

УДК 612.017.1:612.112.31

АНТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МЕТФОРМИНА В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВАЦИИ ПЕРВИЧНЫХ АСТРОЦИТОВ КРЫСЫ В СРЕДЕ С ПОВЫШЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ГЛЮКОЗЫ

© 2022 В.О. Горбатенко¹, С.В. Горяинов², В.А. Бабенко³, Е.Ю. Плотников³,
М.Г. Сергеева³, Д.В. Чистяков^{3*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов, 117198 Москва, Россия

³ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: chistyakof@gmail.com

Поступила в редакцию 14.04.2022

После доработки 10.05.2022

Принята к публикации 10.05.2022

Установление взаимосвязи между воспалительными ответами и энергетическим метаболизмом важно для понимания биологии хронических неинфекционных заболеваний. Использование метформина, препарата для лечения диабета, рассматривается как перспективное направление для терапии нейродегенеративных заболеваний и других нейропатологий с воспалительной компонентой. Астроциты играют важную роль в регуляции энергетического метаболизма и нейровоспаления, поэтому в работе исследовали влияние метформина на клеточные ответы первичных астроцитов крысы, культивируемых в среде с повышенной концентрацией глюкозы (22,5 мМ, инкубация в течение 48 ч). Как воспалительный стимул использовали липополисахарид (LPS). Эффекты метформина оценивали по изменению экспрессии провоспалительных цитокинов и синтеза оксипиринов, детектируемых методом сверхэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (UPLC-MS/MS). Изменения на внутриклеточном уровне оценивались по анализу фосфорилирования ERK-киназы и транскрипционного фактора STAT3, ферментов синтеза оксипиринов циклооксигеназы 1 и 2 (COX). Получено, что независимо от концентрации глюкозы метформин снижал LPS-стимулированное высвобождение цитокинов IL-1 β и IL-6, активность транскрипционного фактора STAT3, киназы ERK, синтез производных циклооксигеназной ветви метаболизма оксипиринов и анандамида и не влиял на образование АФК. Исследование энергетического фенотипа клеток показало, что метформин активировал гликолиз и ингибировал митохондриальное дыхание и окислительное фосфорилирование независимо от стимуляции LPS и культивирования клеток при повышенной концентрации глюкозы. Таким образом, показано, что метформин обладает выраженными противовоспалительными эффектами, а его влияние на синтез цитокинов, простагландинов и других липидных медиаторов может обуславливать полезные эффекты метформина в моделях нейропатологий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: астроциты, гипергликемия, цитокины, оксипирины, STAT3, ERK, АФК, полиненасыщенные жирные кислоты, анандамид, метформин.

DOI: 10.31857/S032097252206001X, EDN: ATTKWG

ВВЕДЕНИЕ

Наличие взаимосвязей между энергетическим метаболизмом, воспалением и различными хроническими неинфекционными заболеваниями подтверждается в серии исследований,

когда противовоспалительные или глюкозо-понижающие препараты используют для лечения этих заболеваний. Бигуанид метформин является препаратом первой линии (препаратом выбора) при лечении диабета 2го-типа. Глюкозоснижающий эффект метформина в первую

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; полиненасыщенные жирные кислоты: АА – арахидоновая, ДНА – докозагексаеновая, ЕРА – эйкозапентаеновая; АЕА – эндоканнабиноид анандамид; АМПК – АМР-активированная протеинкиназа; СОХ – циклооксигеназы; ЕСАР – скорость внеклеточного закисления; НГ – высокая концентрация глюкозы; ИЛ – интерлейкин; LPS – липополисахарид; НГ – нормальная концентрация глюкозы; ОСР – скорость потребления кислорода; TNF α – фактор некроза опухолей; РГ – простагландины.

* Адресат для корреспонденции.

очередь объясняется его способностью регулировать энергетический обмен, включая ингибирование глюконеогенеза в печени, снижение всасывания глюкозы и повышение утилизации глюкозы в периферических тканях [1]. На молекулярном уровне основным механизмом действия метформина, как ингибитора глюконеогенеза, рассматривают ингибирование комплекса I дыхательной цепи митохондрий, приводящее к активации АМР-активированной протеинкиназы (АМРК) и зависимых от этой киназы процессов [2].

Исследования последних лет также показали, что метформин оказывает благоприятное воздействие при патологиях нервной системы [1, 3]. Все эти заболевания характеризуются наличием хронических воспалительных процессов, определяемых на молекулярном уровне системой врождённого иммунитета, а также изменением взаимосвязи воспалительных и энергетических процессов [4, 5]. Найденные на разных моделях молекулярные механизмы действия метформина указывают на его противовоспалительные свойства, поскольку наблюдали снижение экспрессии таких маркёров воспалительного процесса, как циклооксигеназа 2 (COX-2) и индуцибельная NO синтаза (iNOS), цитокинов TNF α , IL-6 и IL-1 β [6–9]. В то же время отсутствуют данные по другому классу про- и противовоспалительных веществ: полиненасыщенным жирным кислотам и их метаболитам, оксипиринам. Остаётся также неясным, как проявляются противовоспалительные свойства метформина, когда наблюдаются и гипергликемия, и воздействие провоспалительных стимулов.

Астроциты – это глиальные клетки, которые имеют трофическую функцию и участвуют в поддержании гомеостаза [10, 11]. Показано также, что астроциты играют важную роль в нейровоспалении [4, 11]. В настоящее время клетки рассматривают как объекты для создания новых терапевтических подходов, дающих возможность разработать методы лечения острых травм и хронических заболеваний центральной нервной системы [10, 12]. Помимо их особой роли в нейровоспалении, астроциты вносят основной вклад в метаболизм глюкозы в головном мозге и её запасание в виде гликогена [13]. Опыты *in vivo* на различных моделях заболеваний нервной системы показали положительный эффект метформина и указали на важную роль астроцитов в этом процессе [14–17]. Эти работы положили начало исследованиям влияния метформина на различные функции астроцитов [12, 18–20].

Однако оставались неизученными зависимость эффектов метформина от адаптации астроцитов к разным концентрациям глюкозы и ключевой вопрос: меняются ли при такой адаптации противовоспалительные свойства метформина. Ранее нами было показано, что получение астроцитов и их длительное культивирование при высокой концентрации глюкозы сдвигают ответы в сторону проявления провоспалительных характеристик [5]. С другой стороны, показано, что ингибиторы окислительного фосфорилирования влияют на способность астроцитов синтезировать цитокины и оксипирины в ответ на противовоспалительные стимулы [21]. Поэтому данная работа была посвящена характеристике воздействия метформина на ответ астроцитов, стимулированных липополисахаридом (LPS). Астроциты перед стимуляцией культивировали при нормальной (5 мМ, NG) или высокой (22,5 мМ, HG) концентрации глюкозы. Проведена оценка изменения цитокинов и оксипиринов, дана характеристика энергетического метаболизма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. В работе использовали следующие реактивы: липополисахарид («Sigma-Aldrich», США); метформин гидрохлорид («Cayman Chemical Company», США); стрептомицин/пенициллин, трипсин, ЭДТА, бычья сыворотка («ПанЭко», Россия). Культуральная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) («Gibco», «Thermo Fisher Scientific», США). Антитела против COX-2, COX-1, p44/42 MAPK (Erk1/2), фосфо-p44/42 MAPK (Erk1/2, Thr202/Tyr204), β -тубулина, β -актин, вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (кроличьи, мышинные) («Cell Signaling Technology», США); субстрат для вестерн-блота ECL («Thermo Fisher Scientific»). Дейтерированные стандарты оксипиринов: 6-keto PGF1 α -d4, TXB2-d4, PGF2 α -d4, PGE2-d4, PGD2-d4, LTC4-d5, LTB4-d4, 5(S)-HETE-d8, 12(S)-HETE-d8, 15(S)-HETE-d8, Oleoyl Ethanolamide-d4, EPA-d5, DHA-d5 и AA-d8 («Cayman Chemical Company»). Картриджи Oasis® PRIME HLB (60 мг, 3 мл) («Waters», Германия).

