

На правах рукописи

АЛЁШИН СТЕПАН ЕВГЕНЬЕВИЧ

**ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ЯДЕРНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$   
И ЕЁ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА.**

Специальность 03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-2009

Работа выполнена на факультете Биотехнологии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова в группе системной биологии липидов (отдел биокинетики).

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

**Официальные оппоненты:** доктор химических наук, профессор  
Копылов Алексей Михайлович

доктор биологических наук  
Павлова Галина Валериевна

**Ведущая организация:** Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и  
Ю.А.Овчинникова РАН

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 г. в «\_\_\_\_\_» часов на заседании совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу:  
119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, лабораторный корпус «А», аудитория 536.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва.

Автореферат разослан “\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2009г.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

И.А. Крашенинников

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

Рецепторы пролифераторов пероксисом (PPAR) относятся к классу ядерных рецепторов, регулирующих транскрипцию. Существует три изоформы этих рецепторов –  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . Синтетические агонисты PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  используют для лечения гиперлипидемии и диабета 2 типа, и в настоящее время их предлагают как противовоспалительные средства. Агонисты PPAR $\beta$  как лекарственные средства ещё не зарегистрированы, тем не менее, они считаются перспективными для лечения дислипидемии, ожирения и нарушений механизмов восстановления и регенерации тканей. Предполагают, что нарушение функций этих рецепторов приводит к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, возникновению рака, гипертонии, развитию нейродегенеративных заболеваний и хронического воспаления. По этой причине транскрипционные факторы PPAR активно изучаются. Эффективность применения синтетических агонистов PPAR для терапии таких дисфункций мозга как инсульт, травма, болезни Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона и др. была показана на животных. Считается что нейропротективные свойства агонистов PPAR связаны с их противовоспалительными эффектами, поэтому в настоящее время актуальны исследования механизмов действия синтетических агонистов PPAR при воспалении, которое моделируется как на уровне целого организма, так и на уровне клеток мозга.

В развитии воспалительных процессов в мозге ключевая роль принадлежит клеткам глии. Среди глиальных клеток следует выделить астроциты, являющиеся основным источником полиненасыщенных жирных кислот и простагландинов – важных провоспалительных веществ и эндогенных лигандов PPAR. Ключевыми ферментами продукции полиненасыщенных жирных кислот и простагландинов являются фосфолипазы A<sub>2</sub> и циклооксигеназы, соответственно. Эти ферменты относятся к так называемым PPAR лиганд-синтезирующим ферментам. Имеются сведения, что применение синтетических агонистов PPAR может приводить к изменениям уровней экспрессии фосфолипаз и циклооксигеназ, однако влияние лигандов PPAR на экспрессию этих ферментов в астроцитах не изучено. В последние годы было охарактеризовано влияние агонистов

PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  на различные клеточные ответы астроцитов (пролиферацию, выброс цитокинов, и др.), однако экспрессия самих PPAR при этом не изучалась, хотя известно, что изменение экспрессии PPAR является одним из важных механизмов регуляции этих транскрипционных факторов. Несмотря на то, что ряд данных позволяет предположить наличие взаимодействий между изотипами PPAR на уровне взаимной регуляции их экспрессии, в настоящий момент практически не существует работ, посвящённых исследованию взаимодействий всех трёх изотипов PPAR.

Способность PPAR регулировать экспрессию своих лиганд-синтезирующих ферментов с одной стороны, и участие лигандов в регуляции экспрессии самих PPAR с другой стороны, указывают на наличие сложной системы взаимодействий между фосфолипазами A<sub>2</sub>, циклооксигеназами и PPAR. Тем не менее, до сих пор не было попыток изучить эти белки и взаимосвязи между ними как единую систему функционально взаимодействующих белков. Изучению этой системы и посвящена данная работа.

### **Цели и задачи исследования**

Целью данной работы было исследовать взаимосвязь между изоформами PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и их лиганд-синтезирующих ферментов циклооксигеназы и фосфолипазы A<sub>2</sub>; установить роль этой взаимосвязи при ответе астроцитов на провоспалительную стимуляцию.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить влияние синтетических агонистов PPAR на экспрессию PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ; цитозольной и секреторной фосфолипаз A<sub>2</sub> и циклооксигеназ.
2. Установить наличие и характер взаимодействия между изоформами PPAR в астроцитах, стимулированных липополисахаридом (ЛПС), изучить влияние комбинаций синтетических агонистов PPAR на уровни экспрессии PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ .
3. Изучить совместное влияние изоформ PPAR на экспрессию ключевого фермента синтеза простагландинов – циклооксигеназы в астроцитах, стимулированных ЛПС.

4. Установить влияние различных изоформ PPAR на экспрессию цитозольной и секреторной фосфолипаз  $A_2$  в астроцитах, стимулированных ЛПС.
5. Установить PPAR-лигандсинтезирующую роль фосфолипаз  $A_2$  и циклооксигеназы в регуляции PPAR-опосредованной транскрипции циклооксигеназы в астроцитах, стимулированных ЛПС.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

В работе было впервые показано, что изоформы ядерных рецепторов PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  способны регулировать экспрессию друг друга. В настоящее время многие фармацевтические компании ведут разработки двойных агонистов PPAR, активирующих сразу несколько изоформ PPAR. Данные о взаимодействии изоформ PPAR позволят лучше прогнозировать эффекты этих агонистов.

Впервые было охарактеризовано влияние комбинированного воздействия синтетических PPAR агонистов на уровень экспрессии COX-2. С использованием ингибиторного анализа и метода нокдауна получены данные, подтверждающие ключевую роль PPAR $\beta$  в регуляции экспрессии COX-2; показано, что эндогенные PPAR лиганды, продуцируемые COX-2 и фосфолипазой  $A_2$ , участвуют в активации ЛПС-индуцированной транскрипции COX-2 за счет связывания с PPAR $\beta$ . Обнаруженные эффекты по влиянию комбинированного применения PPAR агонистов на экспрессию COX-2 позволят разработать методы регулирования экспрессии гена этого фермента при терапии заболеваний с воспалительной компонентой.

Показано участие всех трёх изоформ PPAR в регуляции уровня экспрессии цитозольной и секреторной изоформ фосфолипазы  $A_2$  в астроцитах, стимулированных ЛПС. Результаты, демонстрирующие различие в динамике экспрессии фосфолипаз  $A_2$  при обработке астроцитов агонистами различных изоформ PPAR, не имеют аналогов в мировой литературе.

В результате проделанной работы была предложена схема системы взаимодействий трёх изоформ PPAR, фосфолипаз  $A_2$  и COX-2. В данной схеме учитывается влияние как синтетических, так и эндогенных лигандов, продуцируемых при активации фосфолипаз и циклооксигеназы в процессе воспалительного ответа.

Важность полученных результатов для фундаментальной науки и практической медицины заключена в том, что активация этих ферментов является одним из основных компонентов ишемии мозга и нейродегенеративных заболеваний. Результаты этой работы могут найти применение в теоретической и экспериментальной физиологии, патофизиологии и фармакологии.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на XIV, XV и XVI международных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, Россия, 2007, 2008, 2009), Международных конференциях "Рецепция и внутриклеточная сигнализация (Пушино, 5-7 июня 2007 г.; 2-4 июня 2009 г.)", 48<sup>ой</sup> встрече американского общества клеточных биологов в Сан-Франциско «The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting 2008».

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ. Из них статей - 2, статей в сборниках - 2, материалов конференций - 6.

**Структура и объём работы.** Диссертация изложена на \_\_\_\_\_ страницах, содержит \_\_\_\_\_ рисунков и \_\_\_\_\_ таблиц, и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Выводы» и «Список литературы» (\_\_\_\_\_ цитированных работ).

**Список сокращений.** PPAR– рецепторы активаторов пролиферации пероксисом; COX– циклооксигеназа; ФЛА<sub>2</sub>– фосфолипаза А<sub>2</sub>; ЛПС– липополисахарид клеточной стенки бактерий; ГАФД– глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; ПНЖК– полиненасыщенные жирные кислоты; ПГ– простагландины.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Астроциты выделяли из мозгов новорожденных крыс, работали на клетках второго пассажа. Воспалительный ответ моделировали липополисахаридом (ЛПС), который является широко используемым провоспалительным стимулом. ЛПС связывается с так называемыми Толл-подобными рецепторами, которые встречаются практически на всех клетках животных, в том числе и на астроцитах. Определение экспрессии генов проводили методом ПЦР в реальном времени с помощью набора «SYBR green PCR Master Mix» (Bio-Rad). Уровень экспрессии генов сравнивали с уровнем экспрессии ГАФД и нормировали на значения, полученные для контрольных клеток. Определение количества белка проводилось методом иммуноблотинга, для проявки использовался ECL-реагент. Данные нормировались на концентрацию  $\beta$ -тубулина, количество белка в

контрольных клетках принимали за единицу. ДНК-связывающая активность изоформ PPAR определялась с помощью иммуноферментного набора «PPAR $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  Complete Transcription Factor Assay Kit» (Cayman Chemical). Значение активности нормировалось на контрольные клетки, ДНК-связывающая активность изоформ PPAR в которых принималась за 100%. Для трансфекции астроцитов миРНК и плазмидой, сверхэкспрессирующей PPAR $\beta$ , использовалась магнитная трансфекция. Для измерения эффективности нокдауна и сверхэкспрессии использовали иммуноблотинг. Нокдаун считался эффективным при снижении уровня белка на 90%. Концентрация простагландина E<sub>2</sub> в культуральной жидкости измерялась методами ESI/MS и ИФА. Полученные данные обрабатывали по методам корреляционного и вариационного анализа (ANOVA) и критерия Стьюдента (t-тест). Все измерения проводились не менее трех раз. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . Все погрешности отражают стандартное квадратичное отклонение.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ**

