamura, Y., Yoneda, Y. (2003) Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes, *Neuroscience*, **117**, 37–42, doi: 10.1016/S0306-4522(02)00804-7.
228. Sathanoori, R., Swärd, K., Olde, B., Erlinge, D. (2015) The ATP receptors P₂X₇ and P₂X₄ modulate high glucose and palmitate-induced inflammatory responses in endothelial cells, *PLoS One*, **10**, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0125111,.
229. Gorbatenko, V.O., Goriainov, S. V., Babenko, V.A., Plotnikov, E.Y., Chistyakov, D. V., Sergeeva, M.G. (2024) TLR3-mediated Astrocyte Responses in High and Normal Glucose Adaptation Differently Regulated

- by Metformin, *Cell Biochem. Biophys.*, **82**, 2701–15, doi: 10.1007/S12013-024-01380-Z,.
230. Drozhdev, A.I., Gorbatenko, V.O., Goriainov, S. V., Chistyakov, D. V., Sergeeva, M.G. (2025) ATP Alters the Oxylin Profiles in Astrocytes: Modulation by High Glucose and Metformin, *Brain Sci.*, **15**, doi: 10.3390/BRAINSCI15030293,.
 231. Naffaa, M.M. (2025) Mechanisms of astrocytic and microglial purinergic signaling in homeostatic regulation and implications for neurological disease, *Open Exploration* 2019 4:, **4**, 100676-, doi: 10.37349/en.2025.100676.
 232. Liu, J.S.H., John, G.R., Sikora, A., Lee, S.C., Brosnan, C.F. (2000) Modulation of Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor α Signaling by P2 Purinergic Receptors in Human Fetal Astrocytes, *The Journal of Neuroscience*, **20**, 5292, doi: 10.1523/jneurosci.20-14-05292.2000.
 233. Hasanvand, A. (2022) The role of AMPK-dependent pathways in cellular and molecular mechanisms of metformin: a new perspective for treatment and prevention of diseases, *Inflammopharmacology*, **30**, 775, doi: 10.1007/s10787-022-00980-6.