Первичная культура клеток астроцитов. Первичная, обогащённая астроцитами, клеточная культура была выделена из новорождённых (одно-, двухдневных) крысят обоих полов по методике, описанной ранее [22]. Вкратце,

Таблица 1. Последовательности праймеров к генам маркёров воспаления и конститутивного гена β -актина

Ген	Последовательности праймеров (5'→3')	
	прямой	обратный
<i>TNFα</i>	CAAGGAGGAGAAGTCCCAA	TGATCTGAGTGTGAGGGTCTG
<i>IL-1β</i>	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGGTCCATGGTGAAGTCAAC
<i>IL-6</i>	CTGGTCTTCTGGAGTCCGT	TGGTCTTGGTCCTTAGCCAC
β -актин	AGATGACCCAGATCATGTTTGGAG	GGCATAACAGGGACAACACAG

крысят обезглавливали, вскрывали черепную коробку и извлекали мозг по кусочкам, не захватывая соединительнотканые оболочки. Извлечённый мозг промывали охлаждённым раствором Пакса (137,0 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,44 мМ KH_2PO_4 , 0,3 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,4) и последовательно перетирали через нейлоновые сита с порами 250 и 136 мкм. Полученные клетки помещали в культуральные флаконы площадью 75 см² с плотностью 6×10^5 клеток на мл и культивировали в среде DMEM, содержащей глюкозу (1 г/литр), 10% бычьей сыворотки (FBS), стрептомицин (50 ед/мл) и пенициллин (50 мкг/мл), при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO_2 . По истечении 5 дней проводили первую смену среды с предварительным отделением клеток микроглии на орбитальном шейкере OS-20 («Biosan», Латвия), 280 об./мин, 90 мин. Получившуюся обогащённую астроцитами культуру выращивали следующие 4 дня с заменой среды каждые 2 дня. Затем клетки промывали раствором Хенкса, отделяли трипсином от поверхности флакона и рассеивали по шести-луночным планшетам с плотностью 750 000 клеток на лунку с добавлением среды DMEM того же состава. За 48 ч до стимуляции клеток LPS клеточную среду меняли на DMEM, содержащий глюкозу 1 г/литр или 4,5 г/литр. За 24 ч до стимуляции LPS к клеткам добавлялся метформин в концентрации 2,5 мМ. Для данной концентрации метформина был проведён LDH-тест (набор для теста производства «Roche», США), результат, который показал отсутствие цитотоксичности в данной концентрации на клетках, снимали с помощью планшетного спектрофотометра Synergy H4 («BioTek», США) при длине волны 490 нм (данные не приведены).

Оценка изменения экспрессии генов. Суммарную мРНК выделяли с помощью набора для очистки РНК GeneJET («Thermo Scientific», США) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически с помощью спектрофо-

тометра NanoPhotometer N («Implen», США). Синтез первой цепи проводили с помощью MMLVRT kit («Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Относительный уровень экспрессии генов *TNF α* , *IL-1 β* , *IL-6* и β -актина (последовательности представлены в табл. 1) определяли с помощью количественной ПЦР с SYBR GREEN, используя коммерческий 5× PCR-HS-SYBR микс, («Евроген»), на амплификаторе DTlite 4 («DNATechnology», Россия).

Иммуноблоттинг для оценки внутриклеточных изменений. Методом иммуноблоттинга оценивалось изменение фосфорилирования ERK MAP-киназы и транскрипционного фактора STAT3, а также изменение количества белков циклооксигеназ 1 и 2 (COX-1, COX-2). Для этого астроциты, прошедшие клеточный эксперимент, лизировали в буфере RIPA (50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 1% NP-40 («Sigma Chemicals», США), 0,25% дезоксихолата натрия, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ Na_3VO_4 , 1 мМ NaF) с ингибиторами протеаз/фосфатаз («Roche Molecular Biochemicals», Германия). Концентрацию белка выравнивали дополнительным разведением. По достижении одинаковых концентраций образцы подвергали стандартному SDS-электрофорезу в 10%-ном ПААГ. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,2 мкм («Bio Rad», США) проводили по методу полусухого переноса в приборе Trans Blot sd («Bio Rad»). Далее мембраны инкубировали в буфере TBS, содержащем 5% обезжиренного молока и 0,05% (v/v) Tween 20, и маркировали первичными антителами против COX-1, COX-2, p-ERK, ERK, p-STAT3, STAT3 и β -тубулина. После инкубации мембран с раствором вторичных антител анализировали иммуномаркирование с использованием хемилюминесцентного субстрата. Фотосъёмку мембран проводили с применением камер фирмы «Bio Rad». Для количественного анализа экспрессии использовали приложение QuantityOne 4.6.9 («Bio Rad»).

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

Параметр	Формула расчёта
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)

UPLC-MS/MS для детекции липидов.

Для масс-спектрометрического анализа выбросов кислот и оксипептидов в клеточную среду к 700 мкл клеточной среды добавляли 1 мл охлаждённого метанола для осаждения белков, после чего липидные компоненты экстрагировали с использованием колонок Oasis® PRIME HLB для твердофазной экстракции («Waters», Германия), согласно рекомендациям производителя. Концентрирование образцов проводили в токе азота. Масс-спектрометрический анализ проводился с использованием квадрупольного масс-спектрометра Shimadzu 8040 («Shimadzu», Япония), который оборудован системой ультра-ВЭЖХ Nexera с использованием колонки Phenomenex C8 (2,1 мм × 150 мм × 2,6 мкм). Регистрацию проводили методом мониторинга множественных реакций по методике, описанной ранее [23]. Идентификацию липидов проводили с помощью программного обеспечения LipidMediators 2.0 Shimadzu.

Определение цитокинов при помощи иммуноферментного анализа. Уровень высвобожденного IL-6 был определён с использованием коммерческого набора для детекции IL-6 («BD Biosciences», США), согласно рекомендациям производителя. Детекцию проводили при помощи планшетного спектрофотометра Synergy H4.

Анализ выброса активных форм кислорода (АФК). Детектирование АФК проводили с использованием коммерческого набора CellROX® Deep Red Reagent («Thermo Scientific») в соответствии с рекомендациями производителя. Измерения возбуждения/излучения (640/665 нм) проводили на планшетном спектрофотометре Synergy H4.

Анализ энергетического метаболизма астроцитов.

Энергетический метаболизм клеток (скорость потребления кислорода (OCR) и скорость внеклеточного закисления (ECAR)) оценивали с помощью прибора Seahorse XFp Analyzer («Seahorse Bioscience», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для анализа астроциты высевали в количестве 5000 клеток на лунку и культивировали на планшетах Seahorse XFp («Agilent», США) в течение 24 ч. Далее среду в лунках планшета заменяли на реакционную, состоящую из DMEM, 5 мМ HEPES, пирувата натрия (1 мМ), глутамин (2 мМ), pH 7,4. В каждую лунку вносили по 180 мкл этой среды, её же добавляли в контрольные лунки. Далее инкубировали клетки в реакционной среде в течение 40 мин в инкубаторе без CO₂. К клеткам последовательно добавляли 10 мМ глюкозы; 4,5 мкМ ингибитора АТФ-синтазы – олигомицина; 10 мкМ разобщителя дыхания и окислительного фосфорилирования – СССР (карбонилцианид м-хлорфенилгидразон); 2,5 мкМ ротенона и 4 мкМ антимицина А (ингибиторы комплексов I и III соответственно). Далее помещали планшет в прибор и проводили измерения. После каждой инъекции регистрировали 4 временные точки с примерно 5-минутным интервалом между каждой инъекцией. OCR и ECAR анализировали с помощью программного обеспечения Seahorse XFp. В соответствии с рекомендациями производителя рассчитывали ряд параметров энергетического метаболизма и функций митохондрий (табл. 2).

Полученные значения ECAR и OCR нормировали на количество клеток в лунках, которое определяли с помощью окрашивания ядер клеток с 4',6-диамидино-2-фенилиндо-