### **1. Исследование влияния синтетических агонистов PPAR на экспрессию PPAR $\alpha$ , $\beta$ и $\gamma$ ; цитозольной и секреторной фосфолипаз A<sub>2</sub> и циклооксигеназ**

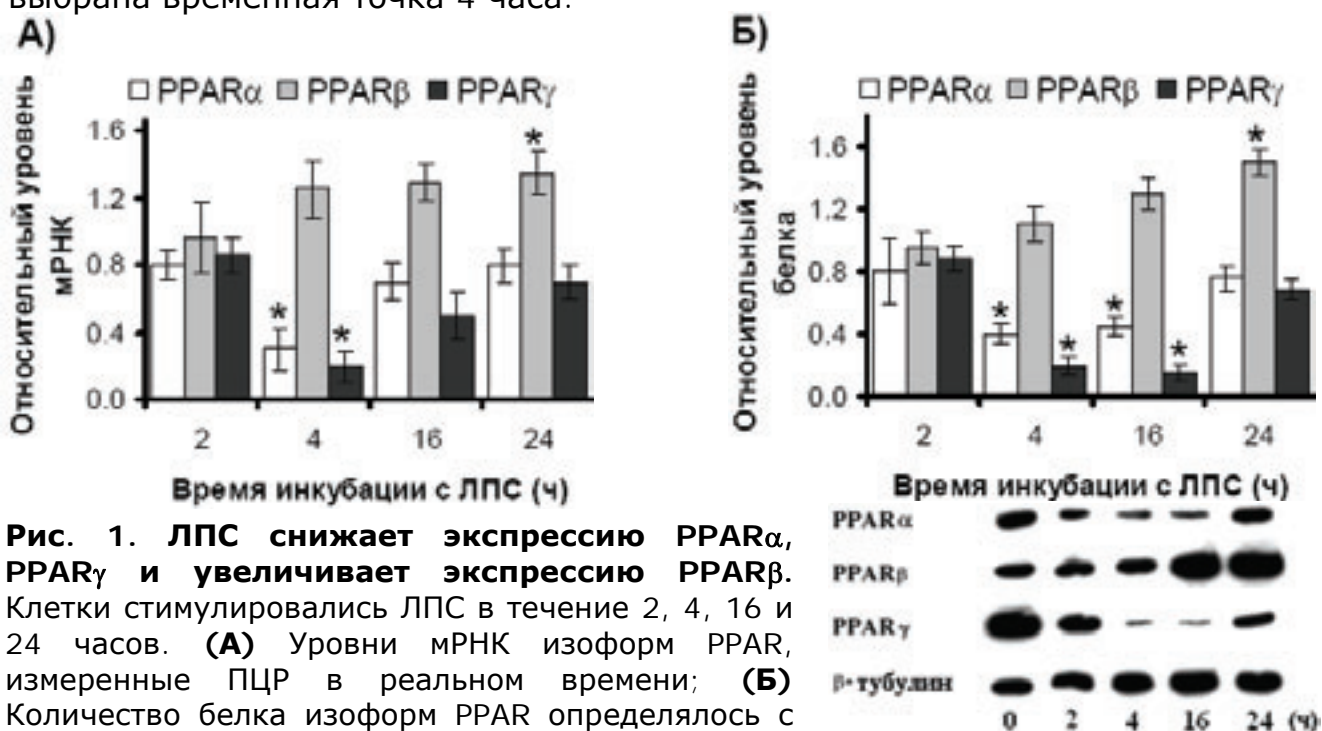
Влияние синтетических агонистов PPAR на экспрессию изоформ PPAR и их лиганд-синтезирующих ферментов ранее не изучалось, поэтому мы исследовали влияние GW7647 (PPAR $\alpha$  агонист), L-165041 (PPAR $\beta$  агонист) и росиглитазона (PPAR $\gamma$  агонист) на экспрессию этой группы генов. Показано, что синтетический агонист PPAR $\alpha$  увеличивает экспрессию PPAR $\beta$ , COX-1 и уменьшает экспрессию цитозольной и секреторной фосфолипаз A<sub>2</sub>; синтетический агонист PPAR $\beta$  увеличивает экспрессию PPAR $\beta$ , COX-1, и уменьшает экспрессию PPAR $\alpha$ , цитозольной и секреторной фосфолипаз A<sub>2</sub>; синтетический агонист PPAR $\gamma$  уменьшает экспрессию PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , COX-2, цитозольной и секреторной фосфолипаз A<sub>2</sub>. Таким образом, синтетические агонисты всех трех изоформ PPAR оказывают влияние на экспрессию PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ; цитозольной и секреторной фосфолипаз A<sub>2</sub> и циклооксигеназ.

### **2. Взаимосвязь PPAR $\alpha$ , $\beta$ и $\gamma$ в астроцитах, стимулированных ЛПС**

К началу нашей работы было известно, что уровень экспрессии PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  может меняться под воздействием провоспалительных стимулов. Тем не менее, на клетках мозга подобных работ не проводилось. Более того, ничего не было известно об изменении уровня экспрессии PPAR $\beta$  под действием провоспалительных стимулов. Поэтому мы исследовали уровни экспрессии трех изоформ PPAR при стимуляции астроцитов ЛПС. Поскольку воспалительный ответ является сложным, динамически развивающимся

процессом, на разных этапах которого могут активироваться различные транскрипционные факторы, мы изучали астроциты стимулированные ЛПС в течение 2, 4, 16 и 24 ч.

Получено, что уровни экспрессии PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  при инкубации клеток с ЛПС в течение 2-24 часов снижаются с минимумом при 4 часах стимуляции (Рис. 1А). Эти результаты согласуются с данными полученными на других типах клеток. Нами показано, что уровень мРНК PPAR $\beta$  возрастает при ЛПС стимуляции и к 24 часам значимо отличается от уровня экспрессии PPAR $\beta$  в контрольных клетках (Рис. 1А). Изменения уровней мРНК коррелируют с изменениями количества белка, измеренного иммуноблотингом (Рис. 1Б). Так как при 4 часах ЛПС стимуляции наблюдаются самые значительные изменения уровней экспрессии, то для дальнейшего изучения нами была выбрана временная точка 4 часа.