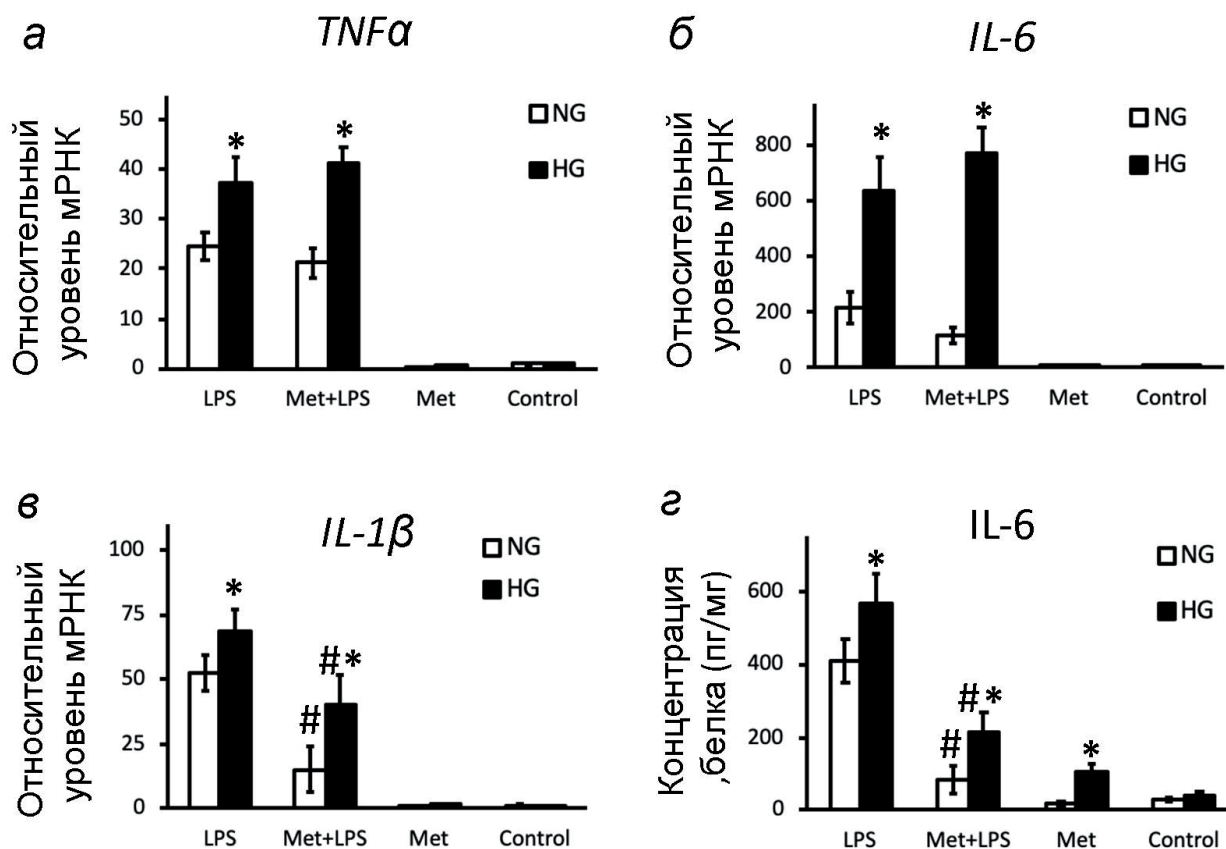


Рис. 1. Влияние метформина на LPS-стимулированную экспрессию генов цитокинов (*TNFα*, *IL-1β*, *IL-6*). Первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 мМ), а затем стимулировали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 4 ч. Экспрессию генов определяли методом qPCR, значения были нормализованы к уровням мРНК β-актина, за единицу принята экспрессия в контрольных клетках. Концентрацию IL-6 определяли методом ИФА, данные представлены в виде пг/мг белка. Значения представляют собой среднее ± стандартное отклонение среднего из трёх независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с клетками, культивируемыми в среде с NG; # $p < 0,05$ по сравнению с LPS-стимулированными клетками

лом (DAPI) после метаболического анализа. Для этого культуры в планшетах фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 15 мин при 4 °С. Зафиксированные клетки окрашивали раствором DAPI (300 нМ) в течение 20 мин, после чего получали изображения на конфокальном микроскопе («Carl Zeiss», Германия). Далее проводили подсчёт ядер в пяти полях зрения для каждой лунки и, взяв среднее от полученных значений, получали нормировочный коэффициент, в соответствии с которым корректировали полученные при анализе метаболизма данные.

Статистический анализ экспериментальных данных. Данные выражены как среднее ± стандартное отклонение. Статистическая значимость различий между группами оценивалась с помощью однофакторного теста ANOVA с уровнем значимости 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние метформина на LPS-стимулированный синтез цитокинов в астроцитах, культивируемых при разных концентрациях глюкозы. Ранее было показано, что LPS действует на астроциты через активацию толл-подобных рецепторов типа 4 (TLR4) [24], при этом происходит активация синтеза провоспалительных цитокинов и оксипинов [23]. Для оценки влияния метформина мы проанализировали LPS-стимулированную экспрессию генов провоспалительных цитокинов *TNFα*, *IL-1β* и *IL-6* (рис. 1, а–в). Для IL-6 также были проанализированы данные по высвобождению белка (рис. 1, г). Сравнивали клетки, культивируемые перед добавлением стимула 48 ч при 5 мМ (NG, нормальная концентрация глюкозы) и 22,5 мМ (HG, модель клеточной гипер-

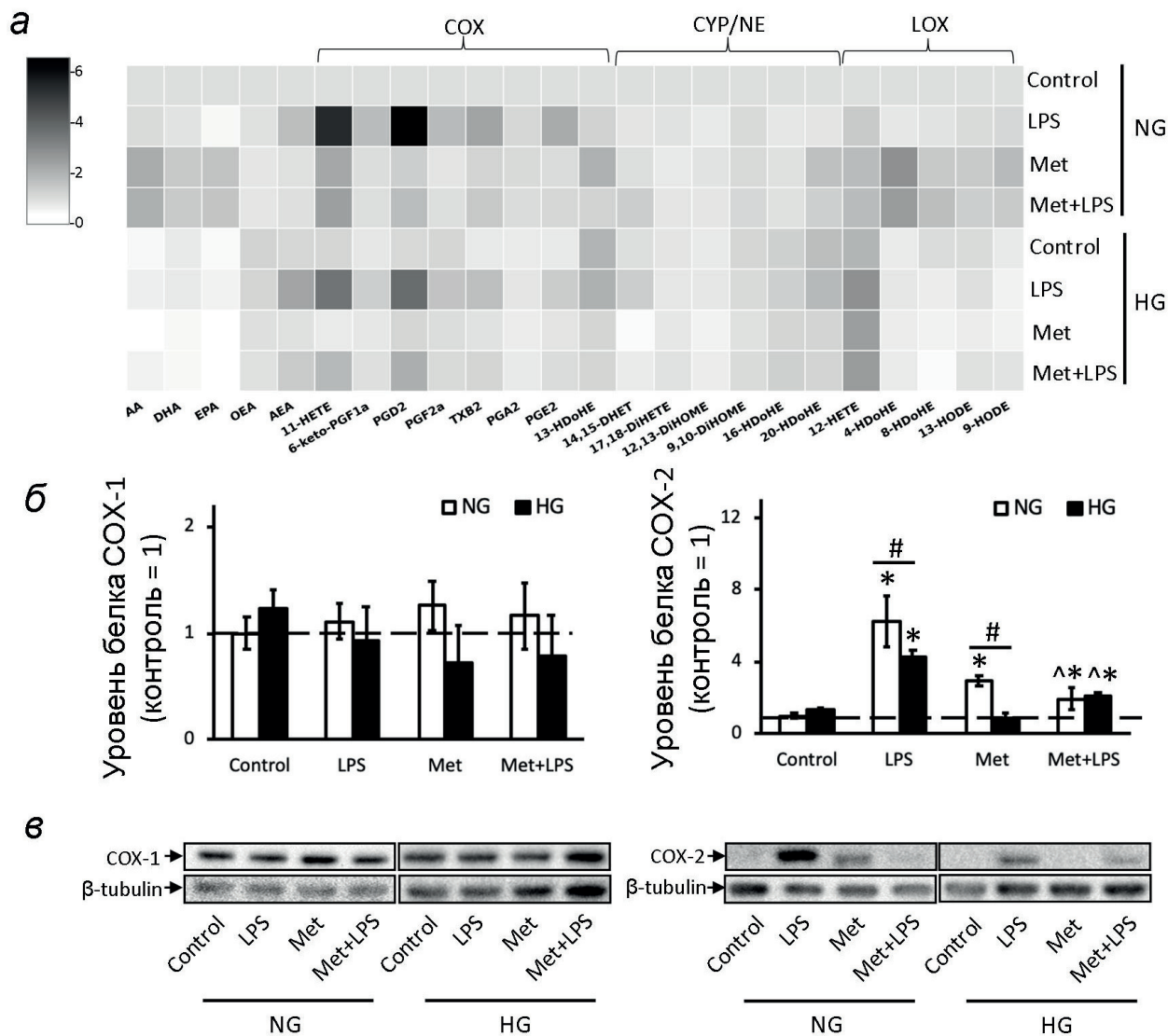


Рис. 2. Влияние метформина (Met) на высвобождение оксилипинов и полиненасыщенных жирных кислот в астроцитах, стимулированных LPS, и экспрессию ферментов COX-1 и COX-2. Первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 мМ), а затем стимулировали липополисахаридом (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 были разделены на: липоксигеназный (LOX), циклооксигеназный (COX) и цитохромный/неферментативный (CYP/NE) пути, участвующие в их синтезе. *б* и *в* – Уровни белка COX-1 и COX-2 оценивали с помощью вестерн-блота и нормализовали по отношению к уровню экспрессии β-тубулина; *б* – результаты денситометрии представлены по отношению к контрольным, не стимулированным клеткам NG; *в* – приведены репрезентативные изображения вестерн-блота для соответствующих белков. Значения представляют собой среднее ± стандартное отклонение среднего из трёх 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

гликемии) глюкозы. Получено, что ответ на LPS меняется после культивации в HG-глюкозе в сторону увеличения экспрессии *TNFα*, *IL-6* и *IL-1β*. Сам метформин не влиял на экспрессию исследуемых веществ, однако снижал LPS-индуцируемую экспрессию *IL-1β* независимо от

концентрации глюкозы. На уровне высвобождения *IL-6* во внеклеточную среду также наблюдали влияние метформина независимо от концентрации глюкозы (рис. 1, *з*).

Зависимость синтеза оксилипинов от концентрации глюкозы в астроцитах,

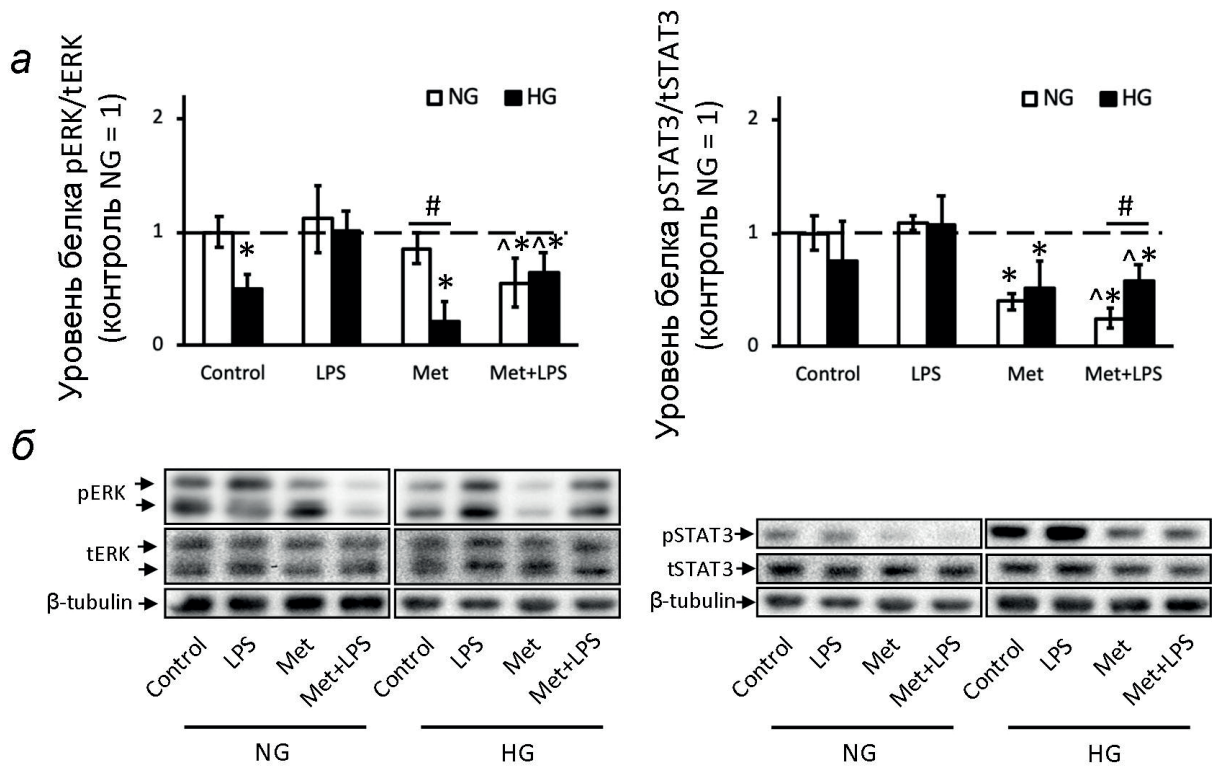


Рис. 3. Влияние глюкозы на активность MAPK, ERK1/2 и транскрипционного фактора STAT3 в астроцитах, предварительно обработанных метформином и стимулированных LPS. Первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 мМ), а затем стимулировали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 4 ч. Уровни фосфорилированной формы белка (p-STAT3, p-ERK) и общей формы белка (t-STAT3, t-ERK) оценивали с помощью вестерн-блота 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 трёх 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

стимулированных LPS. Известно, что профиль синтезируемых астроцитами оксипинов может быть как про-, так и противовоспалительным по свойствам в зависимости от стимула и концентрации глюкозы в среде культивирования [5, 23, 25]. Поэтому мы оценили влияние метформина на LPS-стимулированный синтез оксипинов. Данные по 24 анализируемым оксипинам и полиненасыщенным жирным кислотам представлены на рисунке в Приложении и в виде тепловой карты (рис. 2, *а*). Детектируемые соединения можно разделить на следующие группы: 1) полиненасыщенные жирные кислоты – арахидоновая (AA), эйкозапентаеновая (EPA), докозагексаеновая (DHA); 2) эндоканнабиноид анандамид (AEA) и олеилэтаноламид (OEA); 3) оксипины циклооксигеназной (COX) ветви метаболизма – простагландины (PGE₂, 6-keto-PGF_{1a}, PGD₂, PGF_{2a}, PGA₂), тромбосан B₂ (TXB₂), 11-NETE (11-гидрокси-эйкозатетраеновая кис-

лота), 13-HDoHE (13-гидроксидокозагексаеновая кислота); 4) оксипины цитохромного пути и неферментативного окисления (CYP/NE) – дигидроксиэйкозатетраеновые кислоты (DiHETE); 5) оксипины липооксигеназного (LOX) пути – гидроксидокозагексаеновые кислоты (HdoHE), гидроксидокозагексаеновые кислоты (HODE).

Получено, что культивация клеток в среде с HG снижает базовый уровень AA и EPA, при этом LPS не влияет на высвобождение кислот во внеклеточную среду. В среде с NG метформин стимулирует высвобождение всех кислот независимо от стимуляции клеток LPS, при гипергликемии метформин не влияет на этот процесс. Из веществ, которые относят к эндоканнабиноидам, LPS стимулировал синтез AEA вне зависимости от концентрации глюкозы, и метформин снижал этот эффект; синтез OEA оставался неизменным при всех обработках (рис. 2, *а* и рисунок в Приложении).

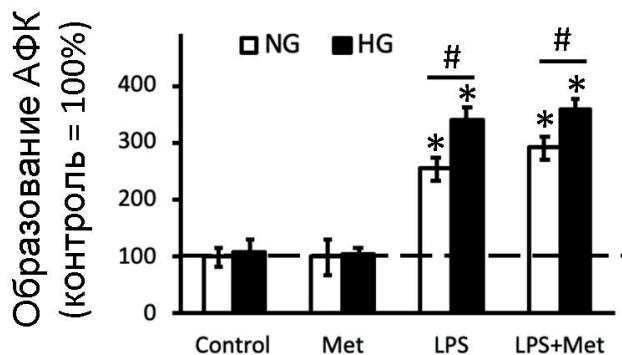


Рис. 4. Влияние метформина на продукцию АФК астроцитами, адаптированными к НГ и НГ при стимуляции LPS. Первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 24 ч метформином (Met, 2,5 мМ), стимулировали липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) в течение 24 ч. Уровень АФК измеряли с помощью реактива CellROX® Deep Red Reagent, как описано в разделе «Материалы и методы». Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение среднего из трёх независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками; # $p < 0,05$ при сравнении влияния глюкозы на идентичные обработки

При культивировании клеток в среде с НГ для метаболитов, синтезируемых по COX-пути, при действии LPS наблюдается снижение выброса производных арахидоновой кислоты: 11-НЕТЕ, 6-keto-PGF₁ α , PGD₂, TXB₂, PGE₂. Метформин снижает LPS-стимулированный синтез COX-производных оксипиринов независимо от концентрации глюкозы (рис. 2, а и рисунок в Приложении).

Для СYP/NE-производных мы не наблюдали активации от действия LPS и влияния метформина на эту активацию вне зависимости от концентрации глюкозы в среде (рис. 2, а и рисунок в Приложении). Для группы LOX-производных наблюдали повышение синтеза ДНА-метаболитов, синтезируемых по этому ферментативному пути – 8-НDoHE, 13-НDoHE и 4-НDoHE под действием метформина, причём этот эффект наблюдался только в условиях НГ.

Синтез простагландинов определяется циклооксигеназами (COX): конститутивной (COX-1) и индуцибельной (COX-2). Мы проверили изменения этих изоформ в тестируемых условиях (рис. 2, б и в). Получено, что в нестимулированных клетках экспрессия циклооксигеназ COX-1 и COX-2 не зависит от концентрации глюкозы. Экспрессия COX-1 не меняется в ответ на стимулы. Экспрессия COX-2 для НГ меньше, по сравнению с условиями НГ, при этом метформин снижает LPS-индуцированную экспрессию COX-2 независимо от концентрации глюкозы. Интересно отметить, что в

условиях НГ без стимула метформин оказывает стимулирующий эффект на экспрессию COX-2. Данные по экспрессии COX-2 согласуются с наблюдаемым снижением уровня оксипиринов, которые образуются через циклооксигеназный путь метаболизма жирных кислот.

Определение внутриклеточных молекулярных механизмов, участвующих в реализации эффектов метформина при разных концентрациях глюкозы. Известно, что стимуляция астроцитов LPS приводит к активации митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК) ERK [26] и фактора транскрипции STAT3 [27]. На макрофагах было показано, что метформин снижает LPS-стимулированный рост фосфорилирования ERK [28], а в модели *in vivo* повреждения спинного мозга на крысах обнаружено, что метформин снижает активацию STAT3 в астроцитах [16]. Поэтому в поиске внутриклеточных сигнальных механизмов, реализующих эффект метформина при действии различной концентрации глюкозы, мы использовали метод иммуноблоттинга для оценки активности ERK-киназы и транскрипционного фактора STAT3 (рис. 3). Получено, что повышенная концентрация глюкозы снижает активность киназы ERK (рис. 3, а) и не влияет на STAT3 (рис. 3, б). Активность всех белков при стимуляции LPS не зависит от концентрации глюкозы. Метформин снижает эффект LPS-стимулируемой активации ERK и STAT3, причём этот эффект проявляется независимо от присутствия LPS (рис. 3, а и б). Выраженность клеточного ответа астроцитов при обработке метформином меняется в зависимости от концентрации глюкозы, при которой культивируются клетки.