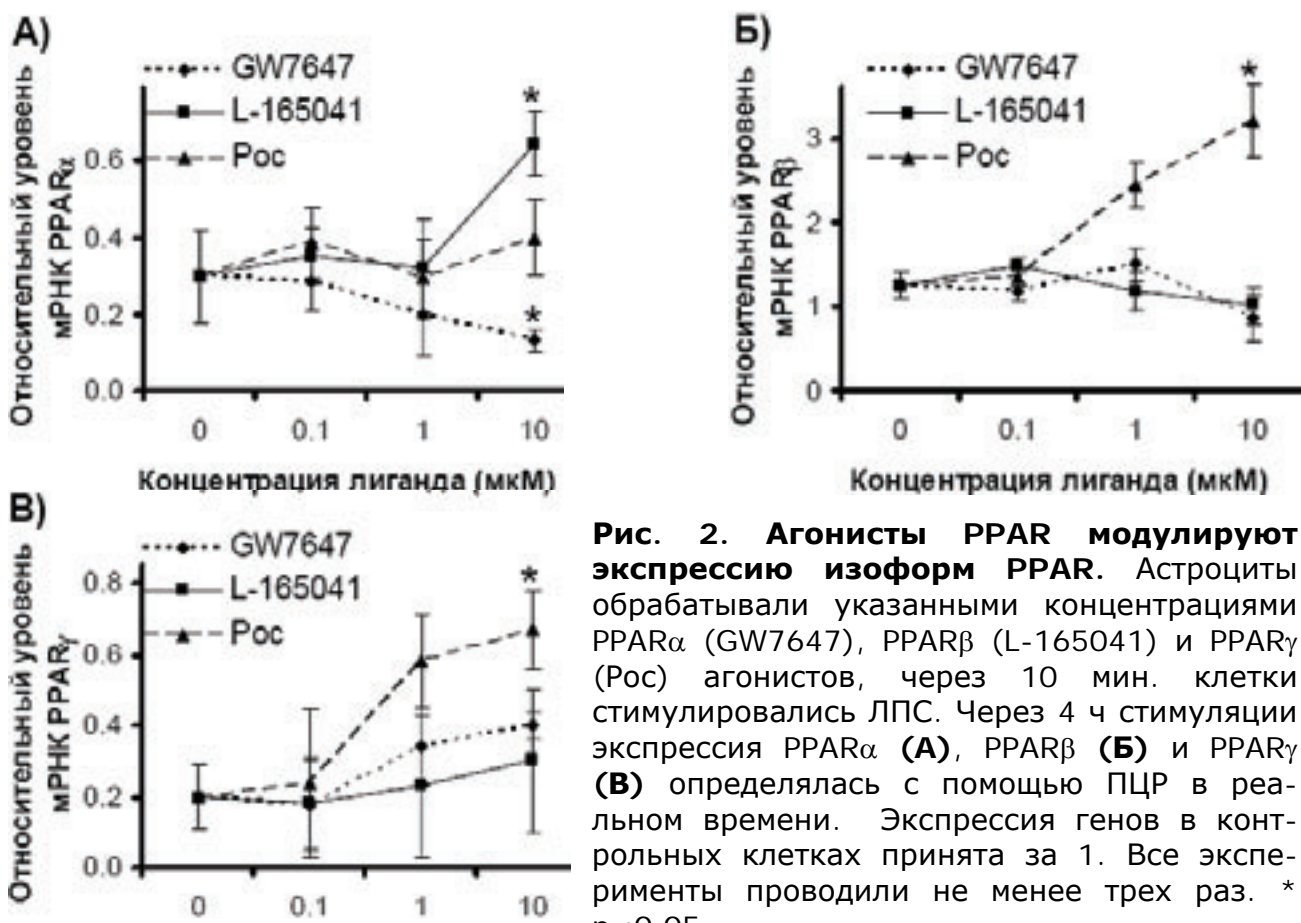


**Рис. 1. ЛПС снижает экспрессию PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  и увеличивает экспрессию PPAR $\beta$ .** Клетки стимулировались ЛПС в течение 2, 4, 16 и 24 часов. **(А)** Уровни мРНК изоформ PPAR, измеренные ПЦР в реальном времени; **(Б)** Количество белка изоформ PPAR определялось с помощью иммуноблотинга. Приведена одна типичная электрофореграмма и результаты денситометрии. Экспрессия генов в контрольных клетках принята за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. \*  $p < 0.05$ .

На основании анализа литературных данных мы предположили, что лиганды одной изоформы PPAR, способны изменять экспрессию другой изоформы. Для проверки этой гипотезы мы проводили следующие эксперименты: астроциты предынкубировались в течение 10 минут с различными концентрациями GW7647 (PPAR $\alpha$  агонист), L-165041 (PPAR $\beta$  агонист) и росиглитазона (PPAR $\gamma$  агонист). Далее клетки стимулировали ЛПС, через 4 часа стимуляции из астроцитов выделяли тотальную РНК и с помощью ПЦР в реальном времени анализировали уровни экспрессии



изоформ PPAR. Получено, что в астроцитах, стимулированных ЛПС, агонист PPAR $\alpha$  GW7647 концентрационно-зависимо снижает экспрессию своего рецептора (Рис. 2А). При использовании 10 мкМ GW7647 уровень экспрессии PPAR $\alpha$  снижается в два раза. Обработка астроцитов 10 мкМ агониста PPAR $\beta$  L-165041, приводит к двукратному увеличению уровня экспрессии PPAR $\alpha$ . PPAR $\gamma$  агонист росиглитазон не оказывал влияния на экспрессию PPAR $\alpha$  изоформы (Рис. 2А), то есть экспрессия PPAR $\alpha$  регулируется агонистами PPAR $\alpha$  и PPAR $\beta$ . В аналогичных экспериментах было показано, что только синтетический агонист PPAR $\gamma$  влияет на экспрессию PPAR $\beta$  и PPAR $\gamma$ , увеличивая её. (Рис. 2Б,В). Таким образом, все три агониста способны влиять на экспрессию изоформ PPAR в астроцитах, стимулированных ЛПС. Полученные данные указывают на существование взаимосвязей между тремя изоформами PPAR на уровне их экспрессии в астроцитах, стимулированных ЛПС.



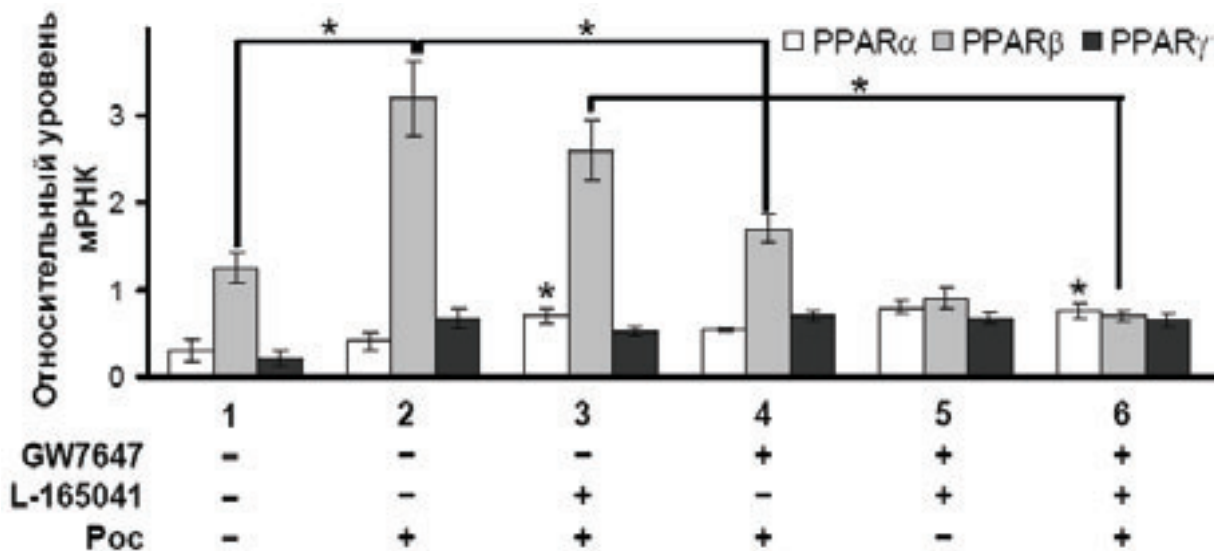
**Рис. 2. Агонисты PPAR модулируют экспрессию изоформ PPAR.** Астроциты обрабатывали указанными концентрациями PPAR $\alpha$  (GW7647), PPAR $\beta$  (L-165041) и PPAR $\gamma$  (Рос) агонистов, через 10 мин. клетки стимулировались ЛПС. Через 4 ч стимуляции экспрессия PPAR $\alpha$  (А), PPAR $\beta$  (Б) и PPAR $\gamma$  (В) определялась с помощью ПЦР в реальном времени. Экспрессия генов в контрольных клетках принята за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. \*  $p < 0.05$ .

### 2.1. Влияние комбинаций агонистов PPAR на экспрессию PPAR $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ .

Так как было показано, что агонисты PPAR способны менять уровни экспрессии изоформ этого семейства транскрипционных факторов, то можно предположить, что совместная обработка клеток агонистами нескольких изоформ PPAR будет приводить к синергетическим эффектам. Для проверки

этого предположения мы прединкубировали астроциты с различными комбинациями PPAR агонистов, затем стимулировали клетки ЛПС и измеряли уровни экспрессии изоформ PPAR на уровне мРНК и белка. Добавление только L-165041 или росиглитазона не оказывало влияния на экспрессию PPAR $\alpha$ , однако совместное добавление росиглитазона и L-165041 приводило к увеличению экспрессии PPAR $\alpha$  (Рис. 3; столбец 3). Эффект совместного применения может быть объяснен тем, что росиглитазон увеличивает уровень экспрессии PPAR $\beta$  (Рис. 3; столбец 2), порог чувствительности клеток к действию PPAR $\beta$  агониста снижается, и он начинает действовать в меньших концентрациях.

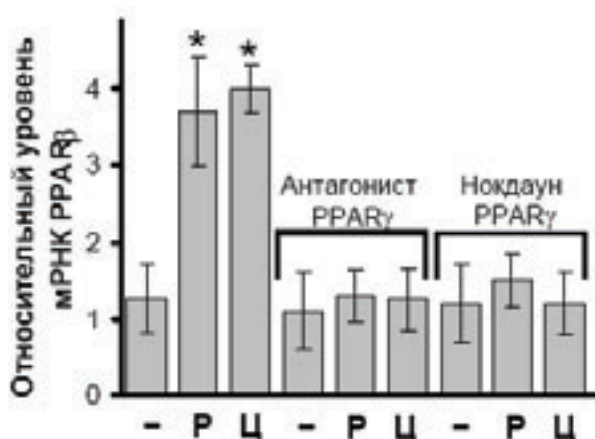
Интересно, что PPAR $\alpha$  агонист GW7647 не оказывает влияния на экспрессию PPAR $\beta$ , однако снимает росиглитазон-индуцированную экспрессию PPAR $\beta$  (Рис. 3; столбцы 2 и 4). Совместное добавление, всех трех агонистов приводит к максимальному падению экспрессии PPAR $\beta$  (Рис. 3; столбец 6). Это может объясняться тем, что в этих условиях экспрессия PPAR $\alpha$  максимальна, а также имеется избыток его агониста GW7647, то есть активность PPAR $\alpha$  также максимальна. Таким образом, комбинированное применение агонистов PPAR может приводить к сложным вторичным эффектам за счет модулирования уровней экспрессии их рецепторов.



**Рис. 3. Комбинации агонистов PPAR модулируют экспрессию изоформ PPAR.** Астроциты прединкубировались с PPAR $\alpha$  агонистом GW7647 (1 мкМ), PPAR $\beta$  агонистом L-165041 (1мкМ) и PPAR $\gamma$  агонистом росиглитазоном (Рос) (20мкМ), затем стимулировались ЛПС в течение 4 ч. Экспрессия изоформ PPAR определялась с помощью ПЦР в реальном времени. Экспрессия генов в контрольных клетках принята за 1. Все эксперименты проводили не менее трёх раз. \* p<0.05.