Влияние метформина на LPS-стимулированное образование АФК. Известно, что НГ может повышать уровень АФК в глиальных клетках [29, 30], и при стимуляции клеток LPS индуцирует высвобождение АФК [31], поэтому мы охарактеризовали индукцию АФК в наших экспериментальных условиях (рис. 4). Получено, что глюкоза не влияет на базовый уровень АФК, но НГ увеличивает уровень АФК в ответ на LPS. Метформин не влияет на выброс АФК в данных экспериментальных условиях.

Анализ влияния метформина на энергетический метаболизм астроцитов, культивируемых при различной концентрации глюкозы при стимуляции LPS. Известно, что метформин при введении *in vivo* уменьшает уровень АТФ в гиппокампе и окислительное фосфорилирование в астроцитах *in vitro* [15]. Показано,

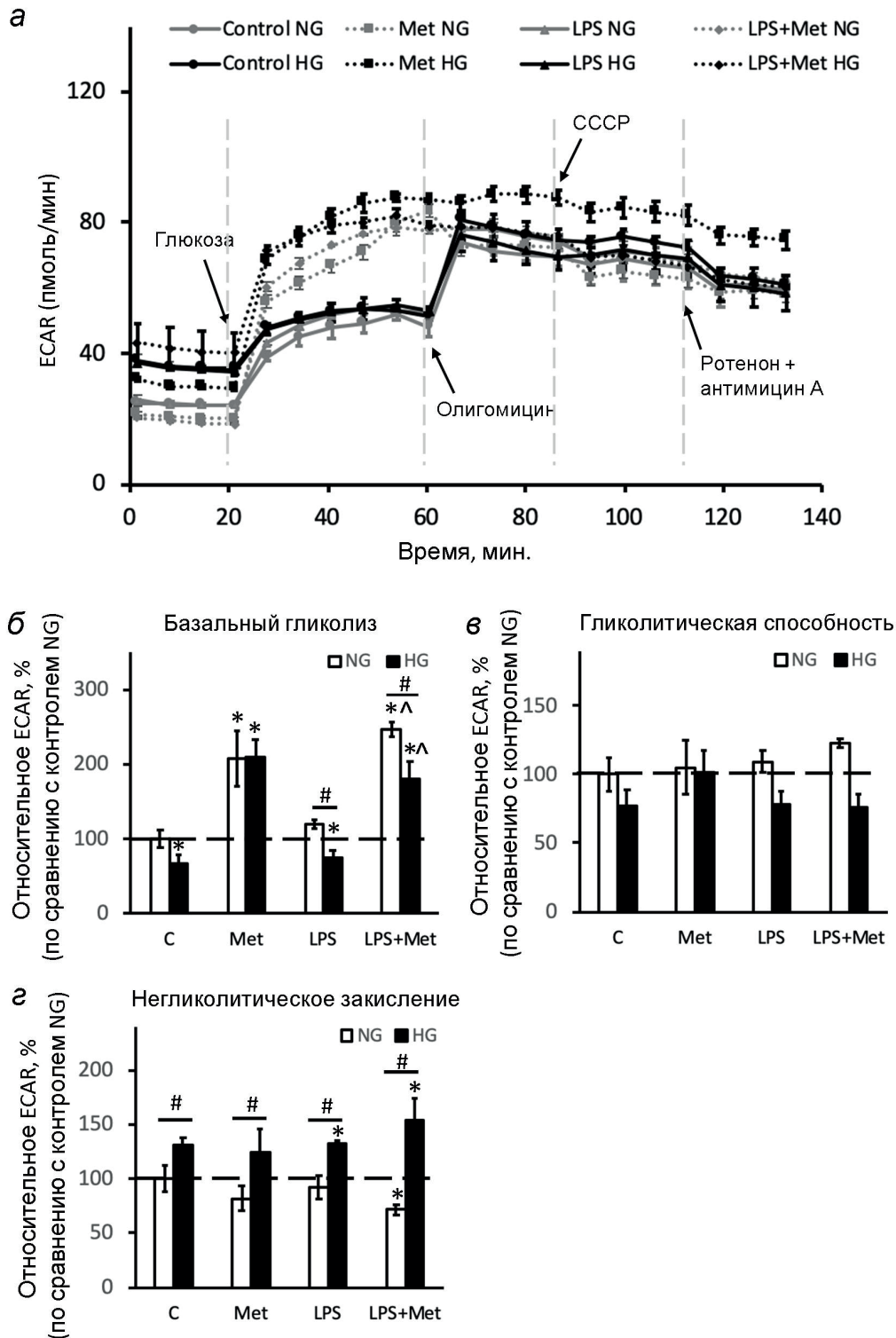


Рис. 5. Влияние метформина на активность гликолиза астроцитов, адаптированных к HG и NG при стимуляции LPS. *a* – Изменение скорости внеклеточного закисления культурами астроцитов при добавлении субстрата гликолиза (глюкоза), ингибитора окислительного фосфорилирования (олигомицин), разобщителя (CCCP) 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 трёх 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

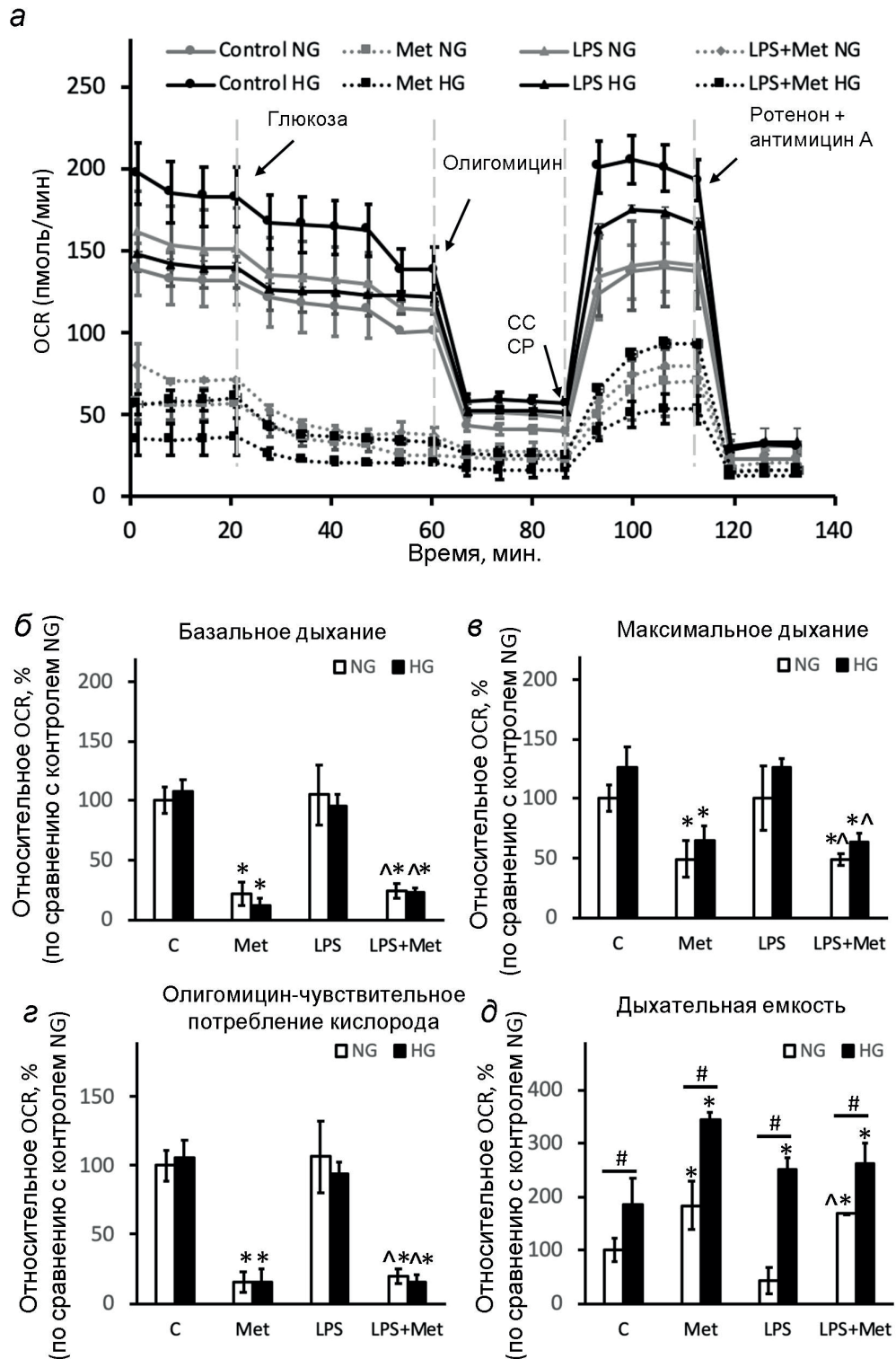


Рис. 6. Влияние LPS на митохондриальные функции астроцитов, оценённые с помощью анализатора Seahorse XFp. *a* – Скорость потребления кислорода культурами астроцитов; Расчётные значения параметров дыхания астроцитов: базальное дыхание (*б*), максимальное стимулированное дыхание (*в*), олигомицин-чувствительное потребление кислорода (*г*), дыхательная ёмкость (*д*). Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение среднего из трёх независимых экспериментов, за 100% взято значение OCR в нестимулированных клетках, культивируемых в среде с NG. * $p < 0,05$ по сравнению с нестимулированными клетками, культивируемые 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

что высокий уровень глюкозы в среде культивирования влияет на энергетический метаболизм астроцитов [29]. Однако ранее не было проведено сравнения изменения LPS-стимулированного энергетического метаболизма астроцитов, культивируемых при различных уровнях глюкозы, не оценена возможность модуляции метформином этого процесса. Для характеристики изменений дыхания и гликолиза в культивируемых астроцитах мы использовали анализатор метаболических потоков Seahorse XFp: оценивали скорость внеклеточного закисления (ECAR, мрН/мин) и скорость потребления кислорода (OCR, пмоль O_2 /мин).

Влияние метформина на ECAR в LPS-стимулированных астроцитах. Анализ скорости внеклеточного закисления астроцитов, стимулированных LPS и предварительно обработанных метформином по сравнению с клетками, не обработанными LPS, представлен на рис. 5. Каждая кривая на рис. 5 описывает изменение ECAR в клетках в исходных условиях (при отсутствии глюкозы в реакционной среде), а также после добавления D-глюкозы, олигомицина, СССР и ротенона с антимицином А. Каждой точке соответствуют усреднённые значения измерений из трёх лунок для каждой из сравниваемых культур астроцитов (рис. 5, а).

Анализ энергетического метаболизма культур астроцитов показал, что культивирование астроцитов в среде с HG снижает уровень базального гликолиза и гликолитической способности как в нативных, так и в LPS-стимулированных клетках, при этом увеличивая уровень негликолитического закисления (рис. 5, б). LPS при описанном протоколе инкубаций не влиял на уровень базального гликолиза, гликолитическую способность или негликолитическое закисление. При этом культивирование клеток в среде с HG снижало уровень базального гликолиза как в контрольных клетках, так и в LPS-стимулированных клетках. В то же время предобработка астроцитов метформином перед стимуляцией LPS повышала уровень базального гликолиза по сравнению с LPS-стимулированными клетками, но не влияла на гликолитическую способность.

Влияние метформина на OCR в LPS-стимулированных астроцитах. Мы оценили влияние метформина и LPS на астроциты, культивируемые в среде с нормальной (5 мМ) и повышенной (22,5 мМ) концентрацией глюкозы; на скорость потребления кислорода (OCR), отражающую клеточное дыхание, в базальных

условиях и после последовательного добавления веществ, влияющих на перенос электронов в дыхательной цепи и окислительное фосфорилирование (рис. 6).

Сравнительный анализ дыхания астроцитов, культивируемых в средах с разным содержанием глюкозы, показал, что культуры значимо не отличались по таким параметрам, как базальное дыхание, максимальное дыхание после добавления разобшителя и олигомицин-чувствительное потребление кислорода. Однако культивирование астроцитов в среде с HG приводило к повышенному уровню параметра дыхательной ёмкости, которая рассчитывается как разница между максимальным разобшённым дыханием и базальным дыханием (после добавления D-глюкозы) (рис. 6). При этом метформин значительно снижал как базальное дыхание, так и скорость максимального дыхания после разобшителя и олигомицин-чувствительное дыхание вне зависимости от концентрации глюкозы в среде, повышая при этом свободную дыхательную способность астроцитов. Важно отметить, что предобработка астроцитов метформином перед стимуляцией клеток LPS повышала дыхательную ёмкость, но только для астроцитов, культивируемых в среде с NG, не влияя на клетки, культивируемые в среде с HG.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время предложены различные экспериментальные клеточные модели гипергликемии астроцитов (с различными концентрациями глюкозы и временем обработки), в которых сообщалось о сдвиге клеточного ответа в сторону увеличения экспрессии и высвобождения провоспалительных цитокинов [22, 30, 31]. Полученные нами данные на модели 48 ч предобработки клеток высокой концентрацией глюкозы также показывают, что ответ на LPS сдвигается в сторону увеличения синтеза $TNF\alpha$, IL-6 и IL-1 β . При этом метформин снижает высвобождение цитокинов независимо от концентрации глюкозы, снижая синтез интерлейкинов IL-1 β и IL-6. Ранее в литературе была показана противовоспалительная способность метформина, предобработка которым способна снижать экспрессию IL-6 в LPS-стимулированных макрофагах [32], а также снижает выброс IL-1 β в клеточной линии BV2 [33]. Интересно, что в нашей модели не было влияния мет-

формина на TNF α , что отмечалось и на линии микроглии [33]. Можно заключить, что противовоспалительные эффекты метформина схожи для различных типов клеток, не зависят от концентрации глюкозы в среде, однако имеют множественные точки воздействия на сигнальные пути, что может давать вариации для различных цитокинов в контексте специфичности их регуляции в разных типах клеток.

В пользу предположения о не прямой связи между антигликемическими и противовоспалительными эффектами метформина указывают и полученные нами данные о независимом от гипергликемии воздействии метформина на активность транскрипционного фактора STAT3. Ранее в модели *in vivo* повреждения спинного мозга на крысах было показано, что метформин снижает активацию STAT3 в астроцитах [16]. Наши данные *in vitro* по снижению активности STAT3 при действии метформина согласуются с этим исследованием. Эффект метформина проявляется независимо от стимуляции LPS, хотя усиливается в его присутствии. Ранее также была показана взаимосвязь LPS, STAT3 и IL-6 в клетках мозга и зависимость синтеза IL-6 от уровня активности STAT3 [34]. Наши данные также указывают на возможность существования такой взаимосвязи, поскольку мы наблюдали снижение уровней высвобождения IL-6 и активности STAT3 при действии метформина. Интересно, что более выраженный эффект метформина, как противовоспалительного вещества, наблюдается при культивации клеток в среде с NG.

Ранее было показано, что метформин снижает LPS-стимулированный рост фосфорилирования ERK в макрофагах [28]. Известно, что стимуляция астроцитов LPS приводит к активации ERK [26]. Наши результаты показывают, что метформин снижает LPS-стимулированную активность ERK вне зависимости от концентрации глюкозы. Интересно, что активность ERK в клетках, культивируемых при высокой концентрации глюкозы, значительно ингибируется в присутствии метформина и без стимуляции LPS. Хотя сложно сопоставлять первичные клетки и линии клеток, следует отметить, что на линии SH-SY5Y (нейробластома) снижение активности ERK наблюдали при дефиците глюкозы в среде культивирования [35]. Заманчиво предположить, что есть система, которая регулирует гомеостаз клеток относительно отклонения концентрации внеклеточной глюкозы от нормы, и ERK относится к этой системе.

В контексте взаимосвязи энергетических процессов клеток и их способностью отвечать на действие провоспалительных стимулов наименее изученной остаётся система метаболизма оксипиринов. Ранее нами было проведено сравнение LPS-стимулированного синтеза оксипиринов на астроцитах, которые были с самого начала выделения адаптированы к NG или HG в течение 12 дней [5]. Такая длительная адаптация клеток к глюкозе приводила к сдвигу в сторону провоспалительного состояния у HG-культур: увеличение оксипиринов СОХ-ветви метаболизма, при этом проявлялась толерантность клеток к действию LPS, т.е. снижение индуцируемого синтеза в условиях гипергликемии. Сравнивая модели обработки астроцитов глюкозой в течение 12 дней [5] и 2 дней, можно отметить сходство по направлению эффекта глюкозы на синтез индуцируемых СОХ-производных, хотя при 12 днях инкубации в среде с HG эффекты толерантности значительно более выраженные.

Различия между моделями наблюдались по высвобождаемым кислотам. При гипергликемии для 12-дневной культуры детектировали увеличение высвобождаемых полиненасыщенных жирных кислот (AA, DHA, EPA), для 2-дневной обработки детектировали снижение выброса AA и EPA. Метформин не оказывал эффекта на высвобождение кислот в условиях HG, однако значительно увеличивал концентрацию кислот в условиях NG. Механизм этого не ясен, однако имеющиеся данные позволяют сделать предположение о независимой регуляции синтеза оксипиринов и высвобождения полиненасыщенных жирных кислот во внеклеточную среду, высказанное нами ранее [5].

При действии LPS наблюдалось значительное увеличение синтеза производных СОХ-ветви метаболизма оксипиринов как в условиях NG, так и в HG, при этом в условиях HG ответ был менее выраженным по сравнению с NG. Это соответствует данным, полученным с 12-дневной моделью. Данные по экспрессии СОХ-2 согласуются с наблюдаемым снижением уровня оксипиринов, синтезируемых по СОХ-ветви метаболизма, при этом метформин ингибировал синтез этих соединений.