## 2.2. Росиглитазон индуцирует экспрессию PPAR $\beta$ через PPAR $\gamma$ -опосредованный путь

Агонисты PPAR могут действовать как через специфическую активацию PPAR, так и через неспецифические взаимодействия с другими мишенями в клетке. Для выяснения специфичности действия росиглитазона как PPAR $\gamma$  агониста мы использовали циглитазон, который является агонистом PPAR $\gamma$ , но имеет другую химическую структуру, а также антагонист PPAR $\gamma$  GW9662. Получено, что циглитазон оказывает такой же эффект, что и росиглитазон (Рис. 4). Предобработка клеток антагонистом GW9662 снимает индукцию экспрессии PPAR $\beta$  росиглитазоном или циглитазоном (Рис. 4). Эти результаты указывают на специфическое действие росиглитазона и циглитазона как PPAR $\gamma$  агонистов. Для подтверждения этого предположения мы исследовали астроциты с нокдауном PPAR $\gamma$  (Рис. 4). Полученные данные подтверждают, что росиглитазон увеличивает уровень экспрессии PPAR $\beta$  через активацию PPAR $\gamma$  рецептора.

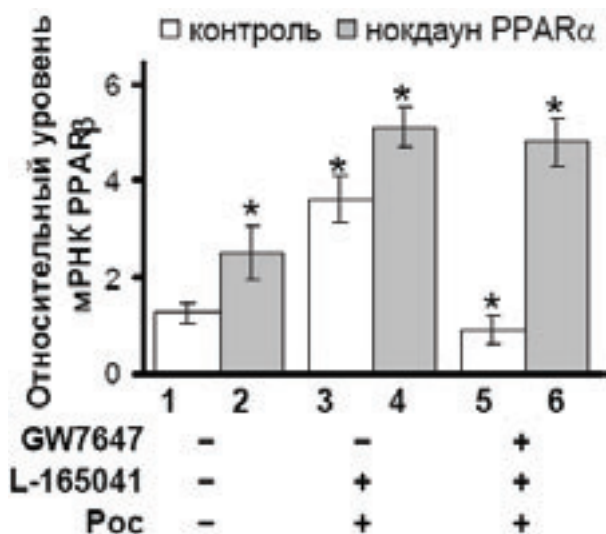


**Рис. 4. Активация PPAR $\gamma$  увеличивает экспрессию PPAR $\beta$  в астроцитах, стимулированных ЛПС.** Астроциты предобрабатывались антагонистом PPAR $\gamma$  GW9662 (1 мкМ) в течение 10 мин или использовались астроциты с нокдауном PPAR $\gamma$ . Далее клетки обрабатывали PPAR $\gamma$  агонистами росиглитазоном (P) и циглитазоном (Ц) в концентрации 20 и 40 мкМ соответственно, затем астроциты стимулировались ЛПС. Через 4 ч стимуляции экспрессия PPAR $\beta$  определялась с помощью ПЦР в реальном времени. Экспрессия генов в контрольных клетках принята за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. \*  $p < 0.05$ .

## 2.3. PPAR $\alpha$ агонист GW7647 снижает экспрессию PPAR $\beta$ через PPAR $\alpha$ -опосредованный путь

Агонисты PPAR $\alpha$  также могут оказывать PPAR неспецифические эффекты, поэтому для доказательства того, что влияние GW7647 на экспрессию PPAR $\beta$  является PPAR $\alpha$ -опосредованным процессом, мы получили астроциты с нокдауном PPAR $\alpha$ . Добавление GW7647 к изучаемой системе не оказывало влияния на экспрессию PPAR $\beta$  в астроцитах с нокдауном PPAR $\alpha$  (Рис. 5; столбец 6), что указывает на PPAR $\alpha$  опосредованный эффект этого агониста. Более того, измерение уровней мРНК в ЛПС-стимулированных клетках показало, что нокдаун PPAR $\alpha$  приводит к увеличению экспрессии PPAR $\beta$  в 2,5 раза (Рис. 5; столбцы 1 и 2).

Далее было показано, что изменение уровней мРНК PPAR $\beta$  коррелирует с изменениями количества белка PPAR $\beta$ . Таким образом, мы показали, что экспрессия PPAR $\beta$  находится под негативным контролем PPAR $\alpha$ .



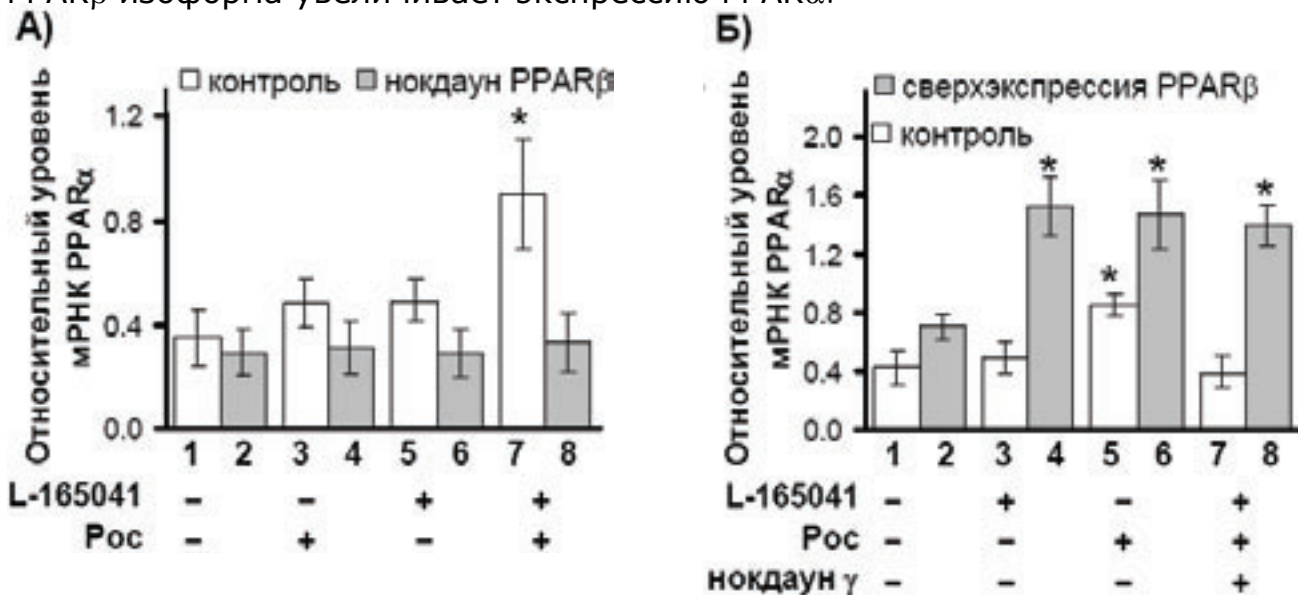
**Рис. 5. Активация PPAR $\alpha$  снимает увеличение экспрессии PPAR $\beta$ , вызванное активацией PPAR $\gamma$ .** Контрольные астроциты, также как и астроциты с нокдауном PPAR $\alpha$  предынкубировались с PPAR $\alpha$  агонистом GW7647 (1 мкМ), PPAR $\beta$  агонистом L-165041 (1мкМ) и PPAR $\gamma$  агонистом росиглитазоном (Рос) (20мкМ), затем клетки стимулировались ЛПС в течение 4 ч. Экспрессия PPAR $\beta$  определялась с помощью ПЦР в реальном времени. Экспрессия генов в контрольных клетках принята за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. \*  $p < 0.05$ .

#### 2.4. PPAR $\beta$ агонист L-165041 увеличивает экспрессию и активность PPAR $\alpha$ в астроцитах, стимулированных ЛПС, через PPAR $\beta$ - опосредованный путь

Поскольку было получено, что экспрессия PPAR $\alpha$  увеличивается только в астроцитах совместно обработанных росиглитазоном и L-165041, то есть в условиях активации, то мы предположили, что именно PPAR $\beta$  отвечает за увеличение уровня экспрессии PPAR $\alpha$ . Для того, чтобы доказать наличие связи между PPAR $\alpha$  и PPAR $\beta$  мы получили и исследовали астроциты с нокдауном PPAR $\beta$ . Действительно, в астроцитах, обработанных росиглитазоном и L-165041 совместно, нокдаун PPAR $\beta$  приводил к трехкратному снижению уровня экспрессии PPAR $\alpha$  (Рис. 6А; столбцы 7 и 8). Аналогичные результаты были получены и при измерении количества белка PPAR $\alpha$ .

Для подтверждения ключевой роли PPAR $\beta$  в индукции экспрессии PPAR $\alpha$  мы получили астроциты со сверхэкспрессией PPAR $\beta$  и провели их исследование. Показано, что избыток PPAR $\beta$  приводит к значительному увеличению уровня экспрессии мРНК PPAR $\alpha$  в клетках, обработанных PPAR $\beta$  агонистом (Рис. 6Б; столбцы 3 и 4). Этот эксперимент доказывает, что PPAR $\beta$  является позитивным регулятором экспрессии PPAR $\alpha$ . Поскольку нокдаун PPAR $\gamma$  изоформы в контрольных клетках приводил к снижению экспрессии PPAR $\alpha$  в астроцитах, обработанных росиглитазоном и L-165041 совместно (Рис. 6Б; столбцы 5 и 7), а сверхэкспрессия PPAR $\beta$  снимала этот

супрессирующий эффект нокдауна PPAR $\gamma$  (Рис. 6Б; столбцы 7 и 8), то можно сделать вывод, что роль PPAR $\gamma$  агониста в увеличении экспрессии PPAR $\alpha$  сводится к индукции экспрессии PPAR $\beta$ . Таким образом, наряду с позитивной регуляцией PPAR $\gamma$  изоформой и негативной регуляцией PPAR $\alpha$  изоформой, PPAR $\beta$  изоформа увеличивает экспрессию PPAR $\alpha$ .