Из детектируемых оксипиринов значимое различие проявлял эндогенный каннабиноид анандамид (AEA), синтез которого при стимуляции LPS был увеличен при HG. В литературе практически отсутствуют исследования в этой области, не понятна до конца роль са-

мого анандамида. В модели диабета на крысах было показано, что терапия животных анандамидом снижала депрессивно-подобное поведение и параметры окислительного стресса у животных [36], т.е. можно предположить, что анандамид, скорее, можно отнести к противовоспалительным соединениям. Однако в нашей экспериментальной модели метформин ингибировал синтез АЕА, что соответствует данным на других тканях, где АЕА в крови был маркером заболевания, а введение метформина снижало концентрацию АЕА и выраженность синдрома поликистоза яичников [37].

Известно, что условия гипергликемии вызывают в глиальных клетках увеличение продукции АФК [38, 31]. На кардиомиоцитах было показано, что LPS стимулирует АФК и эффект усиливается при повышении концентрации глюкозы [39]. Мы наблюдали увеличение выброса АФК астроцитами при стимуляции клеток LPS, при этом повышение концентрации глюкозы усиливало выброс цитоплазматических АФК. Интересно, что метформин не оказывал эффекта на LPS-стимулируемый синтез АФК независимо от концентрации глюкозы, что совпадает с ранее полученными данными для макрофагов [40].

Мы наблюдали независимость гликолитической способности астроцитов от всех обработок (концентрации глюкозы, стимуляция LPS, добавление метформина или метформина с LPS), повышение при гипергликемии негликолитического закисления при всех обработках. Метформин оказывал влияние только на базальный гликолиз, причём независимо от того, при какой концентрации глюкозы активировали клетки. Интересно, что такое же, только с обратным знаком, влияние метформин оказывал на базальное дыхание митохондрий и окислительное фосфорилирование. Ранее в работе Li et al. [15] на астроцитах мыши было показано, что миллимолярная доза метформина снижает окислительное фосфорилирование в клетках. При этом в проведённых нами экспериментах метформин значительно снижал как базальное дыхание, так и максимальное (стимулированное разобщителем) дыхание, и олигомицин-чувствительное дыхание (отражает активность окислительного фосфорилирования) независимо от концентрации глюкозы в среде, при этом повышая дыхательную ёмкость астроцитов, т.е. возможность увеличивать потребление кислорода при действии разобщителя (что косвенно указывает на возрастание

количества дыхательных комплексов в митохондриях). Ранее показано, что метформин на астроцитах усиливал потребление глюкозы и выделение лактата, блокировал цикл трикарбоновых кислот и дыхание митохондрий [20]. Следует отметить, что стимуляция 4 ч LPS не приводит к значимым изменениям в энергетическом метаболизме клеток, культивируемых в нормальных условиях. Некоторые изменения видны для клеток, культивируемых в условиях гипергликемии, но неясно, оказывают ли эти изменения влияние на синтез цитокинов и оксипиринов при воспалительном ответе.

Интересно наблюдаемое явление — повышение базального гликолиза и снижение базального митохондриального дыхания, окислительного фосфорилирования и максимального дыхания под действием метформина, что характеризует метаболическое перепрограммирование астроцитов, ведущее к изменению типа биоэнергетики с преимущественно аэробного дыхания на гликолиз. Данное явление впервые было описано Варбургом для опухолевых клеток, однако к настоящему времени Варбург-подобный сдвиг энергетического метаболизма известен для множества типов клеток, в том числе и для клеток мозга [41]. Механизмы, лежащие в основе переключения метаболизма с митохондриального дыхания на преимущественно гликолитические, включают в себя активацию транспорта глюкозы (в том числе через усиление экспрессии GLUT1) и ферментов гликолиза (например, гексокиназы). Также регуляторным звеном в снижении митохондриального дыхания и параллельном увеличении гликолитического метаболизма является пируватдегидрогеназный комплекс, который направляет продукт гликолиза (пируват) на окисление в митохондрии [42], при его ингибировании происходит снижение дыхания и усиление гликолиза. Для раковых клеток уже было показано, что метформин способствует метаболическому сдвигу в сторону гликолиза, в частности через активацию GLUT1 [43]. Аналогичные изменения известны для лимфоцитов, где усиление потребления глюкозы также связано с инсулиновым сигналингом и усилением экспрессии GLUT1 [44]. Мы впервые в данной работе показываем Варбург-подобный эффект у астроцитов, который может иметь очень важное значение для работы мозга. Известно, что одним из наиболее активно используемых энергетических субстратов для нейронов является лактат, причём производят его в основ-

ном астроциты, выбрасывая во внеклеточное пространство, откуда его поглощают близлежащие нейроны [45]. То есть астроглия выполняет роль производителя основного топлива для работы нейронов. При действии метформина основной наблюдаемый нами эффект – увеличение закисления внеклеточной среды в результате выброса лактата. Таким образом, усиление гликолиза может обуславливать увеличение трофических функций астроцитов. Отметим также, что митохондрии являются одним из основных потребителей жирных кислот, которые выполняют функцию энергетического субстрата, поэтому уменьшение митохондриального дыхания при действии метформина может приводить и к модуляциям синтеза оксипиринов.

В настоящее время метформин считается привлекательным препаратом для терапии нейровоспаления, однако в ряде случаев отмечаются и побочные эффекты его применения [14]. Эффекты метформина связывают в первую очередь с его способностью регулировать энергетические процессы в клетках. Астроциты являются глиальными клетками, которые играют ключевую роль в обмене глюкозы и в поддержании гомеостаза нервной системы, в том числе регуляции ответов врождённого иммунитета при различных воздействиях. В нашей работе выявлено, что на астроцитах, отвечающих на провоспалительный стимул LPS, противовоспа-

лительные эффекты метформина не связаны напрямую с его влиянием на энергетический метаболизм. Такая разобщённость между двумя эффектами (влияние на энергетический обмен и противовоспалительный эффект), обнаруженная нами при применении метформина, должна быть учтена при разработке терапевтических подходов, сфокусированных на модуляции функций астроцитов в различных патологиях нервной системы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-74-00068).

Благодарности. Мы благодарны Программе развития МГУ за предоставленный доступ к конфокальному микроскопу Zeiss LSM900.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с требованиями Комиссии по биоэтике НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского. Все манипуляции выполняли в соответствии с руководством Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bai, B., and Chen, H. (2021) Metformin: A novel weapon against inflammation, *Front. Pharmacol.*, **12**, 622262, doi: 10.3389/fphar.2021.622262.
- Foretz, M., Guigas, B., and Viollet, B. (2019) Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **15**, 569-589, doi: 10.1038/s41574-019-0242-2.
- Markowicz-Piasecka, M., Sikora, J., Szydłowska, A., Skupień, A., Mikiciuk-Olasik, E., et al. (2017) Metformin – a future therapy for neurodegenerative diseases, *Pharm. Res.*, **34**, 2614-2627, doi: 10.1007/s11095-017-2199-y.
- Chistyakov, D. V., Astakhova, A. A., and Sergeeva, M. G. (2018) Resolution of inflammation and mood disorders, *Exp. Mol. Pathol.*, **105**, 190-201, doi: 10.1016/j.yexmp.2018.08.002.
- Chistyakov, D. V., Goriainov, S. V., Astakhova, A. A., and Sergeeva, M. G. (2021) High glucose shifts the oxylipin profiles in the astrocytes towards pro-inflammatory states, *Metabolites*, **11**, 311, doi: 10.3390/metabo11050311.
- Kim, S. A., and Choi, H. C. (2012) Metformin inhibits its inflammatory response via AMPK-PTEN pathway in vascular smooth muscle cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **425**, 866-872.
- Jing, Y., Wu, F., Li, D., Yang, L., Li, Q., and Li, R. (2018) Metformin improves obesity-associated inflammation by altering macrophages polarization, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **461**, 256-264.
- Qi, T., Chen, Y., Li, H., Pei, Y., Woo, S. L., et al. (2017) A role for PFKFB3/iPKF2 in metformin suppression of adipocyte inflammatory responses, *J. Mol. Endocrinol.*, **59**, 49-59.
- Zhou, J., Massey, S., Story, D., and Li, L. (2018) Metformin: An old drug with new applications, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2863, doi: 10.3390/ijms19102863.
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., et al. (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions, *Nat. Neurosci.*, **24**, 312-325.
- Linnerbauer, M., Wheeler, M. A., and Quintana, F. J. (2020) Astrocyte crosstalk in CNS inflammation, *Neuron*, **108**, 608-622.
- Lalo, U., and Pankratov, Y. (2021) Astrocytes as per-