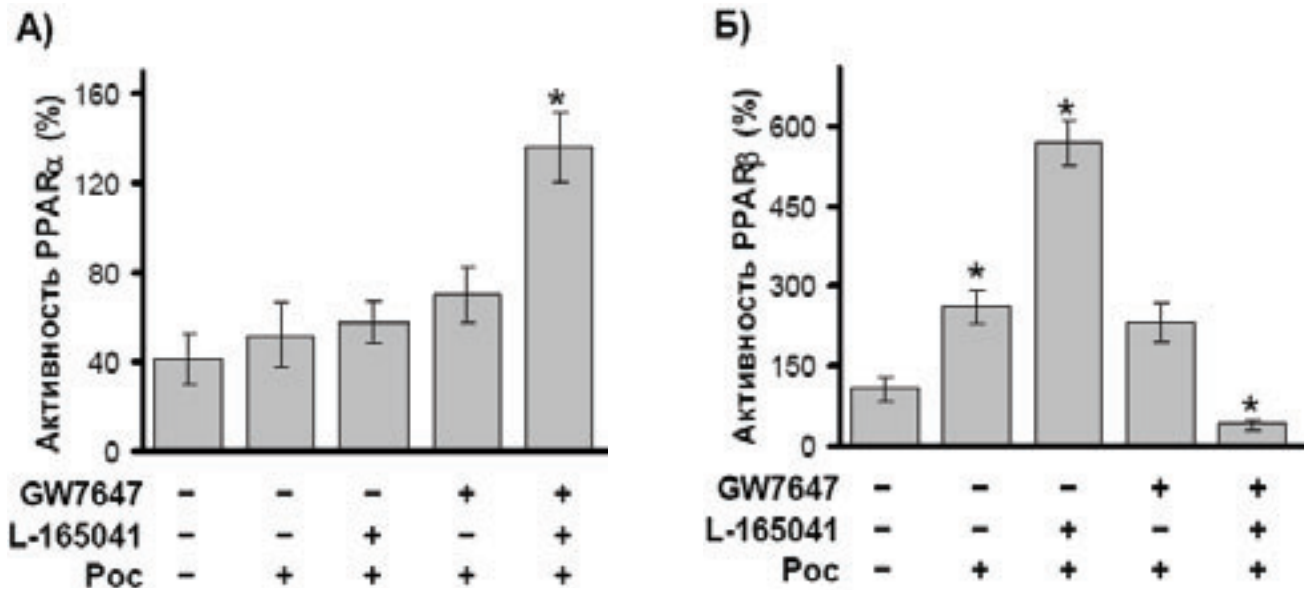
**Рис. 6. Активация PPAR $\beta$  приводит к увеличению экспрессии PPAR $\alpha$ .** Астроциты с нокдауном (А) или сверхэкспрессией (Б) PPAR $\beta$  предынкубировались с PPAR $\beta$  агонистом L-165041 (1мкМ) и PPAR $\gamma$  агонистом росиглитазоном (Рос) (20мкМ), затем клетки стимулировались ЛПС в течение 4 ч. Экспрессия PPAR $\alpha$  определялась с помощью ПЦР в реальном времени. Экспрессия генов в контрольных клетках принята за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. \*  $p < 0.05$ .

## 2.5. Взаимодействие изоформ PPAR на уровне модуляции их активности

Взаимодействие между изоформами PPAR было обнаружено на уровне их количества. Тем не менее, известно, что количество транскрипционного фактора не обязательно согласуется с его активностью, поэтому для проверки наличия взаимодействия PPAR на уровне их ДНК-связывающей активности мы измерили активность PPAR в астроцитах, обработанных различными комбинациями PPAR агонистов. Показано, что при обработке астроцитов PPAR $\alpha$  агонистом GW7647 совместно с PPAR $\gamma$  агонистом росиглитазоном активность PPAR $\alpha$  не изменялась, однако добавление L-165041 к этим агонистам более чем в 4 раза увеличивало активность PPAR $\alpha$  (Рис. 7А). Эти данные показывают, что PPAR $\beta$  увеличивает активность PPAR $\alpha$ . Показано, что добавление росиглитазона в 2,5 раза увеличивает активность PPAR $\beta$  (Рис. 7Б), а комбинированная обработка астроцитов росиглитазоном и L-165041 приводит к увеличению активности PPAR $\beta$  в 5,5



раз (Рис. 7Б), то есть PPAR $\gamma$  увеличивает активность PPAR $\beta$ . Эта индукция активности PPAR $\beta$  снимается агонистом PPAR $\alpha$  (Рис. 7Б), что подтверждает негативную роль PPAR $\alpha$  в регуляции PPAR $\beta$ . Таким образом, регуляция PPAR на уровне активности совпадает с их регуляцией на уровне экспрессии.



**Рис. 7. Активность PPAR модулируется схоже с их экспрессией.** Астроциты 10 мин предынкубировались с PPAR $\alpha$  агонистом GW7647 (1 мкМ), PPAR $\beta$  агонистом L-165041 (1мкМ) и PPAR $\gamma$  агонистом росиглитазоном (Рос) (20мкМ), затем клетки стимулировались ЛПС в течение 4 ч. Активность PPAR $\alpha$  (А) и PPAR $\beta$  (Б) определялась с иммуноферментного набора. Активность PPAR в контрольных клетках принята за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. \*  $p < 0.05$ .

### 3. Влияние агонистов PPAR на экспрессию COX-2 в астроцитах, стимулированных ЛПС

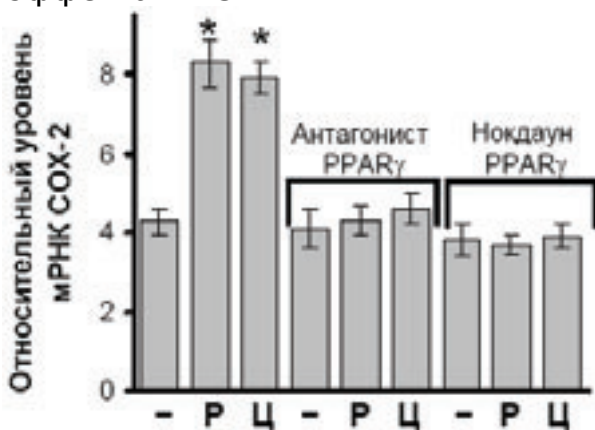
Важной функцией астроцитов при развитии воспалительного ответа является синтез простагландинов. Ключевым ферментом синтеза простагландинов является циклооксигеназа. В астроцитах экспрессируются две изоформы COX (COX-1 и COX-2). В литературе имеются сведения о влиянии синтетических агонистов различных изоформ PPAR на экспрессию COX-2, однако они противоречивы и зависят от типа изучаемых клеток и параметров эксперимента. Поэтому мы исследовали возможность регуляции COX-1 и COX-2 синтетическими агонистами PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  в астроцитах, стимулированных ЛПС.

Исследование динамики экспрессии COX показало, что уровень мРНК COX-2 начинает возрастать уже через 2 ч после ЛПС стимуляции, достигает максимума к 4 ч инкубации астроцитов с ЛПС, незначительно снижается к 16 ч и остается на этом уровне до 24 часов инкубации астроцитов с ЛПС. Данные иммуноблотинга показали, что уровень белка COX-2 значительно

возрастает к 4 ч ЛПС стимуляции и далее практически не растет. ЛПС приводит к незначительному падению уровня экспрессии COX-1 к 4 ч, далее этот уровень сохраняется. Хотя ранее таких исследований на астроцитах не проводилось, однако полученные результаты согласуются с общепринятыми представлениями о COX-1 как о конститутивно экспрессирующемся гене и о COX-2 как о ферменте, индуцируемом при воспалительном ответе.

При добавлении различных концентраций синтетических агонистов PPAR $\alpha$  (0,1-10 мкМ GW7647), PPAR $\beta$  (0,1-10 мкМ L-165041) и PPAR $\gamma$  (0,1-20 мкМ росиглитазона) значимого влияния агонистов на экспрессию COX-1 не обнаружено. Добавление PPAR $\gamma$  агонистов (росиглитазона и циглитазона) увеличивало ЛПС-индуцированную экспрессию мРНК COX-2 (Рис. 8), агонисты PPAR $\alpha$  и PPAR $\beta$  влияния на экспрессию COX-2 не оказывали.

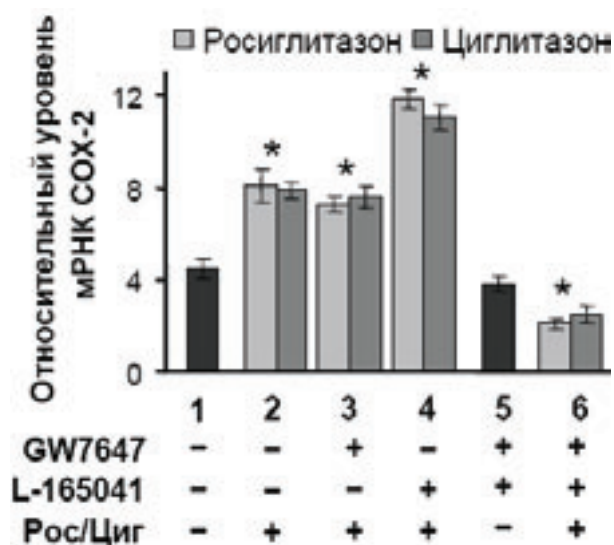
Для того, чтобы проверить является ли, обнаруженное потенцирование COX-2, вызванное росиглитазоном и циглитазоном специфическим, то есть PPAR $\gamma$ -зависимым процессом, мы использовали два независимых подхода: предобработка астроцитов PPAR $\gamma$  антагонистом GW9662 и изучение астроцитов с нокдауном PPAR $\gamma$ . Получено, что как ингибирование активности PPAR $\gamma$  антагонистом GW9662, так и нокдаун PPAR $\gamma$  приводит к снятию эффектов агонистов PPAR $\gamma$  (Рис. 8), то есть эффекты росиглитазона и циглитазона являются PPAR $\gamma$ -зависимым. Следует отметить, что «базовый» уровень экспрессии COX-2 в астроцитах, стимулированных ЛПС, не менялся при обработке астроцитов антагонистом или нокдауне PPAR $\gamma$  (Рис. 8), то есть индукция экспрессии COX-2 при обработке астроцитов ЛПС не является PPAR $\gamma$  зависимым процессом. Тем не менее, добавление синтетических агонистов PPAR $\gamma$  включает механизмы, которые приводят к потенцированию эффекта ЛПС.



**Рис. 8. Активация PPAR $\gamma$  увеличивает экспрессию COX-2 в астроцитах, стимулированных ЛПС.** Астроциты 10 мин пред-обрабатывались антагонистом PPAR $\gamma$  или использовались астроциты с нокдауном PPAR $\gamma$ . Далее их обрабатывали PPAR $\gamma$  агонистами росиглитазоном (P) и циглитазоном (C), затем астроциты стимулировались ЛПС. Через 4 ч стимуляции определялась экспрессия COX-2. Экспрессия генов в контрольных клетках принята за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. \*  $p < 0.05$ .

### 3.1. Влияние комбинированного применения агонистов PPAR на экспрессию COX-2

Так как эффекты взаимодействия изоформ PPAR наиболее ярко проявляются при комбинированном применении их синтетических агонистов, то мы изучили ЛПС-стимулированные астроциты, обработанные различными комбинациями синтетических PPAR агонистов. Получено, что после совместной обработки клеток PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  агонистами уровень экспрессии COX-2 не менялся по сравнению с клетками обработанными только PPAR $\gamma$  агонистом (Рис. 9; столбцы 2 и 3). Совместная обработка клеток PPAR $\gamma$  и PPAR $\beta$  агонистами приводила к 3-х кратному увеличению экспрессии (Рис. 9; столбцы 1 и 4), однако это увеличение снималось при добавлении агониста PPAR $\alpha$  (сравнение столбцов 4 и 6 на Рис. 9). С использованием метода иммуноблотинга показано, что данные по количеству мРНК соответствуют данным по количеству белка. Таким образом, показано, что взаимодействия между изоформами PPAR вносят значительный вклад в регуляцию экспрессии COX-2, ключевого фермента синтеза простагландинов в активированных астроцитах.



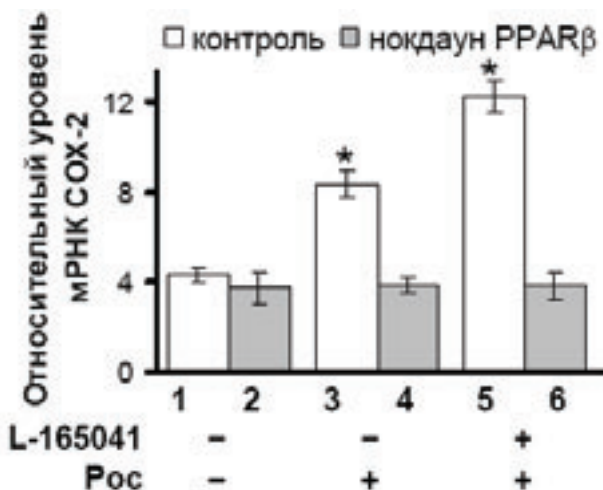
**Рис. 9. Комбинации агонистов PPAR модулируют экспрессию COX-2.** Астроциты предынкубировались с PPAR $\alpha$  агонистом GW7647 (1 мкМ), PPAR $\beta$  агонистом L-165041 (1мкМ) и PPAR $\gamma$  агонистами росиглитазоном (Рос) (20мкМ) и циглитазоном (Циг) (40 мкМ), затем клетки стимулировались ЛПС в течение 4 ч. Экспрессия COX-2 определялась с помощью ПЦР в реальном времени. Экспрессия COX-2 в контрольных клетках принята за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. \*  $p < 0.05$ .

### 3.2. Центральная роль PPAR $\beta$ в регуляции ЛПС-индуцированной экспрессии COX-2

Поскольку мы показали, что агонист PPAR $\gamma$  росиглитазон приводит к индукции экспрессии PPAR $\beta$ , то логично было предположить, что этот эффект может быть причиной наблюдаемого потенцирования экспрессии COX-2 росиглитазоном. Для доказательства этой гипотезы мы использовали астроциты с нокадауном PPAR $\beta$ . На этих клетках были изучены эффекты комбинированного применения PPAR $\gamma$  агониста росиглитазона с PPAR $\beta$



агонистом L-165041. Получено, что хотя «базовый» уровень экспрессии COX-2 в ЛПС- стимулированных астроцитах не изменяется (Рис. 10; столбцы 1 и 2), однако нокдаун PPAR $\beta$  снимает эффект как росиглитазона, так и комбинации росиглитазона с L-165041 (Рис. 10; сравнение столбцов 5,6 и столбцов 3,4). Эти результаты позволяют сделать вывод, что для проявления эффекта росиглитазона на экспрессию COX-2 необходимо наличие активного PPAR $\beta$ . Полученные результаты позволяют предположить, что роль других изоформ PPAR сводится к изменению количества и активности  $\beta$  изоформы PPAR.



**Рис. 10. Ключевая роль PPAR $\beta$  в модуляции экспрессии COX-2.** Как контрольные, так и астроциты с нокдауном PPAR $\beta$  предынкубировались с PPAR $\beta$  агонистом L-165041 (1мкМ) и PPAR $\gamma$  агонистом росиглитазоном (Ros) (20мкМ), затем клетки стимулировались ЛПС в течение 4 ч. Экспрессия COX-2 определялась с помощью ПЦР в реальном времени. Экспрессия COX-2 в контрольных клетках принята за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. \*  $p < 0.05$ .

Для проверки этой гипотезы мы трансфецировали астроциты плазмидой, сверхэкспрессирующей PPAR $\beta$  и изучили влияние различных комбинаций агонистов PPAR на экспрессию COX-2 в данной клеточной модели. Обнаружено, что увеличение экспрессии PPAR $\beta$  приводит к увеличению уровня экспрессии COX-2 в 2 раза. Добавление агониста PPAR $\beta$  L-165140 увеличивает этот уровень еще в 2 раза, причем эффект становится независимым от добавления агонистов PPAR $\gamma$ , или PPAR $\alpha$ , то есть можно предположить, что клетки при избытке PPAR $\beta$  становятся нечувствительными к регуляции экспрессии COX-2 агонистами PPAR $\gamma$  и PPAR $\alpha$ . Для доказательства этой гипотезы, мы изучили эффекты агонистов PPAR $\gamma$  и PPAR $\alpha$  на астроцитах, сверхэкспрессирующих PPAR $\beta$ , но с нокдауном PPAR $\alpha$  или PPAR $\gamma$ . Было получено, что нокдаун PPAR $\alpha$  или PPAR $\gamma$  не влиял на уровень COX-2 в таких астроцитах при обработке их L-165140. Эти данные подтверждают, что PPAR $\beta$  играет центральную роль в потенцировании экспрессии COX-2 в астроцитах, стимулированных ЛПС, а роль остальных изоформ PPAR сводится к модуляции экспрессии PPAR $\beta$ . Проведенные

эксперименты позволили предложить следующую схему взаимодействия изотипов PPAR при регуляции ЛПС-индуцированной экспрессии COX-2 (Рис.11): PPAR $\gamma$  активирует (Рис.11; путь 1), а PPAR $\alpha$  ингибирует (Рис.11; путь 2) экспрессию и активность PPAR $\beta$ . Активация PPAR $\beta$  приводит к потенцированию ЛПС-индуцированной экспрессии COX-2 (Рис.11; путь 3). При этом PPAR $\beta$  увеличивает экспрессию и активность PPAR $\alpha$  (Рис.11; путь 4), то есть описанная система способна к терминации экспрессии COX-2.



**Рис. 11. Схема взаимодействия изотипов PPAR при регуляции экспрессии COX-2.** 1) PPAR $\gamma$  активирует PPAR $\beta$ ; 2) PPAR $\alpha$  супрессирует экспрессию и активность PPAR $\beta$ ; 3) Активация PPAR $\beta$  приводит к увеличению экспрессии COX-2; 4) Активация PPAR $\beta$  приводит к активации PPAR $\alpha$ .