- spective targets of exercise- and caloric restriction-mimetics, *Neurochem. Res.*, **46**, 2746-2759.
13. Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P. J. (2011) Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation, *Cell Metab.*, **14**, 724-738.
 14. Rotermund, C., Machetanz, G., and Fitzgerald, J. C. (2018) The therapeutic potential of metformin in neurodegenerative diseases, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **9**, 400, doi: 10.3389/fendo.2018.00400.
 15. Li, W., Chaudhari, K., Shetty, R., Winters, A., Gao, X., et al. (2019) Metformin alters locomotor and cognitive function and brain metabolism in normoglycemic mice, *Aging Dis.*, **10**, 949-963.
 16. Ge, A., Wang, S., Miao, B., and 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**, 5229-5237.
 17. Ou, Z., Kong, X., Sun, X., He, X., Zhang, L., et al. (2018) Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice, *Brain. Behav. Immun.*, **69**, 351-363.
 18. Wang, G., Cui, W., Chen, S., Shao, Z., Li, Y., et al. (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**, 908-913.
 19. Hohnholt, M. C., Blumrich, E. M., Waagepetersen, H. S., and Dringen, R. (2017) The antidiabetic drug metformin decreases mitochondrial respiration and tricarboxylic acid cycle activity in cultured primary rat astrocytes, *J. Neurosci. Res.*, **95**, 2307-2320.
 20. Westhaus, A., Blumrich, E. M., and Dringen, R. (2017) The antidiabetic drug metformin stimulates glycolytic lactate production in cultured primary rat astrocytes, *Neurochem. Res.*, **42**, 294-305.
 21. Astakhova, A., Chistyakov, D., Thomas, D., Geisslinger, G., Brüne, B., et al. (2019) Inhibitors of oxidative phosphorylation modulate astrocyte inflammatory responses through AMPK-dependent PtgS2 mRNA stabilization, *Cells*, **8**, 1185.
 22. Chistyakov, D. V., Azbukina, N. V., Astakhova, A. A., Polozhintsev, A. I., Sergeeva, M. G., et al. (2019) Toll-like receptors control p38 and JNK MAPK signaling pathways in rat astrocytes differently, when cultured in normal or high glucose concentrations, *Neurochem. Int.*, **131**, 104513, doi 10.1016/j.neuint.2019.104513.
 23. Chistyakov, D. V., Gavrish, G. E., Goriainov, S. V., Chistyakov, V. V., Astakhova, A. A., et al. (2020) Oxylipin profiles as functional characteristics of acute inflammatory responses in astrocytes pre-treated with IL-4, IL-10, or LPS, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1780.
 24. Chistyakov, D. V., Aleshin, S. E., Astakhova, A. A., Sergeeva, M. G., and 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**, 113-124.
 25. Guryleva, M. V., Chistyakov, D. V., Lopachev, A. V., Goriainov, S. V., Astakhova, A. A., et al. (2021) Modulation of the primary astrocyte-enriched cultures' oxylipin profiles reduces neurotoxicity, *Metabolites*, **11**, 498, doi: 10.3390/metabo11080498.
 26. Gong, P., Xu, X., Shi, J., Ni, L., Huang, Q., et al. (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**, e81747, doi: 10.1371/journal.pone.0081747.
 27. Liu, X., Tian, Y., Lu, N., Gin, T., Cheng, C. H. K., et al. (2013) Stat3 inhibition attenuates mechanical allodynia through transcriptional regulation of chemokine expression in spinal astrocytes, *PLoS One*, **8**, e75804, doi: 10.1371/journal.pone.0075804.
 28. Kim, J., Kwak, H. J., Cha, J. Y., Jeong, Y. S., Rhee, S. D., et al. (2014) Metformin suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in murine macrophages via Activating Transcription Factor-3 (ATF-3) induction, *J. Biol. Chem.*, **289**, 23246-23255.
 29. Li, W., Choudhury, G. R., Winters, A., Prah, J., Lin, W., et al. (2018) Hyperglycemia alters astrocyte metabolism and inhibits astrocyte proliferation, *Aging Dis.*, **9**, 674-684.
 30. Quincozes-Santos, A., Bobermin, L. D., de Assis, A. M., Gonçalves, C. A., and 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.
 31. Wang, J., Li, G., Wang, Z., Zhang, X., Yao, L., et al. (2012) High glucose-induced expression of inflammatory cytokines and reactive oxygen species in cultured astrocytes, *Neuroscience*, **202**, 58-68.
 32. Xian, H., Liu, Y., Rundberg Nilsson, A., Gatchalian, R., Crother, T. R., et al. (2021) Metformin inhibition of mitochondrial ATP and DNA synthesis abrogates NLRP3 inflammasome activation and pulmonary inflammation, *Immunity*, **54**, 1463-1477.e11.
 33. Tayara, K., Espinosa-Oliva, A. M., García-Domínguez, I., Ismaiel, A. A., Boza-Serrano, A., et al. (2018) Divergent effects of metformin on an inflammatory model of Parkinson's disease, *Front. Cell. Neurosci.*, **12**.
 34. Beurel, E., and Jope, R. S. (2009) Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain, *J. Neuroinflamm.*, **6**, 9, doi: 10.1186/1742-2094-6-9.
 35. Lamichhane, S., Bastola, T., Pariyar, R., Lee, E. S., Lee, H. S., et al. (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**, 674, doi: 10.3390/ijms18030674.
 36. De Morais, H., de Souza, C. P., da Silva, L. M., Ferreira, D. M., Baggio, C. H., et al. (2016) Anandamide reverses depressive-like behavior, neurochemical abnormalities and oxidative-stress parameters in streptozotocin-diabetic rats: role of CB1 receptors, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **26**, 1590-1600.

37. Cui, N., Feng, X., Zhao, Z., Zhang, J., Xu, Y., et al. (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**, 751-758.
38. Quan, Y., Jiang, C. T., Xue, B., Zhu, S. G., and 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**, 188-193.
39. Qiu, Z., He, Y., Ming, H., Lei, S., Leng, Y., et al. (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**, 8151836, doi: 10.1155/2019/8151836.
40. Kajiwarra, C., Kusaka, Y., Kimura, S., Yamaguchi, T., Nanjo, Y., et al. (2018) Metformin mediates protection against legionella pneumonia through activation of AMPK and mitochondrial reactive oxygen species, *J. Immunol.*, **200**, 623-631.
41. Barros, L. F., Ruminot, I., San Martín, A., Lerchundi, R., Fernández-Moncada, I., et al. (2021) Aerobic glycolysis in the brain: Warburg and Crabtree Contra Pasteur, *Neurochem. Res.*, **46**, 15-22.
42. Zhang, J., Zhang, L., Nie, J., Lin, Y., Li, Y., et al. (2021). Calcineurin inactivation inhibits pyruvate dehydrogenase complex activity and induces the Warburg effect, *Oncogene*, **40**, 6692-6702.
43. Alhourani, A. H., Tidwell, T. R., Bokil, A. A., Røslund, G. V., Tronstad, K. J., et al. (2021). Metformin treatment response is dependent on glucose growth conditions and metabolic phenotype in colorectal cancer cells, *Sci. Rep.*, **11**, 1-10.
44. Frauwirth, K. A., Riley, J. L., Harris, M. H., Parry, R. V., Rathmell, J. C., et al. (2002). The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism, *Immunity*, **16**, 769-777, doi: 10.1016/s1074-7613(02)00323-0.
45. Mason, S. (2017). Lactate shuttles in neuroenergetics-homeostasis, allostasis and beyond, *Front. Neurosci.*, **11**, 43, doi: 10.3389/fnins.2017.00043.

ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF METFORMIN DURING CULTIVATION OF PRIMARY RAT ASTROCYTES IN A MEDIUM WITH HIGH GLUCOSE CONCENTRATION

**V. O. Gorbatenko¹, S. V. Goriainov², V. A. Babenko³,
E. Yu. Plotnikov³, M. G. Sergeeva³, and D. V. Chistyakov^{3*}**

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 117198 Moscow, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail chistyakov@gmail.com

Investigation of the relationship between inflammation and energy metabolism is important for understanding the biology of chronic noncommunicable diseases. The use of metformin, a drug for the treatment of diabetes, is considered as a promising direction for the treatment of neurodegenerative diseases and other neuropathology's with an inflammatory component. Astrocytes play an important role in the regulation of energy metabolism and neuroinflammation; therefore, we studied the effect of metformin on the cellular responses of primary rat astrocytes cultured in a medium with high glucose concentration (incubation for 48 h, 22.5 mM). Lipopolysaccharide (LPS) was used as an inflammatory stimulus. The effects of metformin were assessed by changes in the expression of proinflammatory cytokines and the synthesis of oxylipins, detected by ultra-high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Changes at the intracellular level were assessed by analyzing the phosphorylation of ERK kinase and the transcription factor STAT3, cyclooxygenase 1 and 2 (COX) oxylipin synthesis enzymes. It was found that, regardless of glucose concentration, metformin reduces the LPS-stimulated release of cytokines IL-1 β and IL-6, the activity of the transcription factor STAT3, ERK kinase, the synthesis of derivatives of the cyclooxygenase branch of metabolism of oxylipins and anandamide, and did not affect the formation of ROS. The study of the energy phenotype of cells showed that metformin activated glycolysis and inhibited mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation, regardless of LPS stimulation and cell cultivation in high glucose concentration. Thus, it has been shown that metformin has anti-inflammatory effects, and its effect on the synthesis of cytokines, prostaglandins, and other lipid mediators can determine the beneficial effects of metformin in models of neuropathology.

Keywords: astrocytes, hyperglycemia, cytokines, oxylipins, STAT3, ERK, ROS, polyunsaturated fatty acids, anandamide, metformin