### 3.3. Изучение физиологической значимости росиглитазон-индуцированной экспрессии COX-2

Обнаруженное влияние росиглитазона на экспрессию COX-2 исключительно важно в свете предполагаемого использования синтетических PPAR агонистов как нейропротективных средств. Поэтому нами были проведены исследования по влиянию росиглитазона на выброс физиологически активных медиаторов воспаления- простагландинов. Был разработан метод количественного определения концентрации простагландинов с помощью метода масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. В ходе работы было показано, что концентрации всех изучаемых простагландинов при ответе астроцитов на ЛПС меняются согласованно с простагландином E<sub>2</sub>, который является общепризнанным маркером воспаления. Поэтому далее активность полиферментной системы синтеза простагландинов оценивалась по уровню выбрасываемого астроцитами простагландина E<sub>2</sub>, который измеряли иммуоферментным методом. Был показано, что стимуляция астроцитов ЛПС приводит к выбросу простагландина E<sub>2</sub>, концентрация которого становится равной 1,1±0,11 нг/мл, а росиглитазон PPAR $\gamma$  увеличивает этот выброс до концентрации 2,1±0,09 нг/мл. Действие росиглитазона снимается в присутствии

антагониста PPAR $\gamma$ , который снижает уровень простагландина E<sub>2</sub> до 0,9±0,12 нг/мл. Таким образом, обнаруженная росиглитазон-индуцированная экспрессия COX-2 является физиологически значимой.

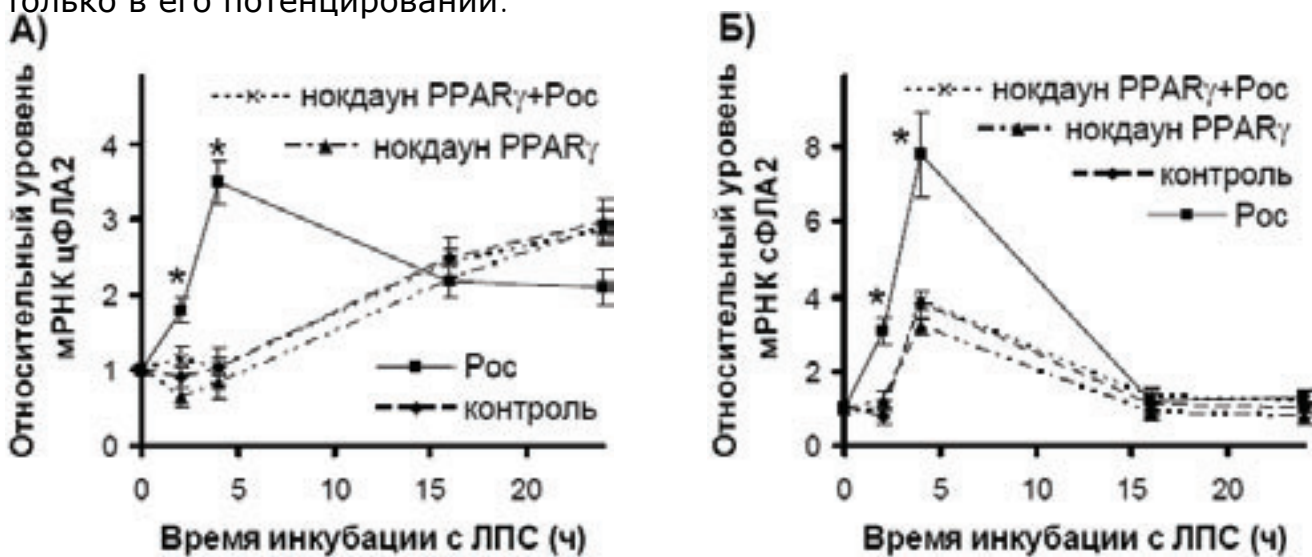
#### **4. Влияние агонистов PPAR на экспрессию цитозольной и секреторной ФЛА<sub>2</sub> в астроцитах, стимулированных ЛПС**

Важной характеристикой действия провоспалительных стимулов на астроциты является активация фосфолипазы A<sub>2</sub> (ФЛА<sub>2</sub>) и высвобождение полиненасыщенных жирных кислот. ФЛА<sub>2</sub> относится к классу PPAR лиганд-синтезирующих ферментов. Известно, что в астроцитах при воспалении главную роль играют секреторная и цитозольная ФЛА<sub>2</sub>, а в литературе имеются указания на возможность регуляции секреторной и цитозольной ФЛА<sub>2</sub> агонистами PPAR, но работ по изучению влияния всех трех изотипов PPAR на экспрессию ФЛА<sub>2</sub> в не проводилось. Не было сведений и о регуляции ФЛА<sub>2</sub> агонистами PPAR в астроцитах. Поэтому мы изучили влияние ЛПС на экспрессию секреторной и цитозольной ФЛА<sub>2</sub>.

Получено, что уровень экспрессии цитозольной ФЛА<sub>2</sub> увеличивается в 2 раза к 16 ч инкубации астроцитов с ЛПС и далее остается на постоянном уровне (Рис. 12 А). Эти результаты согласуются с общепринятым представлением, что активация ФЛА<sub>2</sub> на начальных этапах ответа на провоспалительные стимулы происходит за счет фосфорилирования уже существующего белка и лишь на более поздних этапах идет регуляция ее экспрессии. PPAR $\gamma$  агонист росиглитазон приводил к росту уровня экспрессии цитозольной ФЛА<sub>2</sub> начиная с 2 ч инкубации, который достигал максимального (тремякратного по сравнению с ЛПС-стимулированными астроцитами) уровня к 4 часам. К 16 часам уровень цитозольной ФЛА<sub>2</sub> не отличался от уровня цитозольной ФЛА<sub>2</sub> в контрольных клетках (Рис. 12 А). Нокдаун PPAR $\gamma$  снимал эффекты росиглитазона (Рис. 12 А), что говорит о PPAR $\gamma$  специфическом действии этого агониста. Аналогично исследовали эффекты PPAR $\alpha$  и PPAR $\beta$  агонистов. Активация PPAR $\beta$  его агонистом L-165041, приводит к увеличению уровня цитозольной ФЛА<sub>2</sub> на всех сроках ЛПС стимуляции (2-24 часа). Показано, что агонист GW7647 через активацию PPAR $\alpha$  приводит к значимому увеличению экспрессии цитозольной ФЛА<sub>2</sub> после четырехчасовой ЛПС-стимуляции. Таким образом, все три изоформы PPAR принимают участие в модуляции ЛПС-индуцированного уровня экспрессии цитозольной ФЛА<sub>2</sub>.

Экспрессия секреторной ФЛА<sub>2</sub> увеличивается в 3 раза после 4 ч стимуляции, к 16 ч возвращается к исходному уровню и не меняется в дальнейшем (Рис. 12 Б). Несколько другой тип воздействия оказывают PPAR на экспрессию секреторной ФЛА<sub>2</sub>. PPAR $\alpha$  и PPAR $\beta$  агонисты не влияют на экспрессию секреторной ФЛА<sub>2</sub> в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мкМ. Обработка астроцитов росиглитазоном приводит к трехкратному увеличению уровня секреторной ФЛА<sub>2</sub> после 2 часов стимуляции и к двукратному увеличению после 4 ч стимуляции ЛПС (Рис. 12 Б). К 16 ч уровень секреторной ФЛА<sub>2</sub> в обработанных росиглитазоном клетках падает до уровня в контрольных клетках и остается постоянным вплоть до окончания измерений (24 часа стимуляции) (Рис. 12 Б). На клетках с нокадаун PPAR $\gamma$  показано, что эффект росиглитазона является PPAR $\gamma$  зависимым (Рис. 12 Б).

Таким образом, все три изоформы PPAR участвуют в регуляции экспрессии цитозольной ФЛА<sub>2</sub> и только активация PPAR $\gamma$  увеличивает уровень экспрессии секреторной ФЛА<sub>2</sub>, тем не менее PPAR не влияют на «базовый» ЛПС-индуцированный уровень экспрессии ФЛА<sub>2</sub>, а участвуют только в его потенцировании.

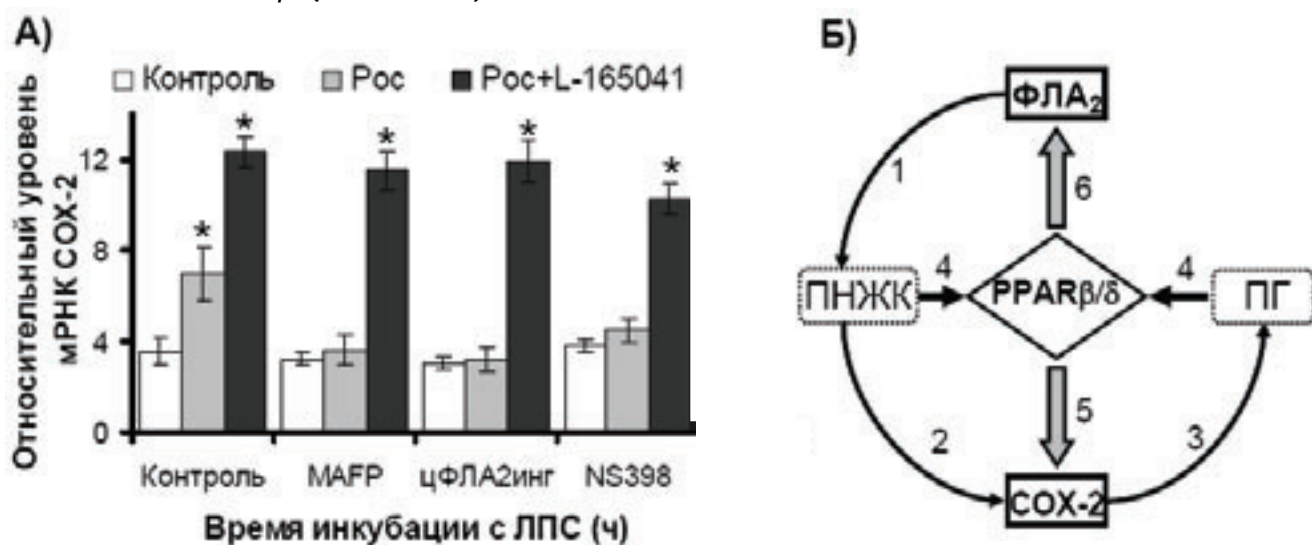


**Рис. 12. Активация PPAR $\gamma$  увеличивает экспрессию цитозольной (цФЛА2) и секреторной (сФЛА2) фосфолипаз А2.** Контрольные астроциты, также как и астроциты с нокадаун PPAR $\gamma$  предынкубировались с PPAR $\gamma$  агонистом росиглитазоном (Рос) (5 мкМ), затем клетки стимулировались ЛПС в течение 2, 4, 16 и 24 ч. Экспрессия цитозольной (цФЛА2) (А) и секреторной (сФЛА2) (Б) фосфолипаз А2 определялась с помощью ПЦР в реальном времени. Экспрессия генов в контрольных клетках принята за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. \*  $p < 0.05$ .

## 5. Роль эндогенных лигандов PPAR, продуцируемых ФЛА<sub>2</sub> и СОХ-2, в развитии воспалительного ответа

Нами было показано, что PPAR участвуют в активации экспрессии PPAR лиганд-синтезирующих ферментов: ФЛА<sub>2</sub> и СОХ-2, регулируют количество

своих эндогенных лигандов при ответе на провоспалительный стимул. Для подтверждения наличия взаимосвязи между PPAR и их лиганд-синтезирующими ферментами мы обрабатывали клетки ингибиторами ФЛА<sub>2</sub> (MAFP и специфический ингибитор цитозольной ФЛА<sub>2</sub>), а также специфическим ингибитором COX-2 NS398. Получено, что ингибиторы не влияли на «базовый» уровень ЛПС-индуцированной экспрессии COX-2 (Рис. 13А, белые столбцы), однако снимали росиглитазон-индуцированную экспрессию COX-2 (Рис. 13 А, серые столбцы), то есть эндогенные лиганды, продуцируемые ФЛА<sub>2</sub> и COX-2 играют важную роль в реализации эффекта росиглитазона. Агонистом PPAR $\beta$  восстанавливает уровень экспрессии COX-2 при всех обработках (Рис. 13 А), что указывает на то, что эндогенные лиганды в рассматриваемой системе являются лигандами PPAR $\beta$ . Можно предложить следующую схему, объясняющую взаимодействия PPAR и их лиганд-синтезирующих ферментов (Рис. 13 Б): провоспалительный стимул активирует COX-2 и ФЛА<sub>2</sub>, которые синтезируют простагландины и полиненасыщенные жирные кислоты; эти вещества являются эндогенными лигандами PPAR $\beta$  (Рис. 13 Б).



**Рис. 13. Фосфолипазы A<sub>2</sub> и COX-2 продуцируют эндогенные лиганды PPAR $\beta$ .**

**(А)** Астроциты 10 мин предынкубировались с MAFP (5 мкМ), специфическим ингибитором цитозольной фосфолипазы цФЛА<sub>2</sub>инг (1 мкМ) и со специфическим ингибитором COX-2 NS398 (1 мкМ). Далее клетки обрабатывались PPAR $\beta$  агонистом L-165041 (1мкМ) и PPAR $\gamma$  агонистом росиглитазоном (Рос) (20мкМ). После 4 часов ЛПС стимуляции с помощью ПЦР в реальном времени измерялась экспрессия COX-2. Экспрессия COX-2 в контрольных клетках принята за 1. Все эксперименты проводили не менее трех раз. \* p < 0.05.

**(Б)** При воздействии провоспалительного стимула фосфолипазы A<sub>2</sub> выщепляют полиненасыщенные жирные кислоты из фосфолипидов (1); эти жирные кислоты являются субстратом для COX-2 (2), который превращает их в простагландины (3); и жирные кислоты и простагландины являются эндогенными лигандами PPAR $\beta$  (4), активация которого индуцирует экспрессию COX-2 (5) и ФЛА<sub>2</sub> (6).

## **ВЫВОДЫ**

1. Исследовано влияние синтетических агонистов ядерных рецепторов PPAR на экспрессию генов самих ядерных рецепторов PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и ферментов классов фосфолипаз  $A_2$  и циклооксигеназ. Показано, что синтетические агонисты изоформ PPAR влияют на экспрессию этих генов.
2. Изучена взаимосвязь между изоформами PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  в астроцитах, стимулированных ЛПС. Показано, что PPAR $\gamma$  увеличивает, а PPAR $\alpha$  снижает уровень экспрессии и активность PPAR $\beta$ ; PPAR $\beta$  увеличивает уровень экспрессии и активность PPAR $\alpha$ .
3. Показано положительное влияние агонистов PPAR $\gamma$  и отрицательное влияние агонистов PPAR $\alpha$  на экспрессию COX-2 в астроцитах, стимулированных ЛПС. Установлено, что механизм действия этих агонистов заключается в модуляции активности PPAR $\beta$ , который играет ключевую роль в регуляции экспрессии COX-2.
4. В результате исследования влияния ядерных рецепторов PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  на экспрессию цитозольной и секреторной фосфолипаз  $A_2$  в астроцитах, стимулированных ЛПС, установлено, что экспрессия цитозольной фосфолипазы  $A_2$  находится под положительным контролем PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , а экспрессия секреторной фосфолипазы  $A_2$  находится под положительным контролем PPAR $\gamma$ .
5. Показано, что активность цитозольной фосфолипазы  $A_2$  и COX-2 необходима для PPAR-опосредованной регуляции экспрессии COX-2 в астроцитах, стимулированных ЛПС. Установлено, что в данной системе эти ферменты продуцируют эндогенные лиганды PPAR $\beta$ .



## СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

### ДИССЕРТАЦИИ

#### Статьи:

1. **Aleshin S**, Grabeklis S, Hanck T, Sergeeva M, Reiser G. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma positively controls and PPARalpha negatively controls cyclooxygenase-2 expression in rat brain astrocytes through a convergence on PPARbeta/delta via mutual control of PPAR expression levels. *Mol Pharmacol.* 76(2): 414-424
2. Каратасо Ю.О., **Алёшин С.Е.**, Попова Н.В., Чистяков В.В., Сергеева М.Г., Варфоломеев С.Д. (2007). Количественный анализ простагландинов и полиненасыщенных жирных кислот методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. *Масс-спектрометрия т.4, в. 3: 173-178*

#### Тезисы конференций и статьи в сборниках:

3. Каратасо Ю.О., **Алёшин С.Е.**, Попова Н.В. Использование масс-спектрометрии с электрораспылением для количественного анализа липидомов клеток животных на примере полиненасыщенных жирных кислот и эйкозаноидов. XIV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, Россия, 11-14 апреля, 2007, сборник тезисов стр. 34
4. Попова Н.В, **Алёшин С.Е.**, Каратасо Ю.О. Валидация метода ESI/MS для задач липидомики. XIV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, Россия, 11-14 апреля, 2007, сборник тезисов, стр. 29-30.
5. Грабеклис С.А., **Алёшин С.Е.**, Сергеева М.Г., Райзер Г. Использование пары "агонист-антагонист" для модуляции эффектов, вызванных транскрипционными факторами PPAR. Сборник статей Международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация (5-7 июня 2007 г.)", стр. 15-17
6. **Алёшин С.Е.**, Грабеклис С.А. Регуляция экспрессии провоспалительного гена COX-2 при сочетаном применении синтетических агонистов ядерных рецепторов (PPAR). XV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, Россия, 8 - 11 апреля, 2008, сборник тезисов, стр. 2.
7. **Aleshin S**, Sergeeva M, Reiser G. PPAR $\gamma$  Positively and PPAR $\alpha$  Negatively Controls Cyclooxygenase-2 Expression in Rat Brain Astrocytes through a PPAR $\beta$ -Dependent Pathway (2009). *Mol. Biol. Cell* 19 (suppl), abstract #.W-L47
8. **Алёшин С.Е.** Механизм действия росиглитазона на экспрессию циклооксигеназы-2 (COX-2). XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, Россия, 13-18 апреля, 2009, сборник тезисов, стр.2.
9. Грабеклис С.А., **Алёшин С.Е.**, Сергеева М.Г., Райзер Г. Сочетанное применение агонистов и антагонистов ядерного рецептора PPAR $\gamma$  снижает негативные последствия реактивного астроглиоза. Сборник статей Международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация (2-4 июня 2009 г.)", стр. 350-353.